

Expression der Protease aktivierten Rezeptoren (PARs) 3 und 4
in Idiopathischer Pulmonaler Fibrose
und Idiopathischer Pulmonal-arterieller Hypertonie

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

vorgelegt von
Sebastian Josef Berscheid
aus Wiesbaden

Gießen 2017

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin und der Medizinischen
Klinik II des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Malgorzata Wygrecka

Gutachter: PD Dr. Barbara Ahlemeyer

Tag der Disputation: 22.02.2018

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	- 1 -
1.1	Die Hämostase	- 1 -
1.1.1	Allgemeine Einführung.....	- 1 -
1.1.2	Das Zell-basierte Modell der Gerinnung	- 2 -
1.1.2.1	Die Initiationsphase.....	- 2 -
1.1.2.2	Amplifizierungsphase	- 2 -
1.1.2.3	Verbreitungsphase.....	- 3 -
1.1.2.4	Terminationsphase	- 3 -
1.2	Thrombin	- 4 -
1.3	Protease aktivierte Rezeptoren (PARs).....	- 5 -
1.3.1	Allgemeine Einführung.....	- 5 -
1.3.2	Physiologie und Pathophysiologie der PARs in der Lunge	- 7 -
1.4	Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF).....	- 12 -
1.5	Die Idiopathische Pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH)	- 17 -
1.6	Fragestellung.....	- 21 -
2	Materialien und Methoden.....	- 22 -
2.1	Humanes Probenmaterial	- 22 -
2.2	Eigenschaften der Patientenkohorten.....	- 23 -
2.3	Probenmaterial der Tiermodelle	- 26 -
2.4	Isolierung pulmonaler Fibroblasten	- 26 -
2.5	Isolierung von Typ-II Pneumozyten	- 27 -
2.6	Western Blot- Gelelektrophorese.....	- 28 -
2.7	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	- 29 -
2.8	Immunhistochemie.....	- 30 -
2.9	Realtime- Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	- 32 -
2.9.1	Isolierung der RNA.....	- 32 -
2.9.2	Synthese der cDNA	- 32 -
2.9.3	qPCR.....	- 33 -
2.10	Statistik	- 34 -
3.	Ergebnisse	- 36 -
3.1	Analyse der PAR-3 und PAR-4-Expression in den Lungen von IPF-Patienten.....	- 36 -

3.1.1	PAR-3 ist in den Lungengeweben von IPF-Patienten erhöht	- 36 -
3.1.2	PAR-3 ist in isolierten Typ-II Pneumozyten von IPF-Patienten erhöht	- 36 -
3.1.3	PAR-4 ist den Lungengeweben von IPF-Patienten nicht erhöht	- 38 -
3.1.4	Die PAR-4-Expression ist in isolierten humanen pulmonalen Fibroblasten	
	und Typ-II Pneumozyten nicht signifikant verändert	- 40 -
3.2	Analyse der Expression von PAR-3 und PAR-4 im Tiermodell der Bleomycin-	
	induzierten Lungenfibrose	- 41 -
3.2.1	Die PAR-3-Expression ist im Lungengewebe von Bleomycin-behandelten	
	Mäusen erhöht.....	- 41 -
3.2.2	Die PAR-3-Expression ist in isolierten murinen Typ-II Pneumozyten erhöht. -	43 -
3.2.3	Die Expression von PAR-4 ist in den fibrotischen Lungengeweben von	
	Bleomycin-behandelten Mäusen nicht signifikant verändert	- 44 -
3.2.4	Die PAR-4-Expression ist in isolierten murinen Lungenfibroblasten und.....	
	isolierten murinen Typ-II Pneumozyten nicht signifikant verändert.....	- 46 -
3.3	Analyse der Expression von PAR-3 und PAR-4 in den Lungengeweben von	
	Patienten mit idiopathischer pulmonal-arterieller Hypertonie (IPAH).....	- 47 -
3.3.1	PAR-3 ist überwiegend in den glatten Muskelzellen von IPAH-Patienten	
	signifikant erhöht.....	- 47-
3.3.2	Die Expression von PAR-4 im Lungengewebe von IPAH-Patienten ist nicht	
	signifikant verändert	- 49 -
3.3.3	Die Aktivierung von FX ist bei IPAH-Patienten erhöht	- 49 -
3.3.4	Im Blutplasma von IPAH-Patienten ist FX signifikant erniedrigt exprimiert ..	- 52 -
3.3.5	PAR-3 wird im Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	
	nicht signifikant verstärkt exprimiert.....	- 52 -
3.3.6	PAR-4 wird im Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen	
	Hypertonie nicht signifikant verstärkt exprimiert.....	- 55 -
3.3.7	FVII und FX sind im Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen	
	Hypertonie nicht signifikant verändert	- 56 -
4.	Diskussion.....	- 57 -
4.1	Expression der von PAR-3 und PAR-4 bei idiopathischer pulmonaler Fibrose	
	und ihre mögliche pathophysiologische Relevanz.....	- 57 -
4.2	Expression der PARs bei Idiopathischer Pulmonal-arterieller Hypertonie	
	und ihre mögliche pathophysiologische Bedeutung	- 62 -
5.	Zusammenfassung	- 67 -
	Abstract.....	- 68 -
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	i

7. Abbildungsverzeichnis.....	iv
8. Tabellenverzeichnis.....	v
9. Literaturverzeichnis	vi
Erklärung zur Dissertation	xv
Danksagung/ Publikation	xvi

1. Einleitung

1.1 Die Hämostase

1.1.1 Allgemeine Einführung

Die Gerinnung des Menschen ist ein hochkomplexes System, das durch ein Zusammenspiel verschiedener Zellpopulationen, proteolytischer Enzyme und diverser anderer Faktoren charakterisiert ist. Es schützt das Gefäßsystem hocheffektiv bei Verletzungen jeglicher Genese und verhindert damit einen schädlichen Blutverlust.

Unter physiologischen Umständen bleibt es lokal auf die Verletzungsstelle begrenzt. Aufgrund seiner Komplexität bestehen jedoch im Gerinnungssystem vielfältige Möglichkeiten der Anfälligkeit, die von der lokal begrenzten Gerinnung hin zu schweren systemischen Zwischenfällen führen können. Bei Entgleisungen kann es einerseits bei einer überschießenden Aktivierung der Gerinnungskaskade zu schweren thromboembolischen Ereignissen, wie beispielsweise der Lungenembolie nach Thrombusbildung in den tiefen Beinvenen, kommen [1]. Andererseits zeigen sich bei einer beeinträchtigten Gerinnung zum Teil massive Blutungserscheinungen. Beispielhaft sei das Krankheitsbild der Hämophilie A bzw. B erwähnt.

Ein halbes Jahrhundert, seit 1964, prägte das „Wasserfall-/ Kaskadenmodell“ von Macfarlane [2] und Davie/ Ratnoff [3] das Verständnis der Gerinnung. In diesem Modell vereinen sich der extrinsische und intrinsische Weg der Gerinnung über das Zusammenspiel der verschiedenen Gerinnungsfaktoren zu einem gemeinsamen Pfad, welcher über die Aktivierung von Faktor X (FX) zu der durch Thrombin getriggerten Ausbildung eines Fibrinnetzes führt. Es zeigte jedoch sich im Verlauf der letzten beiden Dekaden, dass dieses Modell der Gerinnung nicht mehr adäquat war, um die physiologischen Zusammenhänge der Hämostase *in vivo* zufriedenstellend zu erklären [4]. Daher wird heute zunehmend das Modell der Zell-basierten Gerinnung zur Darstellung der Gerinnungsabläufe verwendet, wobei hier die Gerinnungsreaktion durch Aktivierung von Rezeptoren der Zelloberfläche, insbesondere auf der Zellmembran der Thrombozyten, stattfindet. Das Modell der Zell-basierten Gerinnung soll nun im Folgenden genauer erläutert werden.

1.1.2 Das Zell-basierte Modell der Gerinnung

Das Modell der Zell-basierten Gerinnung teilt sich in drei überlappende Phasen auf: Diese werden als Initiationsphase, Amplifizierungsphase und Verbreitungsphase (engl.: *initiation phase, amplification phase & propagation phase*) bezeichnet. Die Prozesse dieser drei Phasen werden gemeinsam in der Terminationsphase beendet (s. Abb.1):

1.1.2.1 Die Initiationsphase

Nach einer traumatischen oder anders gearteten Verletzung und dem daraus entstandenen Endothelschaden wird die Gerinnungsreaktion durch den sogenannten Gewebefaktor (engl. Tissue Faktor (TF)) eingeleitet. Dieser befindet sich auf der Oberfläche von Perizyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen des subendothelialen Gewebes [5]. Der Gewebefaktor wandelt bei Kontakt freien Faktor VII (FVII) zu Faktor VIIa (FVIIa) um und bildet den TF/ FVIIa Komplex an der Zelloberfläche. Dieser Komplex aktiviert in der Folge in Anwesenheit von Phospholipiden kleine Mengen an freiem Faktor IX (FIX) und FX, welche beständig im Blutkreislauf zirkulieren, zu Faktor IXa (FIXa) und Faktor Xa (FXa). An der Zelloberfläche der TF-tragenden Zelle aktiviert FXa nun weiterhin den Faktor V (FV) zu Faktor Va (FVa) und bildet mit diesem den sogenannten Prothrombinase-Komplex, welcher eine kleine Menge an Faktor II (FII) zu Faktor IIa (FIIa), dem Thrombin, umwandelt. Diese geringe Konzentration an Thrombin reicht zunächst für die Bildung eines Fibringerinnsels und eine adäquate Bedeckung der Verletzungsstelle nicht aus [4- 6].

1.1.2.2 Amplifizierungsphase

Im Anschluss an die Initiationsphase wechseln die Gerinnungsprozesse der Amplifizierungsphase von den TF-tragenden Zellen auf die Zelloberfläche der Thrombozyten. Dies dient der Kontrolle der Hämostase, damit ungewollte thrombotische Komplikationen vermieden werden können. Das in der Initiationsphase limitiert aktivierte Thrombin rekrutiert und aktiviert nun mittels Chemotaxis weitere Thrombozyten, zusätzlich werden durch das Thrombin FV, Faktor VIII (FVIII) und Faktor XI (FXI) in ihre aktive Form überführt. Die Aktivierung von Faktor VIIIa (FVIIIa) erfolgt jedoch nur im Fall einer Gefäßverletzung, da dieser Prozess nur in Kombination mit dem von Willebrand Faktor (vWF), welcher an der Oberfläche endothelialer Gewebe exprimiert wird, ablaufen kann. Es bildet sich hier der vWF/

FVIII-Komplex, welcher die Aktivierung von FVIIIa sowie zusätzlich eine verstärkte Thrombozytenaggregation an der Verletzungstelle bewirkt. Des Weiteren vermittelt in der Amplifizierungsphase FXIa eine vermehrte Aktivierung von FIXa [4- 6].

1.1.2.3 Verbreitungsphase

Durch die stark vermehrte Aktivierung der Thrombozyten in der Amplifizierungsphase bilden FIXa und FVIIIa den sogenannten Tenase-Komplex auf der Oberfläche des Thrombozyten. Dieser Tenase-Komplex spaltet große Mengen an FX zu Faktor Xa. Es erfolgt nun ein starker Anstieg der Bildung des Prothrombinase-Komplexes aus FVa und FXa. Dieser spaltet wiederum FII zu FIIa, was in der Folge einen substantiellen Anstieg der Thrombinkonzentration bedeutet. Diese hohe Konzentration reicht nun aus, um das Fibrinogen zu Fibrinmonomeren zu spalten. Der ebenfalls durch Thrombin in seine aktive Form gesplattene Faktor XIIIa vermittelt schließlich die Quervernetzung der Fibrinmonomere zu Fibrinpolymeren, welche den Gewebsschaden effektiv decken [4–6].

1.1.2.4 Terminationsphase

Nach Abschluss einer ausreichenden Fibrinbedeckung der Gefäßverletzung muss die Beendigung des Gerinnungsprozesses gewährleistet sein, um eine überschießende Gerinnungsreaktion zu vermeiden. Dies geschieht durch mehrere physiologisch vorhandene Antikoagulantien. Der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) wird durch das umliegende Endothel gebildet und formt zusammen mit TF, FVIIa und FXa eine Quartärstruktur, welche aktivierte Gerinnungsfaktoren inaktiviert. Des Weiteren deaktivieren die aktivierten Proteine C und S die Faktoren Va und VIIIa. Das Glykoprotein Protein C ist Vitamin K-abhängig und beendet die Aktivität von FVa und FVIIIa mittels Proteolyse. Es wird durch Thrombomodulin aktiviert, welches sich an der Endotheloberfläche befindet und dort von Thrombin stimuliert wird. Das ebenfalls Vitamin K-abhängige Protein S dient hierbei dem Protein C als beschleunigender Cofaktor. Ein weiteres Antikoagulans ist das Antithrombin III, welches sowohl Thrombin als auch weitere Serinproteasen wie etwa FIXa oder FXa durch Proteolyse inaktiviert [6–8].

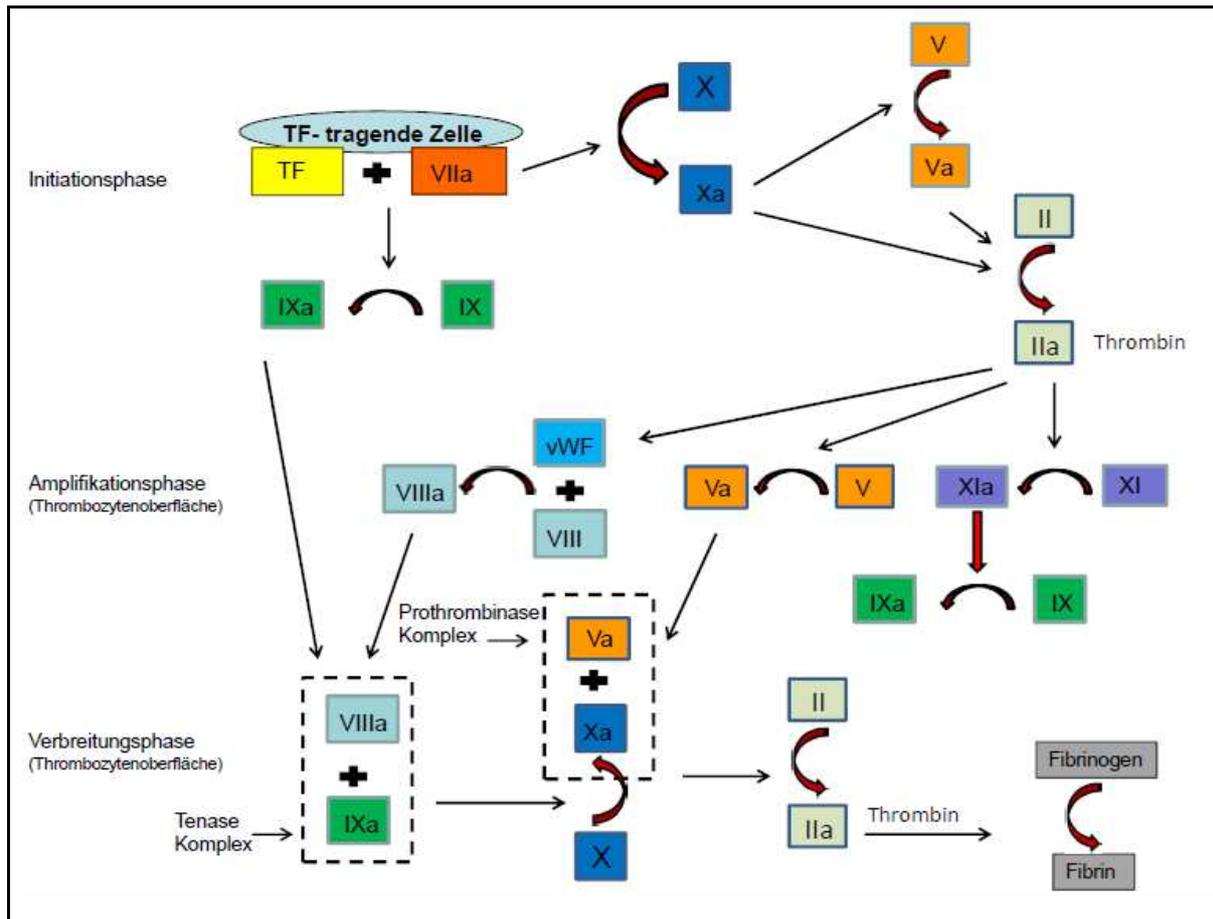


Abbildung 1. Darstellung der Zell basierten Gerinnung: Einteilung in die Initiationsphase, Amplifizierungsphase und Verbreitungsphase. Abkürzungen: TF= Tissue Faktor; II/IIa= Faktor II/IIa; V/Va=Faktor V/Va; VIII/VIIIa= Faktor VIII/VIIIa; IX/IXa= Faktor IX/IXa; X/Xa= Faktor X/Xa; XI/XIa =Faktor XI/XIa; vWF= von Willebrand Faktor; modifiziert nach Ferreira CN et al.: Cell-based model of coagulation and its implications. Rev Bras Hematol Hemoter. 2010;32(5):416-421

1.2 Thrombin

Die Serinprotease Thrombin ist Teil der Gerinnungsreaktion und wird in Form seines Vorläuferprotein Prothrombin in der Leber gebildet. Prothrombin ist permanent im Blutsystem vorhanden [9, 10]. Als sogenannter Hauptaktivator der Gerinnungskaskade werden der Serinprotease Thrombin heute eine Vielzahl an Funktionen zugeschrieben. Hauptaufgabe ist die Vermittlung der Thrombozytenaggregation und der Fibrinvernetzung nach Gefäßschäden. Diese Prozesse werden durch eine lokale Konzentrationserhöhung des Thrombin im Rahmen der Hämostase in Gang gesetzt. Die Wirkung des Thrombin ist örtlich begrenzt, da die eigene Produktion und die daraus resultierende lokale Konzentrationserhöhung wiederum eine negative Feedbackschleife

in Gang setzt und die Produktion dadurch stoppt. So ist unter physiologischen Bedingungen eine lokal begrenzte und zeitliche limitierte Aktivierung gewährleistet [9]. Unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer dysregulierten Expression von Thrombin mit weitreichenden, insbesondere zellulären, pathogenetisch relevanten Effekten. Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden umfangreiche Kenntnisse zu Funktionen, welche dem Thrombin zugeschrieben werden, gewonnen.

Einige Bestandteile dieser neuen Daten sollen nun kurz erläutert werden:

Thrombin ist ein integraler Bestandteil der Hämostase. Es spaltet hierbei Fibrinogen in das aktive Fibrinmonomer. Außerdem werden, wie im vorangegangenen Kapitel bereits ausführlich erläutert, zahlreiche Gerinnungsfaktoren über das Thrombin aktiviert.

Des Weiteren verändern Thrombozyten unter Thrombineinwirkung ihre Form und schütten unter anderem Adenosindiphosphat, Serotonin, Thromboxan A₂ und das Adhäsionsmolekül P-Selectin aus [9, 11]. Weitere Studien zeigen, dass sich unter der Wirkung von Thrombin die Permeabilität des Endothels durch Änderung der Zellform erhöht und dadurch die Ödembildung gefördert wird [9, 11]. Die glatten Muskelzellen werden durch Thrombin zur Kontraktion [12] und Zytokinausschüttung angeregt, bei T-Lymphozyten der Calciumsignalweg aktiviert [9]. Durch die Entdeckung der Protease-aktivierten Rezeptoren, engl. *protease activated receptors* (PARs), hat sich das Wirkungsspektrum des Thrombin zusätzlich erweitert. In den letzten Jahren wurden auf *in vitro* Ebene zahlreiche Thrombin-induzierte PAR-vermittelte zelluläre Effekte nachgewiesen und erste Untersuchungen haben beteiligte intrazelluläre Signalkaskaden aufgezeigt. Viele Fragen hierzu sind gegenwärtig jedoch noch offen, insbesondere deren pathogenetische Relevanz für verschiedene Krankheitsbilder.

1.3 Protease aktivierte Rezeptoren (PARs)

1.3.1 Allgemeine Einführung

Die Familie der PARs besteht nach aktuellem Forschungsstand aus vier verschiedenen Subtypen: PAR-1, PAR-2, PAR-3 und PAR-4, benannt nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit Beginn im Jahr 1991. PARs sind beinahe ubiquitär auf der Oberfläche menschlicher Zellen zu finden und wurden bisher auf Thrombozyten, Monozyten, Mastzellen, T-Lymphozyten, der Skelettmuskulatur, vaskulären und nicht vaskulären

glatten Muskelzellen (SMC) gefunden. Außerdem sind sie weiterhin auf exokrinen Drüsen, Keratinozyten, Osteoblasten, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, Astrozyten und Neuronen vertreten [10, 13–15]. Gemein ist allen vier Subtypen der Modus der Aktivierung. Als bisher einzigartiger Rezeptortyp trägt er seinen eigenen Liganden, in der englischen Fachliteratur als „tethered ligand“ bezeichnet. Dieser Ligand wird durch proteolytische Spaltung einer speziellen Bindungsstelle der N-terminalen Exodomaine aktiviert. In der Folge koppelt er sich an den Loop 2 des Rezeptors, wodurch dieser irreversibel in seine aktive Form übergeht. (siehe Abb.2) [13–17]. PARs sind membranständige Peptidrezeptoren und übermitteln ihre Signale durch die Kopplung an Proteine der G_i , $G_{q/11}$ oder $G_{12/13}$ - Familie. Jeder Subtyp trägt seine eigene spezifische Bindungsstelle, wobei jeder Rezeptor nicht nur durch eine einzige Protease aktiviert werden kann, sondern durch verschiedene Spaltungsenzyme in seine aktive Form überführbar ist [13–15, 17]. Die Funktionsdauer der aktivierten PARs ist zeitlich sehr begrenzt. Durch Proteinkinasen-abhängige Prozesse am C-terminalen Ende des Rezeptors werden die PARs sehr rasch aus der Zellmembran entfernt und lysosomal abgebaut [16, 18]. Beispielsweise werden bei PAR-1 sowie PAR-2 das C-terminale, zytoplasmatische Ende durch Arrestin phosphoryliert und der gesamte Rezeptor im Anschluss internalisiert [18, 19]. Eine erneute Aktivierung findet nicht statt, vielmehr werden die internalisierten und abgebauten Rezeptoren, wie beispielsweise im Fall von PAR-1 im Fibroblasten, aus einem intrazellulären Pool ersetzt oder sie müssen, wie das Beispiel bei PAR-1 im Megakaryozyt zeigt, direkt neusynthetisiert werden [9, 18].

Die durch die PARs vermittelten zellulären Effekte werden durch verschiedene Faktoren bestimmt:

Abhängig vom Organ, dessen Zelltypen, der organspezifischen Zellstruktur und Funktion zeigen sich Unterschiede in der Dichte an Rezeptoren sowie der Art und Verteilung der vier Subtypen, welche an der Zelloberfläche exprimiert werden.

Über die Kopplung an mehrere G-Proteine werden zellspezifisch unterschiedliche Signalkaskaden in Gang gesetzt, was die Bandbreite an möglichen intrazellulären Effekten vergrößert [9, 20, 21]. Des Weiteren ist die Verteilung und Konzentration der Proteasen bestimmend für die Art und Anzahl der aktivierten Rezeptoren. Hierbei kann auch *ein* Enzym *mehrere* Rezeptoren am N-terminalen Ende spalten [9, 16, 20]. Neben ihrer aktivierenden Funktion sind zudem einige Proteasen in der Lage, durch komplette

Abspaltung der *tethered-ligand*-Sequenz die PARs zu deaktivieren [13]. Die PAR-induzierten Effekte unterliegen aufgrund dieser Vielzahl an Einflussfaktoren einer sehr hohen Varianz. Die genauen Mechanismen hierbei sind daher in vielen Fällen und im Detail noch nicht genau entschlüsselt und Teil der aktuellen Dissertation.

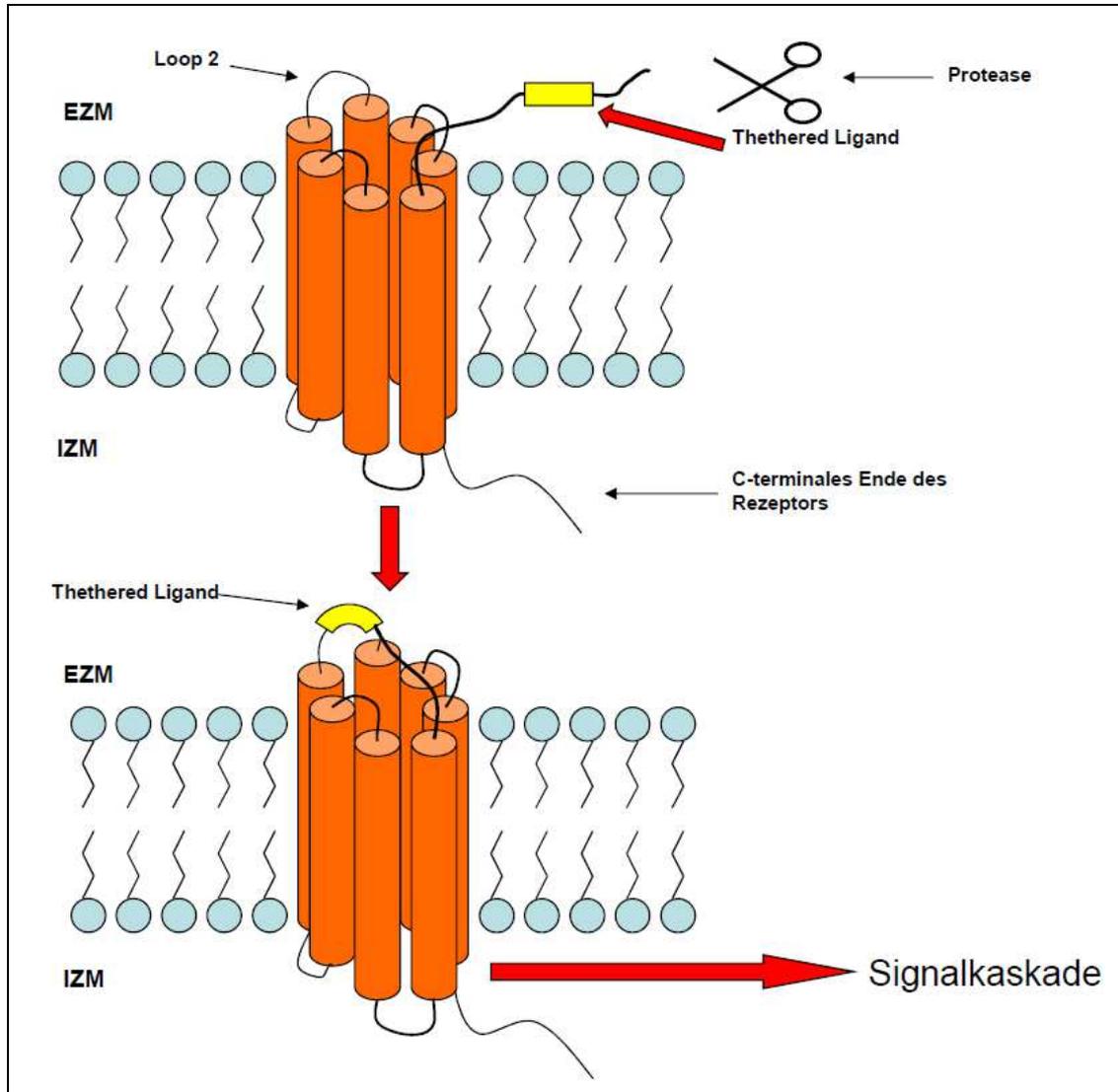


Abbildung 2: Darstellung der Aktivierungsprozesse an einem PAR; Spaltung des *Thethered Ligand* durch eine Protease an der extrazellulären Membran (EZM), Bindung des Liganden an den Loop 2 des Rezeptors, Auslösung einer Signalkaskade an der intrazellulären Membran (IZM); Abb. modifiziert nach R Ramachandran and MD Hollenberg: *Proteinases, signalling and pathophysiology: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more*, *British Journal of Pharmacology* (2008) 153 S263–S282

1.3.2 Physiologie und Pathophysiologie der PARs in der Lunge

Im Respirationstrakt und dem alveolären Kompartiment des Menschen finden sich alle vier PAR-Subtypen, unter anderem in Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Neuronen, Epithel- und Endothelzellen, Mesothelzellen, Becherzellen und Leukozyten.

Die Subtypen finden sich dabei auf den verschiedenen Zelltypen in unterschiedlicher Dichte und Verteilung [17, 22]. Es gibt Hinweise, dass bei verschiedenen pulmonalen Krankheitsbildern eine differentielle Regulation der Expression einzelner PARs in der Lunge stattfindet. Darüber hinaus liegen *in vitro* und *in vivo* Studien vor, die darlegen, dass PAR-induzierte zelluläre Effekte eine pathologische Rolle bei einer Vielzahl inflammatorisch und nicht inflammatorisch-induzierter pulmonaler Krankheitsbilder spielen könnten. Bei der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) und der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie (IPAH) bilden fibrotische Umbauprozesse des Lungenparenchyms bzw. vaskuläres Remodelling Schwerpunkte der Krankheitsentwicklung. Die auf zellulärer Ebene durch die PARs vermittelten Signalkaskaden scheinen dabei eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen.

Die Studienlage hierzu soll im Folgenden kurz vorgestellt werden:

Aktuelle Forschungsdaten bei Patienten mit diffusen parenchymatösen Lungenerkrankungen (DPLD) wie der idiopathischen pulmonalen Fibrose, der Sarkoidose oder auch der exogen allergischen Alveolitis zeigen eine Verschiebung der alveolären hämostatischen Gleichgewichtes zugunsten der prokoagulatorischen Seite. [23–26] Dies wurde in bronchoalveolären Lavagen bzw. Lungenbiopsaten dieser Patienten nachgewiesen. Im Tierexperiment, bei dem Mäusen durch das Antibiotikum Bleomycin eine Lungenfibrose induziert wurde, ist diese erhöhte lokale Gerinnungsaktivität ebenfalls nachweisbar [23, 25, 27]. Es dominiert hierbei insbesondere die Expression von Gewebefaktor, welcher sich mit FVII zu dem TF/FVIIa-Komplex verbindet. Es kommt dadurch zu einer Aktivierung von FX und einer Thrombinerhöhung. Dies führt im Anschluss zu erhöhter Fibrin deposition, welche zusätzlich durch die Inhibition des Enzyms Urokinase, dem wichtigsten Aktivator des Plasmin in der Lunge, durch das Enzym Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) gefördert wird [28]. Extravaskuläre Fibrin(ogen)deposition scheint allerdings zumindest im Tiermodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose nicht essentiell zu sein für die Krankheitsentwicklung: So zeigte sich auch bei Fibrinogen-Knock-out-Mäusen nach Bleomycingabe eine Fibroseentwicklung. [25, 30]. Dies legt nahe, dass weniger die prokoagulatorischen Eigenschaften, sondern fibrinunabhängige, zelluläre, PAR-vermittelte Effekte der aktivierten Gerinnungskaskade zur Pathogenese der Lungenfibrose beitragen könnten.

Bei der IPAH zeigte sich neben erhöhter Vasokonstriktion und einem verstärkten vaskulärem Remodelling ebenfalls eine veränderte Gerinnungsaktivität in Form von erhöhter Thromboseneigung. Für diese Thromboseneigung scheinen zum einen histopathologische Veränderungen der Endothelzellen in den betroffenen Gefäßen verantwortlich zu sein. Zum anderen finden sich Hinweise, dass eine abnormale Thrombozytenfunktion die Entstehung von Thromben bei der IPAH begünstigt [12, 23-25, 29]. Endothelzellen exprimieren zahlreiche prothrombotische und antithrombotische Faktoren, welche das Gleichgewicht der Homöostase in gesunden Geweben aufrechterhalten. Bei IPAH-Patienten fand man jedoch unter anderem eine verstärkte Expression von von-Willebrand Faktor oder auch erhöhte Fibrinopeptid-Level. Daneben wurde weiterhin eine verstärkte Expression des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 beschrieben (PAI-1) [57-59].

All dies führt zu einer Verstärkung der prothrombotischen Prozesse, welche die Thromboseneigung bei Patienten mit IPAH begünstigen könnten. Neben den Veränderungen der Endothelzellen wird bei IPAH-Patienten auch eine veränderte Thrombozytenfunktion beschrieben. Unter anderem fand man erhöhte Werte des, von Thrombozyten exprimierten, Thromboxan-A₂ (TxA₂), welches Vasokonstriktion und Thrombozytenaggregation begünstigt. Daneben wurden erniedrigte Level von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklinen beschrieben, welche antiaggregatorische Eigenschaften besitzen [57, 60, 61]. Zusätzlich werden, bei IPAH-Patienten gemessene, erhöhte Plasmaspiegel an Serotonin als eine weitere Ursache der Thromboseneigung diskutiert. Serotonin wird ebenfalls von Thrombozyten exprimiert und fördert Zellwachstum und -proliferation [12, 29, 40, 57].

Es gibt mittlerweile zahlreiche Hinweise, dass PAR-1 bei der Entwicklung der Lungenfibrose eine Schlüsselrolle einnehmen könnte. PAR-1 findet sich unter anderem auf der Zelloberfläche der humanen Lungenfibroblasten sowie der alveolären Makrophagen. Die Ligandenabspaltung erfolgt durch die Gerinnungsproteasen Thrombin und FXa. PAR-1 stimuliert *in vitro* unter anderem die Fibroblasten-Proliferation sowie die Produktion von Prokollagen und steigert die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten [13, 22, 23, 30]. Im Tierexperiment zeigt sich bei PAR-1 Knock-out-Mäusen, dass diese nach Behandlung eine stark abgeschwächte Form der Fibrose entwickelten, womit eine mögliche Schlüsselrolle des PAR-1 in der Fibroseentwicklung untermauert wird. [13, 22, 23, 30]. Eine aktuelle Studie zeigte auf,

dass die Inhibierung von PAR-1 mittels dem Antagonisten P1pal-12 die profibrotischen Effekte in den Fibroblasten reduzierte [95].

Im Hinblick auf die IPAH scheint PAR-1 eine nicht unwesentliche Rolle bei der durch Thrombin vermittelten Vasokonstriktion pulmonaler Arterien zu spielen. Eine Studie zeigte bei glatten Muskelzellen normaler pulmonaler Arterien von Schweinen, dass bei Aktivierung von PAR-1 über Thrombin ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel und eine erhöhte Calciumsensitivität zu verzeichnen waren, was zu erhöhter Kontraktilität des Gefäßes führte [31]. Eine weitere Studie stellte bei Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie einen Zusammenhang zwischen einer geringen Thrombozytenzahl und daraus resultierender vermehrter PAR-1- und P-selectin-Expression auf der Thrombozytenoberfläche her, was zu vermehrten thrombotischen Komplikationen führte [32]. Weiterhin fand man zusätzlich heraus, dass ein Komplex aus der Metalloprotease (MMP)-1 und PAR-1 im Mausmodell zu einer verstärkten Entdifferenzierung sowie Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen führte [96].

PAR-2 wird durch die Serinproteasen Trypsin, Tryptase und den TF/FVIIa bzw. TF/FVIIa/FXa Komplex aktiviert, nicht jedoch durch Thrombin. Es scheint in der Leber, dem Pankreas und den Nieren an Reparaturmechanismen beteiligt zu sein, die in der Folge von pathologischen Prozessen in fibrotischen Krankheitsbildern münden [12-15, 24]. Diese Erkenntnis diente als Grundlage, um die Rolle von PAR-2 in der Lunge genauer zu studieren. Bisher wurden erhöhte Level an PAR-2 in der Bronchopulmonalen Dysplasie und dem Atemnotsyndrom des Neugeborenen sowie der IPF und der IPAH aufgezeigt [12, 24]. Erhöhte Werte an PAR-2 wurden im Lungenhomogenat von IPF-Patienten in Fibroblasten sowie Myofibroblasten als auch in hyperplastischen Typ-II Pneumozyten gefunden [24]. Bezüglich der IPF zeigte sich eine durch den TF/FVIIa-Komplex gesteigerte, PAR-2 vermittelte, Fibroblastenproliferation sowie eine erhöhte Produktion der extrazellulären Matrixproteine Fibronectin und Osteopontin. Eine erhöhte Fibroblastendifferenzierung zu Myofibroblasten wurde jedoch nicht beobachtet [24]. Weiterhin wurde jüngst veröffentlicht, dass die simultane Inhibierung von PAR-1 und PAR-2 im Mausmodell der Bleomycin-induzierten Fibrose zeigte, dass PAR-2 benötigt wird, um die von PAR-1 induzierten profibrotischen Prozesse zu aktivieren [89]. Andere Studien erbrachten den Nachweis, dass im Tiermodell die Inhibierung von PAR-2 mittels dem PAR-2 Antagonisten P2pal-18S

eine positive Entwicklung auf den Krankheitsverlauf erzielt werden konnte [92, 93]. Die Rolle von PAR-2 ist jedoch kontrovers in der Diskussion, da eine andere Studie an humanem Probenmaterial keine signifikante Steigerung der Expression von PAR-2 nachweisen konnte [94].

In Studien, welche an humanen Lungen von IPAH-Patienten sowie in entsprechenden Tiermodellen durchgeführt wurden, ließ sich eine Rolle des PAR-2 für das Trypsase induzierte vaskuläre Remodelling durch Stimulation der Proliferation und Migration der pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen nachweisen [12, 97]. Weiterhin zeigte sich eine Resistenz von PAR-2-Knock-out Mäusen gegenüber einer Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Im gleichen Tiermodell führte die Applikation eines PAR-2 Antagonisten zur Abschwächung einer bereits manifesten pulmonalen Hypertonie [12].

Die Datenlage zum Subtyp PAR-3 ist zurzeit noch sehr gering. Sowohl die physiologische Funktion als auch die pathophysiologische Bedeutung dieses Rezeptors sind wenig erforscht. Der humane PAR-3 wird über Thrombin und das Enzym Adenomatous-polyposis-coli (APC) aktiviert [54], scheint physiologisch als Cofaktor für die anderen drei PARs zu fungieren und deren Signalwege nach der eigenen Aktivierung zu verstärken [9, 10, 13]. So wurde gezeigt, dass PAR-3 als Cofaktor von PAR-4 bei niedrigen Konzentrationen an Thrombin die Wirkung der PAR-4-getriggerten Signalwege verstärkt [72, 73]. Bei Lungenerkrankungen gibt es Hinweise, dass eine erhöhte PAR-3 Expression eine Rolle in der Pathogenese einiger Krankheiten spielen könnten. So wurde beispielsweise eine erhöhte PAR-3 Konzentration in einem Ratten- Tiermodell an einer durch Endotoxin verursachten, akuten Lungenschädigung gefunden [33].

Subtyp PAR-4 indes wird über zahlreiche Enzyme, darunter Thrombin, Trypsin oder auch FXa, aktiviert [72]. Er wird aktuell im Kontext vaskulärer Erkrankungen am genauesten untersucht. So ist bekannt, dass er im humanen vaskulären System auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert wird und dort bei hohen Thrombinkonzentrationen die Plättchenaggregation verstärkt [9, 10,13, 21]. Zudem scheint er im Rahmen von inflammatorischen Prozessen von zunehmender Bedeutung zu sein [72, 75, 83, 84]. So zeigte sich beispielweise im Mausmodell, dass die über Thrombin-induzierte PAR-4-Aktivierung entscheidend ist für eine Thrombozyten-vermittelte akute Inflammation. [72, 75]. Im Hinblick auf pathophysiologische Eigenschaften von PAR-4 bei pulmonalen Krankheitsbildern ist bisher sehr wenig

bekannt. So wurde unter anderem ein Anstieg der PAR-4-Expression bei akuter Lungenschädigung durch Endotoxin im Rattenmodell beobachtet [33]. Weiterhin vermutet man, dass PAR-4 bei profibrotischen Prozessen zur Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) von alveolaren Epithelzellen beiträgt [14, 34]. Auf der anderen Seite scheint PAR-4 – nach Stimulation in isolierten bronchialen Fibroblasten durch inflammatorische Prozesse – die Expression von PAR-1 im fibrotischen Gewebe zu unterdrücken [14, 35]. Im Mausmodell konnte eine PAR-4 vermittelte Limitierung von Bakterienwachstum im späten Stadium einer Streptokokken- Pneumonie nachgewiesen werden [87].

1.4 Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)

Definition und Epidemiologie

Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) ist eine chronische, progredient verlaufende Erkrankung des Lungenparenchyms in Form einer fibrosierenden interstitiellen Pneumonie [43, 44, 51]. Die IPF gehört zu den sogenannten idiopathischen interstitiellen Pneumonien [43, 51]. Die IPF ist bis heute nicht kurativ therapierbar, die mittlere Überlebensrate nach Diagnosestellung beträgt aktuell zwischen 2 bis 3 Jahren [43, 51]. Als Risikofaktor für das Auftreten der Erkrankung gehört jedoch vor allem eine positive Raucheranamnese [43, 44, 51]. Die Inzidenz schwankt zwischen 4,6 Fällen pro 100000 Einwohnern (Studie aus dem Vereinigten Königreich [45]) und 6,8-16,3 Patienten pro 100000 Einwohnern (Studie aus den USA [46]), wobei sie mit fortschreitendem Lebensalter zunimmt und sich bei Patienten zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr am häufigsten manifestiert. Im Gegensatz dazu sind Patienten unter 50 Lebensjahren äußerst selten. Bei diesen Patientengruppen sollte zunächst primär ein anderes Krankheitsbild oder eine familiäre Form der IPF erwogen werden. Die Prävalenzschätzungen schwanken zwischen 2 bis 29 Fällen pro 100000 Einwohnern [43].

Klinik

Klinische Zeichen der IPF sind unter anderem eine chronische Belastungsdyspnoe und Husten. Während der körperlichen Untersuchung sind bei der Lungenauskultation ein

basal betontes inspiratorisches Knisterrasseln sowie in der Regel bei der Extremitäteninspektion die sogenannten Trommelschlegelfinger festzustellen. Die ersten klinischen Symptome zeigen sich oft lange vor Diagnosestellung. Zumeist erfolgt diese erst bei bereits weit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf [43, 51]. Es gibt individuelle Spontanverläufe der IPF, wobei zum Zeitpunkt der Diagnose der individuelle Spontanverlauf im Einzelfall zu bewerten ist. Der Verlauf der IPF ist in der Regel durch eine progrediente Verschlechterung des Gesundheitszustandes bis zum Tod durch respiratorisches Versagen oder Komplikationen durch Begleiterkrankungen gekennzeichnet. Bei der Mehrheit der Erkrankten zeigt sich eine langsame Progression, bei anderen Patienten wird eine rasche Verschlechterung beobachtet [43, 51]. Besonders gefährdet sind Patienten mit einer akuten Exazerbation der Erkrankung. Dies betrifft 5-20 % der Krankheitsfälle. Hierbei handelt es sich zumeist um Männer mit einer positiven Raucheranamnese [51]. Dabei äußert sich die akute Verschlechterung durch starke Hypoxämie und neu aufgetretene alveoläre Infiltrate [43, 51].

Die Ätiologie der akuten Exazerbation ist per definitionem unbekannt, jedoch muss eine sekundäre Komplikation der Erkrankung wie Infektion, Embolie, Herzinsuffizienz oder ein Pneumothorax zuvor ausgeschlossen werden [43, 51]. Zur Diagnosestellung der IPF ist der Ausschluss einer anderen Form von fibrosierender Lungenerkrankung notwendig. Dies geschieht mittels Anamnese des bisherigen Krankheitsverlaufs, eingehender körperlicher Untersuchung und Bildgebung. Der Goldstandard zur Diagnosesicherung ist die Bildgebung mittels High Resolution Computertomographie (HRCT). Dabei zeigen sich retikuläre Verdichtungen oft im Verbund mit Traktionsbronchiektasen in basalen und peripheren Bereichen der Lunge [43, 51]. Das sogenannte Honigwabennmuster, zystische Lufträume mit einem Durchmesser zwischen 3 bis 10 mm, ist weiterhin kennzeichnend für das Krankheitsbild. Diese pathologischen Veränderungen liegen am häufigsten subpleural.

Nach Ausschluss einer der möglichen Differentialdiagnosen und dem Vorliegen eines typischen HRCT- Bildes kann die Diagnose einer IPF sichergestellt werden. Kann die Diagnosesicherung mittels HRCT nicht eindeutig durchgeführt werden, so ist eine histopathologische Sicherung mittels chirurgischer Lungenbiopsie an 2 bis 3 Lungenlappen zu erwägen. Zudem ist eine multidisziplinäre Diskussion zwischen erfahrenen Pneumologen, Radiologen und Pathologen für eine sichere Diagnosestellung unabdingbar [43].

Histopathologie der IPF

Histopathologisch und radiologisch bietet die IPF zunächst das Bild einer gewöhnlichen interstitiellen Lungenentzündung (engl. usual interstitial pneumonia = UIP) [51]. Hierbei ist zumeist ein heterogenes Erscheinungsbild zu finden. Subpleural und paraseptal gelegene fibrotische Areale mit den charakteristischen honigwabenartigen Veränderungen wechseln sich mit Anteilen normalen und gesunden Lungengewebes ab [44, 47, 51]. Die im HRCT beschriebenen Veränderungen in Form der Honigwaben stellen sich histologisch als mit Schleim und Entzündungszellen gefüllte Lufträume, ausgekleidet mit Bronchiolenepithelen, dar [43, 47, 51]. Entzündliche Prozesse, meist interstitielle Infiltration von Lymphozyten, nehmen eher milde Verläufe und scheinen nicht hauptursächlich für die Krankheitsentstehung zu sein [44, 47, 51]. Bei der IPF vermutet man vielmehr altersbedingte, durch genetische Disposition begünstigte bzw. durch äußere Schädigung hervorgerufene Mikroverletzungen der Epithelgewebe als Ursache der Krankheitsentstehung. Starke Gewebsschädigungen führen dabei zum Zelltod von epithelialen Pneumozyten. In der Folge finden sich hyperplastische und hypertrophe Typ-II Pneumozyten sowie große und verlängerte bzw. schmale Epithelzellen [51]. Diese Veränderungen gehen zudem mit einem deutlichen Verlust von Typ-I Pneumozyten im Vergleich zwischen erkrankten und gesunden alveolären Epithelien einher. Die vermehrte Apoptose von physiologisch regulären Pneumozyten führt zu einer verstärkten Permeabilität der epithelialen Membran, was zur Bildung einer provisorischen epithelialen Matrix, zum Wundverschluss und zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade führt. Diese verstärkte Aktivierung der Gerinnungskaskade fördert die profibrotischen Eigenschaften der entstandenen provisorischen Wundmembran, was wiederum den Abbau des provisorischen Wundverschluss verzögert und die Zellmigration und Transition der alveolären Gewebe steigert [51].

Die in der Folge vermehrt entstandenen hyperplastischen Pneumozyten exprimieren unter anderem verstärkt FX, was in der Folge zur Bildung des TF-FVIIa-FX-Komplex führt, welcher in fibrotischen Regionen die Fibroblastenbildung triggert [51].

Die fibrotischen Regionen imponieren weiterhin durch ein dichtes Kollagengeflecht, wobei sich in kontinuierlichen Abständen konvexe subepitheliale Herde finden lassen, welche sich aus Fibroblasten und Myofibroblasten zusammensetzen. Diese sogenannten Fibroblastenherde finden sich insbesondere auch in der Übergangszone zwischen normalen Lungenparenchym und bereits stark fibrotisierten Lungenanteilen [43, 47,

51]. Die dabei für das Krankheitsbild der Fibrose charakteristischen Myofibroblasten sind in der Lage, große Mengen an extrazellulären Proteinen, vor allem Myofibrillen, zu bilden, und exprimieren dadurch eine große Menge an extrazellulärer Matrix. Diese Depots an extrazellulärer Matrix führen hauptsächlich zu narbigen Veränderungen, aus denen die Zerstörung des Lungengewebes bei IPF-Patienten weitestgehend resultiert [51]. Die Myofibroblasten scheinen bei IPF-Patienten zudem stark resistent gegen Apoptose zu sein.

Aktuell gibt es drei Hypothesen, wodurch sich vermehrt Myofibroblasten aus dem lokalen pulmonalen Gewebe von IPF-Patienten rekrutieren und dadurch eine Fibrose durch Bildung von extrazellulärer Matrix induzieren. Die erste Hypothese besagt, dass Myofibroblasten scheinbar verstärkt aus lokalen Fibroblasten gebildet werden [47, 52]. Zum zweiten scheinen vermehrt Fibrozyten aus dem Blutplasma einzuwandern, aus denen sich die Myofibroblasten im Verlauf herausbilden [52, 76]. Drittens werden Myofibroblasten wohl verstärkt durch EMT des epithelialen Gewebes rekrutiert [47, 52, 56]. Das Schlüsselenzym dieser EMT scheint der transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) zu sein, welches unter anderem verstärkt von den hyperplastischen Typ-II Pneumozyten exprimiert wird [52, 77]. Daneben gibt es neue Forschungsdaten, welche belegen, dass die EMT auch durch FIIa, dem Thrombin, getriggert wird. Hierbei scheint unter anderem die Aktivierung von PAR-1 durch FIIa ein wichtiger Baustein der EMT zu sein [56].

PAR-1 ist nach heutigem Kenntnisstand ein Schlüsselrezeptor für die Entstehung der Fibrose. Dabei kommt ihm unter anderem eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu [22, 30, 56]. Die Bildung von Myofibroblasten aus vorhandenen Fibroblasten scheint insbesondere durch hohen mechanischen Stress, die verstärkte Expression von TGF- β 1 sowie die Anwesenheit spezialisierter Matrix-Proteine gefördert zu werden [51]. Eine Hauptquelle für Mediatoren, welche die Aktivität und Bildung von Fibroblasten steigern bzw. die EMT begünstigen, scheinen die hyperplastischen epithelialen Pneumozyten zu sein. Sie exprimieren unter anderem verstärkt die Mediatoren TGF- β 1 und Endothelin 1, welche die EMT steigern und die Apoptose von Myofibroblasten reduzieren [51]. Zudem exprimieren die veränderten Pneumozyten das Chemokin CXCL 12, welches verstärkt Fibrozyten aus dem Blutplasma rekrutiert. Weiterhin geben Sie den Wachstumsfaktor Platelet-derived growth factor (PDGF) in das interstitielle Gewebe ab, welcher unter anderem die

Proliferation und Aktivität der lokalen Fibroblasten steigert und die Bildung von Myofibroblasten aus den Fibroblasten begünstigt [51]. Man vermutet außerdem weitere histopathologische Prozessewege, die das Entstehen der IPF begünstigen könnten:

Zum einen gibt es Hinweise, dass embryonal angelegte Prozesspfade, die in gesunden Lungengewebe die Reparatur der Gewebe steuern, gestört sein könnten. So fand man in Fibroblasten von IPF-Patienten eine verstärkte Expression von Gremlin 1, einem Antagonisten von TGF- β 1, dessen verstärkte Expression eine Wandlung von Epitel- zu mesenchymalen Zellen begünstigt und Apoptose von Myofibroblasten vermindert [51, 62]. Eine andere Studie zeigte, dass die Phosphatase PTEN (engl. Phosphatase and Tensin homolog) in Myofibroblasten bei IPF-Patienten vermindert exprimiert wird. PTEN reguliert beim Erwachsenen Zellpolarität, Proliferation und Apoptose. Die verminderte Expression von PTEN scheint bei Myofibroblasten die Resistenz vor Apoptose zu erhöhen [51, 63]. Zusätzlich beobachtete man in Lungengewebe von IPF-Patienten eine hohe Expression von MMPs, beispielweise fand man erhöhte Spiegel an MMP-7, MMP-1 und MMP-2 [51, 64]. Die von Myofibroblasten sezernierten MMP-2 und MMP-9 zerstören die Basalmembran der Epithelzellen und fördern die Aktivität von TGF- β 1 [51, 64]. Die Matrix-Metalloproteasen MMP-1 und MMP-7 fördern zudem die Zellmigration und die Proliferation der epithelialen Gewebe [51, 65].

Therapie

Eine kurative Therapie der IPF fehlt bisher. Die bisher gefundenen Therapieansätze zur Behandlung der IPF sind in einem ständigen Wandel begriffen. Die aktuellen Leitlinien der American Thorax Society von 2015 [43] empfehlen die Behandlung mit Pirfenidon (Esbriet®) und dem Tyrosinkinase-Inhibitor Nintedanib [43, 66], welche beide zu einer Abschwächung der Krankheitsprogression führen. Zusätzlich wird eine Therapie mit Antazida wie beispielsweise Protonenpumpen-Inhibitoren (PPI) zur Vermeidung eines gastrointestinalen Refluxes empfohlen [43].

Einige bisher verfolgte Therapieansätze, wie unter anderem die orale Antikoagulation mit einem Cumarinderivat (Marcumar®), die Monotherapie mit N-Acetylcystein [67], die Therapie mit dem selektiven Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Ambrisentan oder dem dualen Endothelin-Rezeptor-Antagonist Bosentan werden von den Leitlinien zum jetzigen Zeitpunkt nicht mehr empfohlen. Viele weitere Substanzen, die in den letzten Jahren in klinischen Studien zur Behandlung der IPF untersucht wurden, erwiesen sich

ebenfalls als unzureichend. Demgegenüber stehen nicht-pharmakologische Therapieansätze wie eine Langzeitsauerstofftherapie oder eine Lungentransplantation [43, 99]. Vor diesem Hintergrund sind neue pathogenetische Erkenntnisse und die hieraus resultierenden neuen Therapieansätze dringend erforderlich.

1.5 Die Idiopathische Pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH)

Die pulmonale Hypertonie ist definiert über einen in der Rechtsherzkatheteruntersuchung (RHK) gemessenen mittleren pulmonal-arteriellen Druck (mPAP) ≥ 25 mmHg [36, 37, 52]. Die Idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie ist eine Ausschlussdiagnose und kann nur gestellt werden, wenn alle bekannten Ursachen einer pulmonalen Hypertonie nicht nachgewiesen werden konnten. Die pulmonale Hypertonie nach aktueller Leitlinie von 2016 [52] weiterhin nach der Nizza-Klassifikation von 2013 (5. Weltkonferenz zur pulmonalen Hypertonie) eingeteilt [52, 53], wie in Tabelle 1 dargestellt.

Die IPAH gehört mit einer Inzidenz von ein bis zwei Erkrankungen pro eine Millionen Einwohner zu den seltenen Erkrankungen. Frauen erkranken doppelt so häufig wie Männer. Sie ist eine fortschreitende, chronische Erkrankung mit einer schlechten Prognose. Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt ca. 3 Jahre, wobei der Tod in Folge einer der zahlreichen Krankheitskomplikationen eintritt. Insbesondere sei hier das sogenannte *Cor pulmonale* erwähnt, eine durch den Lungenhochdruck induzierte Druckbelastung des rechten Ventrikels. Dessen Muskulatur hält der gestiegenen Druck- und Volumenbelastung auf Dauer nicht stand und es kommt final zum letalen Rechtsherzversagen [29, 36, 38, 52].

Klinik und Diagnostik

Diagnosekriterium für eine manifeste IPAH ist ein mittlerer pulmonal-arterieller Druck ≥ 25 mmHg in Ruhe. Die körperlichen Symptome sind recht unspezifisch:

Je nach Ausprägungsgrad der pulmonalen Hypertonie leiden die Patienten unter Belastungsdyspnoe, Leistungsabfall, Müdigkeit, Kreislaufstörungen in Form von Synkopen bzw. einer Angina pectoris-Symptomatik sowie durch den beeinträchtigten venösen Rückfluss bei Rechtsherzbelastung an Beinödemen [1, 36, 52].

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (PH) nach Nizza (2013)

1. Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)

- 1.1 Idiopathische PAH (IPAH)
- 1.2 Hereditäre PAH (HPAH)
 - 1.2.1. BMPR2-Mutationen
 - 1.2.2. ALK1, Endoglin, SMAD9, CAV1, KCNK3-Mutationen
 - 1.2.3 Unbekannte Mutationen
- 1.3 Durch Medikamente oder Toxine verursacht
- 1.4 Assoziiert mit:
 - 1.4.1. Bindegewebserkrankungen
 - 1.4.2 HIV-Infektion
 - 1.4.3 Portaler Hypertension
 - 1.4.4 Angeborenen Herzfehlern
 - 1.4.5 Schistosomiasis

1' Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)

1'' Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen

2. Pulmonale Hypertonie infolge chronischer Linksherzerkrankung

- 2.1 Systolische Dysfunktion
 - 2.2 Diastolische Dysfunktion
 - 2.3 Valvuläre Erkrankungen
 - 2.4 Angeborene/erworbene Linksherzeinfluss-, Linksherzausflussobstruktionen und angeborene Kardiomyopathien
-

3. Pulmonale Hypertonie infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie

- 3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen
 - 3.2 Interstitielle Lungenkrankheiten
 - 3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiv/obstruktivem Muster
 - 3.4 Schlafbezogene Atemstörungen
 - 3.5 Alveoläre Hypoventilationssyndrome
 - 3.6 Chronischer Aufenthalt in großer Höhe
 - 3.7 Fehlentwicklungen
-

4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)

5. Pulmonale Hypertonie mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus

- 5.1 Hämatologische Erkrankungen: chronisch hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
 - 5.2 Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhanszell-Histiozytose, Lymphangioliomyomatose
 - 5.3 Metabolische Störungen: Glykogen-Speicherkrankheiten, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
 - 5.4 Andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen, segmentale PH
-

Abkürzungen: BMPR 2= Bone morphogenetic protein receptor type II; ALK 1= Activin receptor-like kinase 1; SMAD9 = mothers against decapentaplegic homolog 9, CAV1 = Caveolin 1, KCNK3 = potassium channel, subfamily K, member 3 Abb. modifiziert nach [52, 53]

Bei der körperlichen Untersuchung sind unter anderem gestaute Halsvenen, Lebervergrößerung oder auch, aufgrund der mangelnden Perfusion des peripheren Kreislaufes, kühle Körperextremitäten festzustellen [36, 52]. Bei der Auskultation des Herzens können eine akzentuierte Pulmonaliskomponente des II. Herztones, ein systolisches Strömungsgeräusch bei Trikuspidalklappeninsuffizienz und ein Diastolikum bei Pulmonalklappeninsuffizienz imponieren [36, 52]. Eine umfassende internistische Untersuchung ist für eine sichere Diagnosestellung unabdingbar. So sind Zeichen der Rechtsherzbelastung im Elektrokardiogramm, ein vergrößerter rechter Vorhof und Ventrikel sowie erweiterte zentrale Pulmonalarterien im Thoraxröntgen, Zeichen der Hypoxie bei der Blutgasmessung, eine eingeschränkte Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid, sowie erhöhte Werte des natriuretischen Peptid Typ B (BNP) hinweisend. Das wichtigste nicht-invasive Verfahren im Rahmen der Diagnostik einer pulmonalen Hypertonie ist die transthorakale Echokardiographie, die eine Abschätzung des systolischen pulmonal-arteriellen Druckes und der rechtsventrikulären Funktion erlaubt. Daneben werden zum Nachweis bekannter Ursachen einer pulmonalen Hypertonie in der Regel eine Ventilations-/Perfusionsszintigraphie, eine Computertomographie sowie krankheitsspezifische Laboruntersuchungen durchgeführt [36, 52]. Ein Rechtsherzkatheter ist der Goldstandard ist zur finalen Bestätigung der Diagnose. Er ist zur genauen Messung der wichtigsten hämodynamischen Parameter wie des pulmonalarteriellen sowie rechtsarteriellen Druckes und des Herzzeitvolumens notwendig. Zusätzlich ist beim Rechtsherzkatheter bei Verdacht auf eine IPAH eine Vasoreagibilitätstestung durchzuführen, um die Möglichkeit einer Behandlung mit Kalziumantagonisten zu evaluieren [36, 37, 52].

Pathophysiologie der Idiopathischen Pulmonal-arteriellen Hypertonie

Die IPAH ist histopathologisch insbesondere durch Veränderungen des Gefäßsystems gekennzeichnet:

Hier zeigten sich unter geringer lichtmikroskopischer Vergrößerung eine Verdickung aller drei Wandschichten (Intima, Media und Adventitia) der pulmonalen Gefäße. In den Abschnitten der präkapillären Arteriolen ist zudem eine Proliferation der glatten Muskelzellen festzustellen, welche scheinbar auf einer erniedrigten Expression und Aktivität spannungsabhängiger Kaliumkanäle beruht. Diese verringerte Funktion der Kaliumkanäle führt in der Folge durch vermehrte Aktivierung von Calciumkanälen zu

gesteigerter Vasokonstriktion und Verringerung der Apoptose der Muskelzellen [12, 29]. Des Weiteren wird bei der IPAH eine massive Proliferation von Endothelzellen und Fibroblasten beschrieben. Diese führt in Kombination mit der Proliferation der glatten Muskelzellen zu einer zirkulär ausgebildeten Wandverdickung und Verengung des Gefäßlumens. Pathophysiologisch bedeutet dies eine Verringerung des Gefäßquerschnittes, die in der Folge zu einem erhöhten Gefäßinnendruck führt [39, 40]. Im weiteren Verlauf der Krankheit unterziehen sich die Gefäßwände bindegewebigen Umbauprozessen und sklerosieren. Dies bedeutet in der Folge eine verringerte Diffusionskapazität und einen verringerten pulmonalen Gasaustausch [29, 41]. Zudem wird durch das verringerte Gefäßlumen die Wahrscheinlichkeit für thrombotische Komplikationen erhöht, welche das Gefäßsystem zusätzlich okkludieren (in situ-Thrombosierung). Studien zeigen, dass eine chronische Hypoxie, ausgelöst durch eine akute oder chronische Entzündung, einen viralen Infekt, mechanischen Stress und/ oder anderen unbekanntem Faktoren, zum vaskulären Remodelling beitragen kann [29, 39, 40, 42]. Im Zuge dieser Hypoxie wird eine schädigende Akkumulation von zirkulierenden inflammatorischen Zellen und Progenitorzellen, ausgelöst durch eine Erhöhung von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie Interleukin-6 oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), beobachtet [40, 42]. In der Folge erhöhen sich die Konzentrationen von Monozyten, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und Lymphozyten [12, 40, 42]. Sie alle verstärken die vaskuläre Zellproliferation der Fibroblasten, Endothelzellen und der glatten Muskulatur sowie deren Migration und extrazelluläre Kollagendeposition [29, 42]. Eine weitere Studie zeigte zudem, dass Gefäßschäden und endotheliale Dysfunktion zu einer verstärkten Aktivierung von MMPs führte, was eine verstärkte Migration von glatter Muskulatur und deren Proliferation zur Folge hatte [12, 68].

Therapie

Eine kurative Therapie der IPAH konnte bis heute nicht gefunden werden.

Wichtige Ziele der aktuellen Therapieverfahren sind eine Steigerung der Lebensqualität und der körperlichen Belastbarkeit.

Als allgemeine Rehabilitation werden zunächst eine psychologische und soziale Betreuung, ein gezieltes körperliches Training unter Vermeidung von Überbelastung, daneben eine orale Antikoagulation, die Gabe von Diuretika zur Rechtsherzentlastung,

die Überwachung und gegebenenfalls Substitution des Eisenhaushaltes, die Gabe von Sauerstoff bei oxygenatorischer Insuffizienz mit einem Zielsauerstoffpartialdruck von 60 mmHg, sowie jährliche Schutzimpfungen gegen Influenza und Pneumokokken empfohlen [36, 52]. Eine gezielte medikamentöse Therapie erfolgt bei der IPAH mit verschiedenen Wirkstoffen. Zum einen wird die Gabe eines Kalziumantagonisten bei Patienten mit positiver Vasoreagibilitätstestung empfohlen, in der Regel der Wirkstoff Amlodipin. Daneben besteht die Möglichkeit der Behandlung mit PAH-sensitiven Medikamenten, die an drei verschiedenen Signalwegen (Endothelin, NO-lösliche Guanylatzyklase, Prostazyklin) angreifen, zur Verfügung. Zu den Endothelinrezeptor-Antagonisten gehören Ambrisentan, Macitentan und Bosentan. Weiterhin ist die Gabe der Phosphodiesterase-5-Inhibitoren Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil, oder des Stimulans der löslichen Guanylatzyklase (sGC) Riociguat, eine Behandlungsoption. Zusätzlich werden die Prostazyklin-Analoga (Prostanoide) Epoprostenol (intravenös) Iloprost (inhalativ/ intravenös) und Teprostinil (inhalativ/ subkutan/ intravenös) zur Therapie der IPAH genutzt [37, 41,52]. Schließlich steht seit 2015 der Prostazyklin-IP-Rezeptor-Agonist Selexipag zur oralen Anwendung zur Verfügung.

Eine Kombination all dieser Medikamente ist bei schwerer Erkrankungsform und inadäquater Ansprache auf eine Monotherapie indiziert [37, 52]. Die Ballonseptostomie zur Anlage einer interatrialen Rechts-links-Shunts zur Rechtsherzentlastung wird bei palliativen Patienten in speziellen Zentren durchgeführt [52]. Als Ultima ratio kommt die Lungentransplantation in Betracht [36, 52].

1.6 Fragestellung

Sowohl bei der IPAH als auch bei der IPF wird angenommen, dass eine exzessive Gerinnungsaktivierung in der Lunge zur Pathogenese der Krankheitsbilder beiträgt.

Bestandteil dieser Gerinnungsentgleisung ist eine Erhöhung der an der Gerinnung beteiligten Proteasen, insbesondere des Thrombin, welches als Hauptaktivator von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 gilt.

Somit muss auch eine mögliche Beteiligung der PARs und ihrer zahlreichen Signalkaskaden in der Pathogenese der IPF und IPAH in Betracht gezogen werden.

Entsprechende Daten für PAR-1 und PAR-2 liegen bereits vor.

Über eine mögliche differentielle Regulation der Expression von PAR-3 und der pathogenetischen Rolle von PAR-4 gibt es bisher keine Untersuchungen.

Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- Sind PAR-3 und PAR-4 in den Lungen von IPAH und IPF-Patienten differentiell exprimiert als im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen?
- Welche zellulären Lokalisationen weisen PAR-3 und PAR-4 in den Lungen von IPF- und IPAH-Patienten auf?
- Weisen PAR-3 und PAR-4 in den Lungen entsprechender Tiermodelle (Bleomycin induzierte Fibrose & durch Hypoxie ausgelöste pulmonale Hypertonie bei Mäusen) eine differentielle Expression im Vergleich zu Kontrollen auf?
- Welche zellulären Lokalisationen weisen PAR-3 und PAR-4 in den Lungen der Tiermodelle auf?
- Gibt es in den oben genannten Tiermodellen Unterschiede in der Expression von PAR-3 und PAR-4 in verschiedenen Krankheitsstadien?

2 Materialien und Methoden

2.1 Humanes Probenmaterial

Alle Untersuchungen an humanen Probenmaterialien wurden entsprechend der Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die Ethikkommission des hiesigen Fachbereiches bewilligt. Eine Einwilligungserklärung (Informed consent) wurde von den Patienten bzw. deren nächsten Angehörigen eingeholt.

Es stand Probenmaterial zur Verfügung, welches nach einer Lungentransplantation aus dem Explantat entsprechender Patienten und Spenderlungen (= Kontrollen), die z.B. aufgrund einer früheren Inkompatibilität nicht verwendet wurden, gewonnen wurde. Die Transplantationen fanden in der Abteilung für Kardio-Thoraxchirurgie der medizinischen Hochschule Wien (Direktor der Klinik: Prof. Dr. W. Klepetko) statt. Eine histopathologische Untersuchung der Spenderlungen schloss pathologische Prozesse wie übermäßige inflammatorische Reaktionen aus.

Die ELISA-Untersuchungen wurden an Plasmaproben durchgeführt, welche erkrankten Patienten sowie entsprechenden Kontrollen mittels peripherer venöser Punktion entnommen wurden. Diese Blutproben wurden direkt nach Entnahme für 20 Minuten bei 4000 g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein Probengefäß pipettiert und bei -80°C gelagert.

2.2 Eigenschaften der Patientenkohorten

Die individuellen und demographischen Eigenschaften der Patienten und Kontrollen, deren Daten in dieser Arbeit herangezogen wurden, werden in den Tabellen 2 bis 7 dargestellt. Die Diagnose der IPF erfolgte auf der Basis klinischer Untersuchungen bzw. dem histopathologischen Nachweis einer UIP-Musters entsprechend aktueller evidenzbasierender Leitlinien zur Diagnostik und zum Management der IPF [43]. Die Diagnose der IPAH erfolgte aufgrund von klinischen Untersuchungen mittels transthorakaler Echokardiographie und Rechtsherzkatheters entsprechend der aktuellen Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung der pulmonalen Hypertonie aus dem Jahre 2015 [52]. Tabelle 2 zeigt die vorliegenden Daten der Kontrollgruppe (Organspender), bei denen pathologische Prozesse mittels histopathologischer Untersuchung ausgeschlossen wurden.

Tabelle 2: Klinische und demographische Charakteristika der Kontrolle (Organspender)

Variable	
Anzahl, n	8
Alter (Jahre)	38,25 +/- 11, 3
Geschlecht (männlich/ weiblich), n/n	5/3

Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben

In Tabelle 3 finden sich die Daten der Kontrollgruppe für die experimentellen Untersuchungen mittels ELISA. Dabei wurden Probanden mittels peripherer venöser Punktion Blutproben entnommen.

Tabelle 3: Klinische und demographische Charakteristika der Kontrolle (Blutspender)

Variable	
Anzahl, n	21
Alter (Jahre)	35,04 +/- 11, 25
Geschlecht (männlich/ weiblich), n/n	9/12

Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben

In Tabelle 4 werden die klinischen und demographischen Charakteristika der verwendeten Lungenproben der IPF-Patienten dargestellt. Die Messung der forcierten expiratorischen Vitalkapazität (FVC) erfolgte mittels Lungenfunktionsprüfung, die Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität wurde durch einen Diffusionskapazitäts-Test nach den entsprechenden Leitlinien erhoben [43]. Das Vorliegen einer UIP wurde durch histopathologische Untersuchungen verifiziert.

Tabelle 4: Klinische und demographische Charakteristika der IPF-Patienten (Organspender)

Variable	
Anzahl, n	21
Alter (Jahre)	56, 71 +/- 8,89
Geschlecht (männlich/ weiblich), n/n	13/8
Raucherstatus (niemals/ehemals/ aktuell), n/n/n	4/17/0
¹ FVC [% Soll]	52,65 +/- 10,15
² DLCO [% Soll]	29,79 +/- 13,19
Histologische Bestätigung einer ³ UIP (%)	95, 2

Abk.: ¹FVC, forcierte expiratorische Vitalkapazität; ²DLCO, Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität; ³UIP, histologische Sicherung als Usual Interstitial Pneumonia; Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben

Tabelle 5 stellt die klinischen und demografischen Charakteristika der IPAH-Patienten dar, welchen Lungenproben entnommen wurden. Dabei erfolgten die Messungen des pulmonalen Mitteldruckes mittels Rechtsherzkatheter sowie die echokardiographische Einteilung der Herzinsuffizienz nach Kriterien der New York Heart Association [52].

Tabelle 5: Klinische und demografische Charakteristika der IPAH-Patienten (Organspender)

Variable	
Anzahl, n	17
Alter (Jahre)	32,47 +/- 11, 04
Geschlecht (männlich/ weiblich), n/n	8/9
¹ mPAP [mmHg]	79,09 +/- 28,85
² NYHA Klassifikation (I-II/ III-IV), n/n	1/16

Abk.: ¹mPAP, mittlerer pulmonal arterieller Druck; ²NYHA, New York Heart Association; Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben

Tabelle 6 stellt die klinischen und demographischen Eigenschaften der Plasmaproben der IPAH-Patienten dar. Dabei finden sich Angaben zum mittleren pulmonal arteriellen Druck, dem Herzindex sowie dem pulmonalen Gefäßwiderstand (PVR), welche alle mittels Swan-Ganz-Katheters während einer Herzkatheter-Untersuchung ermittelt wurden. Die Einteilung der Herzinsuffizienz erfolgte zudem über die Kriterien der New York Heart Association [52].

Tabelle 6: Klinische und demografische Charakteristika der IPAH-Patienten (Blutspender)

Variable	
Anzahl, n	21
Alter (Jahre)	40,57 +/- 12,0
Geschlecht (männlich/ weiblich), n/n	9/12
¹ mPAP (mmHg)	61,76 +/- 16,92
² PVR (dyn*s*cm ⁻⁵)	1220,43 +/- 558,89
³ CI (l*min ⁻¹ *m ⁻²)	2,16 +/- 0,55
⁴ NYHA Klassifikation III-IV (%)	100

Abk.: ¹mPAP, mittlerer pulmonal arterieller Druck; ²PVR, pulmonaler Gefäßwiderstand (engl. pulmonary vascular resistance); ³CI, Herzindex (engl. cardiac index); ⁴NYHA, New York Heart Association; Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben

2.3 Probenmaterial der Tiermodelle

Alle Experimente mit tierischem Probenmaterial wurden unter Einhaltung internationaler und nationaler Richtlinien zur Durchführung von Tierexperimenten und nach Bewilligung durch die lokale Behördenaufsicht vorgenommen.

Hierbei wurde zur Untersuchung der Lungenfibrose bei acht Wochen alten Mäusen (C57BL/6J) unter Verwendung von 5U/kg Körpergewicht Bleomycin (Almirall Prodesfarma, Barcelona, Spanien) eine Lungenfibrose ausgelöst [56]. Die Medikamentengabe erfolgte als Aerosol intratracheal mittels Mikrosprayer (Penn-Century Inc., Philadelphia, PA, USA). Eine Kontrollgruppe aus Tieren gleichen Geschlechts und Alters erhielt 0,9 % Natriumchloridlösung mittels identischer Verabreichungsform. Die Tiere wurden nach 7, 10, 14 und 21 Tagen durch eine letale Dosis Phenobarbital getötet. Das Lungenmaterial wurde entnommen und bei – 80°C gelagert.

Zur Untersuchung der pulmonalen Hypertonie wurde das Hypoxie-Modell der pulmonalen Hypertonie eingesetzt [12, 69]. Dabei wurde acht bis zehn Wochen alten Mäuse (C57Bl/6J) (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) 24 Stunden bzw. 21 Tage in einer Hypoxiekammer (10 % Sauerstoff) gehalten. Diese Tiere wurden nach dem jeweiligen Zeitraum getötet. Das Probenmaterial der Vergleichsgruppe wurde Mäusen gleichen Geschlechts und Alters entnommen. Alle gewonnenen Lungengewebe wurden nach Entnahme bei – 80°C gelagert.

2.4 Isolierung pulmonaler Fibroblasten

Zur Isolierung pulmonaler Fibroblasten aus den humanen Lungenproben sowie den präparierten Mauslungen wurde das Lungenparenchym in Teilstücke von einer Größe < 1 mm³ zerkleinert. Diese Stücke wurden zweimal mit PBS (137 mM NaCl, 1,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Lungenproben, bei feuchter Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid (CO₂) -Gehalt und bei 37°C, in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), welches mit 10 % fetalem Kälberserum (HyClone, South Logan, UT, USA) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplementiert wurde. Die Reinheit der isolierten Fibroblasten wurde durch

positives Anfärben von Vimentin, Fibronectin und Kollagen IV sowie durch negatives Anfärben von Pro-surfactant Protein C (proSP-C) und von vWF bestätigt [70].

2.5 Isolierung von Typ-II Pneumozyten

Zur Isolierung der murinen Typ-II Pneumozyten wurden die freipräparierten Mauslungen über die Pulmonalarterie mit 10 ml 0,9 % Natriumchloridlösung perfundiert und mit Dispase verdaut. Danach wurden die Lungenproben zerkleinert, nacheinander durch 70-, 40- und 10 µm große Nylonmaschen gefiltert und nachfolgend bei 130 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das dadurch gewonnene Pellet wurde in DMEM aufbewahrt. Danach erfolgte eine negative Selektion auf Petrischalen für 30 Minuten bei 37°C, welche mit den Fc-Rezeptoren CD 16/32-, CD31- und CD45- (jeweils Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) bedeckt waren. Die Reinheit und Lebensfähigkeit der gewonnenen Zellen wurde direkt im Anschluss analysiert. Die Reinheit der isolierten Typ-II Pneumozyten wurde durch positives Anfärben von proSP-C und negatives Anfärben von Fibronectin und Vimentin bestätigt. Die Testung auf Lebensfähigkeit erfolgte mittels Ausschluss durch Typanblau. Die bei dieser Arbeit verwendeten Typ-II Pneumozyten zeigten eine durchgehende Reinheit von 90 % und eine Lebensfähigkeit von mehr als 97 %. Die Zellen wurden in DMEM verwahrt, mit 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) -ethansulfonsäure, 2mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin (jeweils Biochrom, Berlin, Deutschland) und 10 % fetalem Rinderserum (Thermo Scientific, Erlangen, Deutschland) versetzt und bei einer feuchten Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 % gelagert [56].

Die humanen Typ-II Pneumozyten wurden aus Lungenproben extrahiert, welche in der Abteilung für Kardio-Thoraxchirurgie der medizinischen Hochschule Wien (Direktor der Klinik: Prof. Dr. W. Klepetko) entnommen wurden. Das Probenmaterial (1 mg/25 ml) wurde für 45 Minuten bei 37°C in Minimum Essential Medium (Thermo Scientific) unter Zugabe von Trypsin (1 mg/ml), Kollagenase I (0,5 mg/ml), Kollagenase IA (0,5 mg/ml) und DNase I (20 µg/ml) (jeweils Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gerührt. Im Anschluss wurde das Probenmaterial viermal durch ein Mulltuch gefiltert und in drei aufeinanderfolgenden zehninütigen Verdichtungsschritten die

Pneumozyten von den Fibroblasten getrennt. Die Epithelzellen wurden weiterhin bei 1000 g für fünf Minuten zentrifugiert und der Niederschlag in Waymouth's Medium (Thermo Scientific) gegeben [71].

2.6 Western Blot- Gelelektrophorese

Die zu untersuchenden Lungengewebe, welche bei -80°C lagerten, wurden manuell unter Zuhilfenahme von flüssigem Stickstoff (Linde Gas Deutschland, Pullach, Deutschland) gemörsert und mit 200 µl des Lysepuffers (15 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1 % Triton X-100, 1 % Desoxycholsäure, 0,1 % Natriumlaurylsulfat (SDS), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, Protease Inhibitor Cocktail (Complete Mini; Roche, Mannheim, Deutschland)) versetzt. Danach wurden die Proben 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 4°C und 1000 g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde abpipettiert und die Konzentration der Proben mittels des Pierce BCA Protein Assay KIT (Thermo Scientific) photometrisch in dem EL808i-Mikrotiterlesegerät (Bio-TEK Instruments, Winooski, VT, USA) bei einer Wellenlänge von 402 nm ermittelt. Nun wurden 10 µg Protein jeweils in einem Reaktionsgefäß bei 95°C für zehn Minuten unter Zugabe von 5 µl Ladepuffer (60 mM Tris-Cl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 5 % β-Mercaptoethanol, 0,01 % Bromophenol Blau) denaturiert. Die denaturierten Proteine wurden mittels eines 10 % SDS-Polyacrylamid-Gels elektrophoretisch bei einer Stromspannung von 100 Volt mithilfe des Bio-RAD Power PAC 1000 (Bio- RAD, Hercules, CA, USA) in Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1 % SDS) aufgetrennt. Nun erfolgte der Transfer der Proteine auf die Amershaun-Hybond-P-PVDF-Membran (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) mittels Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 10 % Methanol) für eine Stunde bei 100 mA. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch 5 % Magermilch in TBS-T (25 mM Tris-Cl, pH 7,5, 150 mM NaCl mit Zusatz von 0,1 % Tween 20) bei Raumtemperatur für 60 Minuten blockiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C.

Folgende primäre Antikörper fanden hierbei Verwendung:

Kaninchen anti-PAR-3 (Klonnr.: H-103, Katalognr.: sc-5598; Verdünnung 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Kaninchen anti-PAR-4 (Klonnr.: H-120, Katalognr.: sc-25466; Verdünnung 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), Maus anti- β -Aktin (Klonnr.: AC-15, Katalognr.: A1978; Verdünnung 1: 10000, Sigma-Aldrich), Kaninchen anti-FVII (Klonnr.: M-19, Katalognr.: sc-16347; Verdünnung 1:200, Santa Cruz Biotechnology), Maus anti-human FVII (Klonnr.: IIH2, Katalognr.: REF 2282; Verdünnung: 1:200, American Diagnostic Inc., Stanford, CT, USA), Kaninchen anti-FX (Klonnr.: H120, Katalognr.: sc-20673; Verdünnung 1:200, Santa Cruz Biotechnology), Maus anti-human FX (Klonnr.: 156106, Katalognr.: MAB1063; Verdünnung: 1:200, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Dako, Gostrup, Dänemark) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Mittels des ECL Plus WB Detection Systems (GE Healthcare) erfolgte nun die Visualisierung der gesuchten Proteine auf Amershaun Hyperfilm ECL High performance chemieluminescence Film (GE Healthcare). Nach einem einstündigen Ablösen der Membran mit dem Stripping-Puffer (0,1 M Glyzin, 0,1 M HCl pH 2,5-3,0) und einer anschließenden erneuten Blockade mit 5 % Magermilch in TBS-T über 90 Minuten. Zur densitometrischen Quantifizierung des Bandensignals wurde die Lab Image 1D-Software (Kapelan Bio-Imaging GmbH, Leipzig, Deutschland) verwendet.

2.7 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Hierzu wurde der AssayMax Human Factor VII ELISA-Kit sowie der AssayMax Human Factor X ELISA-Kit (beide von AssayPro, St. Charles, MO, USA) verwendet.

Bei der hier verwendeten Sandwich-Technik des ELISA wurden 50 μ l jeder Probe in eine Probenflasche einer 96 Well-Mikrotiterplatte gegeben. In diesen Wells befanden sich fest gebundene Antikörper spezifisch für das gesuchte Antigen, welches sich an diese stationäre Phase band. Nach einer zweistündigen Inkubationsphase wurde das nicht gebundene Material durch fünfmaliges Waschen mit 200 μ l Waschlösung entfernt und die Probe mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser, mit Biotin versetzte Antikörper band an einem anderen Epitop des gesuchten Antigens. Nach einer Stunde Inkubationszeit auf einem Schüttler und einem anschließenden erneuten fünfmaligem

Waschvorgang mit 200 µl Waschlösung wurde 50 µl Streptavidin-Peroxidase zu jeder Probe gegeben. Dieses wurde über das Biotin an den Sekundärantikörper gebunden. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurden die nicht gebundene Streptavidin-Peroxidase wieder durch fünfmaliges Waschen mit 200 µl Waschlösung entfernt. Schließlich erfolgte die Inkubation mit 50 µl des Chromogenen-Substrates, welches von dem Streptavidin-Peroxidase-Enzym umgesetzt wurde. Dabei erfolgte eine bläuliche Färbung der Proben. Diese Reaktion wurde nach 10 Minuten durch die Stop-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von Blau nach Gelb erfolgte. Nun wurde die Intensität der entstandenen Farbreaktion bei 450 nm im EL808i-Mikrotiterplatten-Lesegerät (Bio-TEK Instruments, Winooski, VT, USA) photometrisch bestimmt. Zusätzlich zu den gewünschten Proben wurde eine Standardlösung des gesuchten Antigens in einer Konzentrationsreihe (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 ng/ml) auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Anhand dieser Standardkurve wurden die genauen Konzentrationen in den Proben ermittelt.

2.8 Immunhistochemie

Für die gesamten immunhistochemischen Färbungen wurde das Zytochem-Plus AP Polymer-Kit der Firma Zytomed Systems (Berlin, Deutschland) verwendet.

Die in Paraffin eingebetteten, 5 µm dicken Mikroschnitte der Lungengewebe wurden nach Erwärmung auf 60°C zunächst in Xylol entparaffiniert und einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dazu wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten in ein Xylolbad, daraufhin jeweils 5 Minuten in die absteigende Alkoholreihe, bestehend aus Ethanol 99,6 %, Ethanol 96 %, Ethanol 70 % und Ethanol 50 %, getaucht. Danach folgte ein dreimaliges Waschen der Schnitte mit PBS. Im Anschluss erfolgte die Antigendemaskierung der Gewebeschnitte durch Fast-Enzyme (Zytomed Systems) für 5 Minuten, in der Folge wiederum dreimaliges Waschen mit PBS und anschließend wurde mittels Blocking Solution (Zytomed Systems) mit 1-2 Tropfen pro Schnitt für 5 Minuten geblockt. Danach folgte ein einmaliges Waschen der Schnitte mit PBS. Nun erfolgt die Inkubation mit 100 µl des Primärantikörpers in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Es wurden folgende Primärantikörper verwendet:

Kaninchen anti-PAR-3 (Klonnr.: H-103, Katalognr.: sc-5598; Verdünnung 1:50, Fa. Santa Cruz Biotechnology), Kaninchen anti-PAR-4 (Klonnr.: H-120, Katalognr.: sc-25466; Verdünnung 1:50, Santa Cruz Biotechnology), Kaninchen anti-human-proSP-C (Klonnr.: Q8IWL2, Katalognr.: AB3424; Verdünnung 1:50, Chemicon International, Temecula, CA, USA), Maus anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) (Klonnr.: P62736, Katalognr.: CBL171; Verdünnung 1:50, Chemicon International)

Am darauffolgenden Tag erfolgte, nach vorherigem dreimaligem Waschen der Schnitte mit PBS, die Inkubation mit PostBlock-Lösung (Zytomed Systems) für 20 Minuten, um eine Signalverstärkung zu erzielen; danach erneutes dreimaliges Waschen der Schnitte mit PBS. Im weiteren Verlauf erfolgte die Zugabe von 1-2 Tropfen des Alkalischen-Phosphatase Polymer (Zytomed Systems) für 30 Minuten. Dieses Polymer ist ein Mix aus Sekundärantikörpern, welche mit Alkalischer Phosphatase (AP) gebunden sind und den Primärantikörper im Gewebe detektieren können. Es folgte wiederum ein dreimaliges Waschen mit PBS. Im nächsten Schritt wurden 2,5 ml des Permanent Substrat AP RED Puffers (Zytomed Systems) mit einem Tropfen Chromogen (Zytomed Systems) vermischt und jeweils 100 μ l dieser Lösung auf jeweils einen Schnitt pipettiert. Hierbei reagierte nun die Alkalische Phosphatase mit dem Chromogen und eine rötliche Färbung, bedingt durch das entstandene Reaktionsprodukt, wurde sichtbar. Diesen Färbeprozess verfolgte man unter dem Mikroskop und stoppte ihn bei geeigneter Färbung durch Eintauchen der Schnitte in doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O). Mit einer Hämalunlösung nach Mayer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Schnitte für zwei Minuten gegengefärbt und wiederum kurz in ddH₂O getaucht. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen und danach nochmals für 2-5 Sekunden in ddH₂O getaucht. Nun folgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe, bestehend aus Ethanol 50 % (Inkubationszeit: 30 Sekunden), Ethanol 70 % (Inkubationszeit: 30 Sekunden), Ethanol 96 % (Inkubationszeit 30 Sekunden), Ethanol 99,6 % (Inkubationszeit: 1 Minute) und Xylol (Inkubationszeit: 2-5 Minuten). Die entwässerten Schnitte wurden direkt im Anschluss mit dem Roti Histokit II (Roth) und einem Deckglas fixiert. Die digitale Weiterbearbeitung erfolgte am Mirax-Desk-Digital Slide-Scanner (Zeiss, Jena, Deutschland) mithilfe der MiraxMicroimaging-Software, Version:1.12 (Zeiss).

2.9 Realtime- Polymerasekettenreaktion (qPCR)

2.9.1 Isolierung der RNA

Die RNA der verwendeten humanen sowie murinen Lungenproben wurden mittels dem PeqGOLD Total RNA Kit (Peqlab, Erlangen, Deutschland) isoliert. Dazu wurden zuerst 50 – 100 mg des gewünschten Lungenhomogenats in einem Kryostaten (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) durch 40 bis 50 Kryoschnitte, abhängig von der Probengröße, entnommen und in einem Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Im zweiten Schritt wurden die Gewebeschnitte mit 500 µl TriFast™ (Peqlab) versehen und mit einer Injektionsnadel auf Eis homogenisiert. Während einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde das Homogenat kontinuierlich mit einem Reagenzglasschüttler gemischt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich) pro ml TriFast™ in das Homogenat, welches im Anschluss 15 Sekunden geschüttelt und weiterhin 10 min bei 4°C inkubiert wurde. Nach einer anschließenden Zentrifugation in einer Combi Spin-Zentrifuge (Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland) für 15 Minuten bei 4°C und 14000 g wurde die obere Phase abgenommen. Eine äquivalente Menge 70 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde mit dem Homogenat daraufhin in einem neuen Reaktionsgefäß gemischt und auf die Säule des PeqGOLD Total RNA Kit (Peqlab) transferiert. Das weitere Protokoll entsprach den Angaben im Handbuch des PeqGOLD Total RNA Kit. Die so erhaltene RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser gesammelt, die Konzentrationen der Proben mittels NanoDrop (ND- 1000; Kisker-Biotech) gemessen und im Anschluss bei -80°C gelagert.

2.9.2 Synthese der cDNA

Für die Synthese der cDNA wurden 200 ng/µl RNA mit Hilfe des iScript cDNA Synthese Kits (Biorad, Hercules, CA, USA) nach Herstellerprotokoll durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden folgende Komponenten in einem Gesamtvolumen von 10 µl zusammenpipettiert (Tabelle 7):

Tabelle 7: Komponenten zur c-DNA Synthese

Reagenzien	Volumen (μl)
Reverse Transkriptase Buffer (10x)	2,0
dNTP Mix (100 mM)	0,8
Random Primers (25 mM)	2,0
Reverse Transkriptase (50 U/ μl)	1,0
RNase Inhibitor (20 U/ μl)	1,0
Nuklease-freies Wasser	3,2
Total	10,0

Zu diesem Mastermix wurden 10 μl der RNA-Probe gegeben. Für die nun folgende cDNA-Synthese wurde ein TPersonal Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) verwendet und folgende Reaktionsbedingungen festgelegt: 5 Minuten bei 25°C, 30 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 85°C.

Die erhaltene cDNA wurde bei – 20°C gelagert.

2.9.3 Realtime- Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation der gewünschten cDNA Sequenzen erfolgte in dem ABI 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Freiburg, Deutschland). Mithilfe des Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde nach Herstellerangaben die PCR-Reaktion mit folgenden Komponenten durchgeführt (Tabelle 8):

Tabelle 8: Komponenten zur qPCR

Reagenzien	Volumen (μl)
Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix	13,0
Nuklease-freies Wasser	8,0
MgCl ₂ (50 mM)	1,0
Vorwärts Primer (100 nmol/ μl)	0,5
Rückwärts Primer (100 nmol/ μl)	0,5
cDNA	2,0
Total	25,0

Als Negativkontrolle diente eine Probe, welche sämtliche oben genannten Komponenten, jedoch ohne Zugabe von cDNA, enthielt.

Dabei wurde folgendes Temperaturprofil programmiert und bei der Vervielfältigung der cDNA verwendet: 6 Minuten bei 95°C, [5 Sekunden bei 96°C, 5 Sekunden bei 59°C und 10 Sekunden bei 72°C] x 45. Nach Feststellung der Spezifität des Amplifizierungsproduktes anhand der Schmelzkurve, wurde der ΔC_t Wert für jedes Gen anhand folgender Formel berechnet:

$$\Delta C_t = C_t \text{ Referenzgen} - C_t \text{ Zielgen.}$$

Als Referenzgen diente bei allen humanen und murinen Zielgenen die humane bzw. murine Porphobilinogen-Deaminase (PBGD). Die bei der qPCR verwendeten Vorwärts- und Rückwärts-Primerpaare (jeweils von Metabion Int. AG, Martinsried, Deutschland) sind in Tabelle 9 aufgeführt. Durch eine Gelelektrophorese und der Analyse der entstandenen Schmelzkurve konnte die exklusive Amplifikation des erwarteten Genprodukts festgestellt werden. Das Genprodukt wurde in einer Verdünnungsstufe von 1:1, 1:10 und 1:100 anhand einer Standardkurve auf seine Effizienz mittels qPCR getestet. Die Effizienz der Zielgene sollte hierbei mit der Effizienz der Referenzgene übereinstimmen, damit die Analyse gültig wurde.

2.10 Statistik

Die statistische Auswertung der gewonnenen Datensätze erfolgte in GraphPad (Graphpad Software). Die Experimentaldaten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt.

Die humanen und murinen Daten wurden als Mittelwert und interquartilen Intervallen nach dem Tukey- Test errechnet und graphisch als Boxen dargestellt. Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Gruppen wurden mittels T- Test oder Mann-Whitney-U-Test berechnet, je nach Spezifikation der Datensätze. Mehr als 2 Gruppen wurden mittels Varianzanalyse (engl. ANOVA) errechnet. Alle Testungen folgten ungerichteten Hypothesen. Die statistische Signifikanz wurde bei 5 % angesetzt.

Tabelle 9: Verwendete Primersequenzen

¹ m ² PBGD-TM2	Accession-Nr.: NM_013551.2	³ FP: 5`- GGT ACA AGG CTT TCA GCA TCG C- 3` ⁴ RP: 5`- ATG TCC GGT AAC GGC GGC- 3`
mFVII	Accession-Nr.: NM_010172.4	FP: 5`- CCT CGA ATC CAT GTC AGA ACG - 3` RP: 5`- TGA TTT GCA CAG ATC AGC TGC - 3`
mFX	Accession-Nr.: NM_001242368.1	FP: 5`- TGG CAA GTC TTG CAT CTC CA - 3` RP: 5`- GTC GCT GGT GTT TAG GGC - 3`
mPAR-3	Accession-Nr.: NM_010170.4	FP: 5`-AAATCCTTATCTTGGTTGCAGCTG-3` RP: 5`-GGCTTTGCTGAGTTGTCTGAAAC-3`
mPAR-4	Accession-Nr.: NM_007975.3	FP: 5`- ACC CCC AGC ATC TAC GAT GA - 3` RP: 5`- GAG GAC TTC GGC TCC TTG AGT - 3`
⁵ huFVII	Accession-Nr.: NM_019616.3	FP: 5`- CAT GGC AGG TCC TGT TGT - 3` RP: 5`- AGC ACC CCG ATC AGG TTC - 3`
huFX	Accession-Nr.: NM_001312675.1	FP: 5`- GAG GCC AGG AAT GCA AGG A - 3` RP: 5`- GCT CAG AAT GGT TCC ACC ACA - 3`
huPBGD	Accession-Nr.: NM_000190.3	FP: 5`- CCC ACG CGA ATC ACT CTC AT - 3` RP: 5`- TGT CTG GTA ACG GCA ATG CG - 3`
huPAR-3	Accession-Nr.: NM_004101.3	FP: 5`- GCA GCT GCT GGC CTC CT- 3` RP: 5`- GCT CCA CGA AAG GTC TTA ATG G - 3`
huPAR-4	Accession-Nr.: NM_003950.2	FP: 5`- CCC AGC GTC TAC GAC GAG AG - 3` RP: 5`- GCA CAG ACT TGG CCT GGG TA - 3`

Abkürzungen: ¹m, mouse; ²PBGD, Porphobilinogen Deaminase; ³FP, Vorwärts (engl. Forward) Primer; ⁴RP, Rückwärts (engl. Reverse) Primer; ⁵hu, human

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der PAR-3 und PAR-4-Expression in den Lungen von IPF-Patienten

3.1.1 PAR-3 ist in den Lungengeweben von IPF-Patienten erhöht

Die Auswertung der Expression von PAR-3 im Lungenhomogenat von IPF-Patienten im Vergleich zu Spendern zeigt auf molekularer Ebene einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression bei den IPF-Patienten (Abb. 3A). Auf der Proteinebene lässt sich ebenfalls ein Anstieg der PAR-3 Expression im Lungenhomogenat von IPF-Patienten im Vergleich zur Spendergruppe nachweisen (Abb. 3B, C). Weiterhin zeigt sich bei den IPF-Patienten immunhistochemisch in den repräsentativen Schnitten des Lungengewebes eine verstärkte Reaktion des pulmonalen Epithelgewebes, insbesondere der hyperplastischen Typ-II Pneumozyten. Im Vergleich dazu zeigen sich die Gewebe der Spendergruppe nur schwach bis moderat angefärbt, wobei hier auch alveoläre Makrophagen eine schwache Immunreaktion zeigten (Abb. 3D). Interessanterweise zeigten die Fibroblasten und Myelofibroblasten der Lungengewebe von IPF-Patienten immunhistochemisch keine verstärkte PAR- Expression (Abb. 3D).

3.1.2 PAR-3 ist in isolierten Typ-II Pneumozyten von IPF-Patienten erhöht

Im nächsten Schritt wurde die mRNA-Expression von PAR-3 in isolierten humanen pulmonalen Fibroblasten und isolierten humanen Typ-II Pneumozyten untersucht.

Die isolierten humanen Fibroblasten zeigen keine signifikante Veränderung der Expressionslevel im Vergleich zwischen IPF-Patienten und der Spendergruppe (Abb. 4A). Im Gegensatz dazu findet sich ein signifikant starker Anstieg der mRNA-Expression von PAR-3 bei den isolierten humanen Typ-II Pneumozyten aus den Lungengeweben von IPF-Patienten im Vergleich zur Gruppe der Spender (Abb. 4 B).

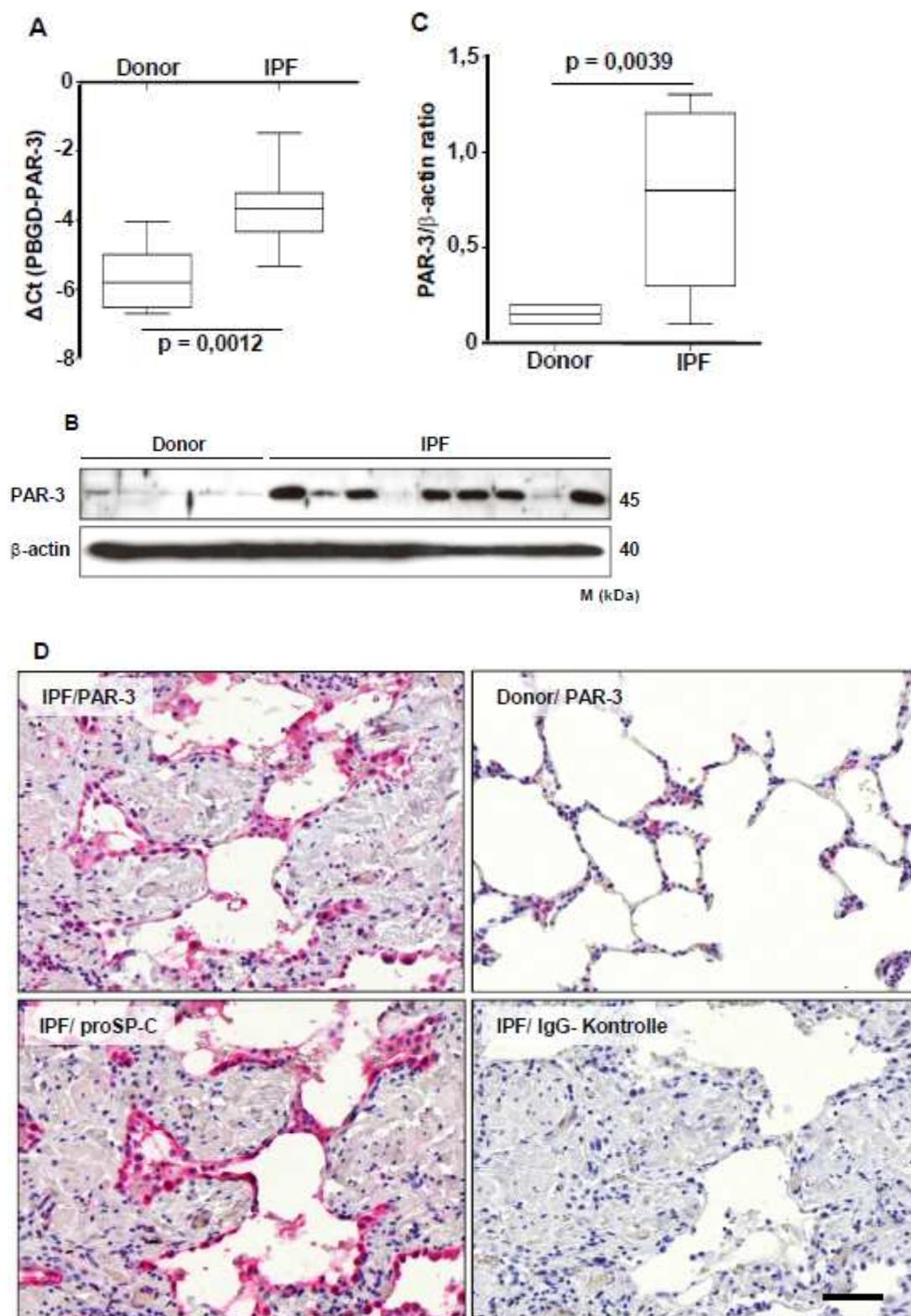


Abbildung 3: Signifikante Expression von PAR-3 in Lungengeweben von IPF-Patienten (A) mRNA-Expression von PAR-3 im humanen Lungenhomogenat von Spendern (Donor: n=8) und IPF-Patienten (IPF: n=21) mittels qPCR. Die qPCR- Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) PAR-3-Protein im humanen Lungenhomogenat von Donoren (n=5/8) und IPF (n=9/21) im Western Blot. (C) Densitometriemessung von (B): Donor: n=8, IPF: n=21 (D) Immunhistochemische repräsentative serielle Schnitte humanen Lungengewebes von IPF- Patienten und Donoren. Anfärbung mit PAR-3 oder proSP-C. Die Anfärbung mit proSP-C dient als Nachweis, dass es sich um Typ-II Pneumozyten handelt. Als Kontrolle dient die Anfärbung mit IgG. Balkengröße 100 μm .

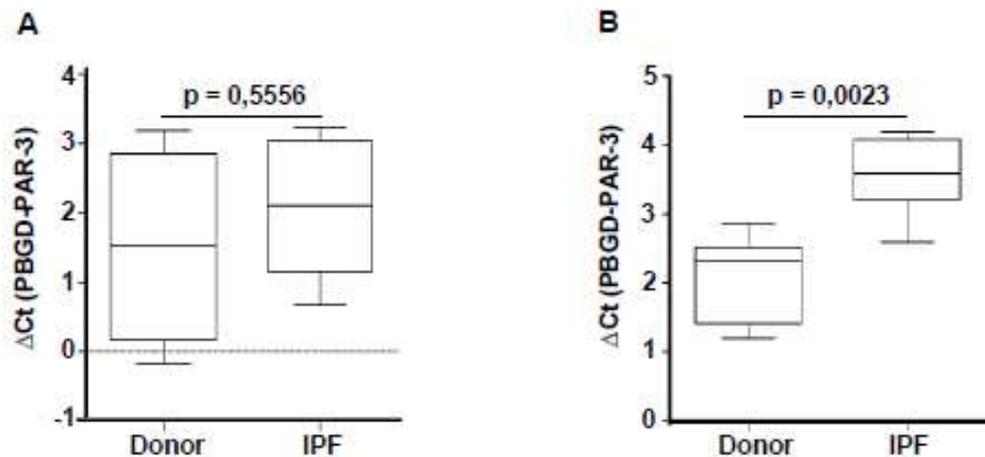


Abbildung 4: Signifikante Erhöhung von PAR-3 in humanen Typ-II Pneumozyten (A) mRNA-Expression von PAR-3 in isolierten humanen Lungenfibroblasten von Spendern (Donor: n=4) und IPF- Patienten (IPF: n=5) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) mRNA-Expression von PAR-3 in humanen Typ-II Pneumozyten von Donoren (n=4) und IPF (n=4) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen.

3.1.3 PAR-4 ist in den Lungengeweben von IPF-Patienten nicht erhöht

Die Auswertung der Expression von PAR-4 im Lungenhomogenat von IPF-Patienten im Vergleich zu Spendern zeigt sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene keine signifikanten Änderung (Abb. 5 A, B, C).

Die Immunhistochemie von PAR-4 mit repräsentativen seriellen Schnitten zeigt eine schwach bis mäßige Reaktion der bronchialen und alveolären Epithelien, als auch der alveolären Makrophagen. Hierbei findet sich jedoch keine signifikant veränderte Immunreaktion bei den Geweben von IPF-Patienten im Vergleich zu den Schnitten der Kontrollgruppe (Abb. 5 D).

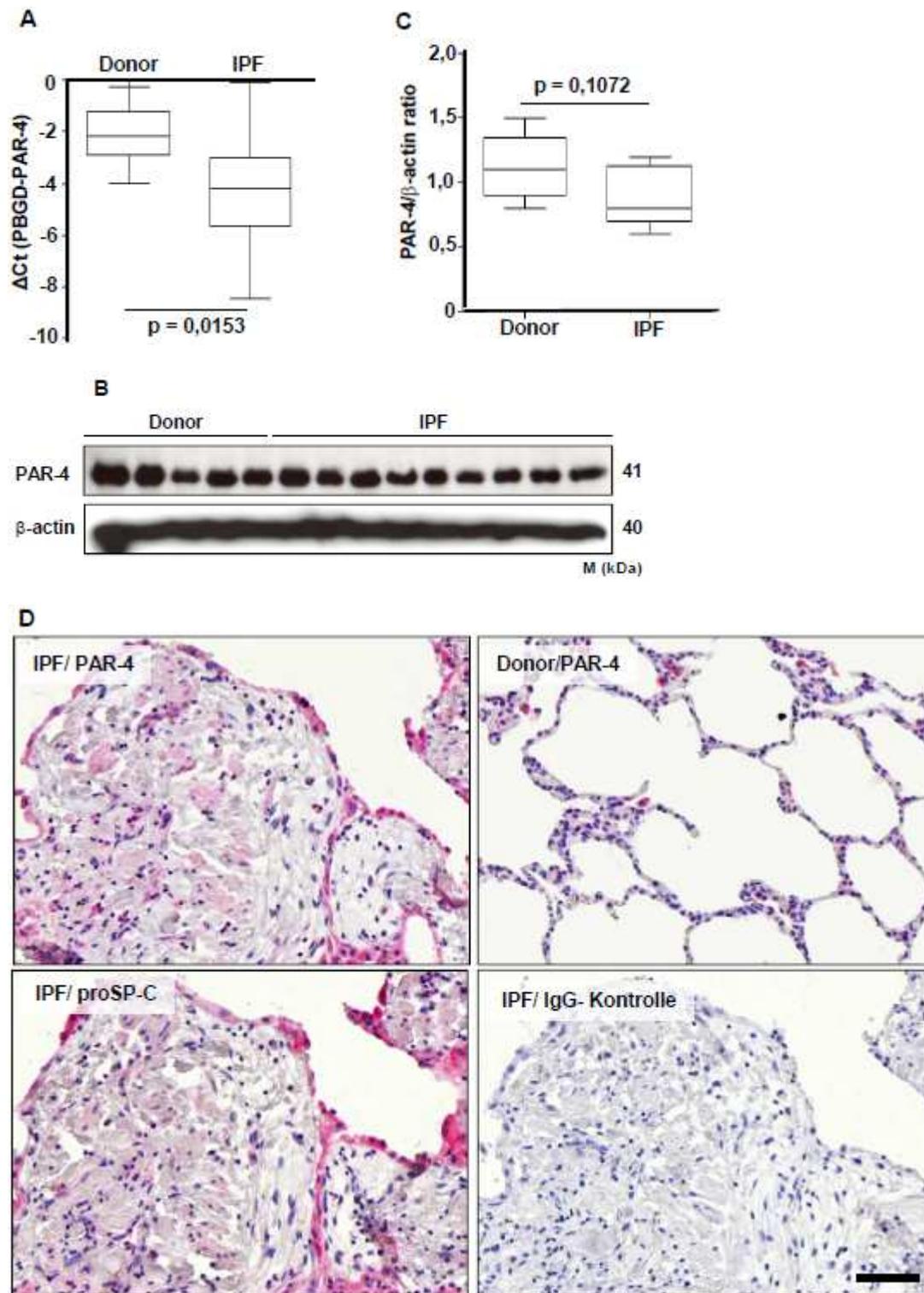


Abbildung 5: Keine Veränderung in der Expression von PAR-4 in Lungengeweben von IPF-Patienten (A) mRNA-Expression von PAR-4 im humanen Lungengewebe von Spendern (Donor: n=8) und IPF-Patienten (IPF: n=21) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als Δ Ct angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) PAR-4-Protein-Expression im humanen Lungengewebe von repräsentativen Donoren (n=5/8) und IPF (n=9/21) im Western Blot. (C) Densitometriemessung von (B) Donor: n=8, IPF: n=21 (D) Immunhistochemische repräsentative serielle Schnitte humanen Lungengewebes von IPF und Donoren. Anfärbung mit PAR-4 oder proSP-C. Die Anfärbung mit proSP-C dient als Nachweis, dass es sich um Typ-II Pneumozyten handelt. Als Kontrolle dient die Anfärbung mit IgG. Balkengröße 100 μ m.

3.1.4 Die PAR-4-Expression ist in isolierten humanen pulmonalen Fibroblasten und Typ-II Pneumozyten nicht signifikant verändert

Im Weiteren wurde die Expression der mRNA von PAR-4 in isolierten humanen pulmonalen Fibroblasten und isolierten humanen Typ-II Pneumozyten von IPF-Patienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe untersucht. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede in der PAR-4 Expression zwischen den Gruppen festgestellt (Abb. 6 A, B).

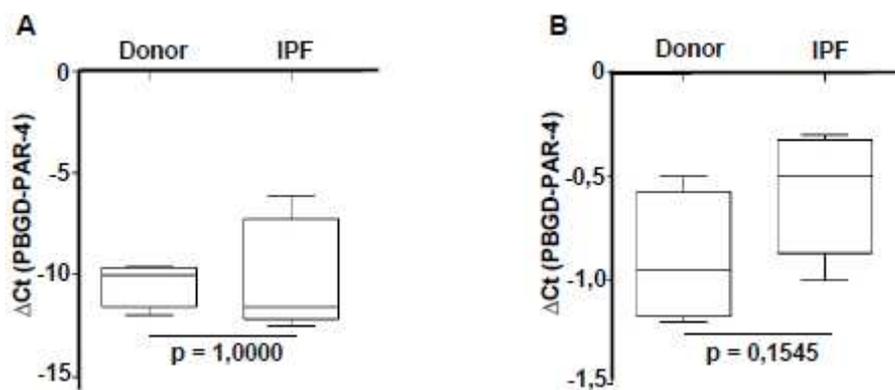


Abbildung 6: Keine Veränderung in der Expression von PAR-4 in humanen Fibroblasten und Typ-II Pneumozyten von IPF-Patienten (A) mRNA-Expression von PAR-4 in humanen Lungenfibroblasten von Spendern (Donor: n= 4) und IPF-Patienten (IPF: n=5) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen (B) mRNA-Expression von PAR-4 in humanen Pneumozyten Typ-II von Donoren (n=4) und IPF (n=4) mittels qPCR. Die qPCR- Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen.

3.2 Analyse der Expression von PAR-3 und PAR-4 im Tiermodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose

3.2.1 Die PAR-3-Expression ist im Lungengewebe von Bleomycin-behandelten Mäusen erhöht

Zur Untersuchung der Expression von PAR-3 im Tiermodell wurde bei Mäusen durch die Gabe des Antibiotikums Bleomycin eine Fibrose ausgelöst. Hierbei ist charakteristisch, dass eine frühe inflammatorische Phase circa ab dem 10. Tag durch eine fibrotische Phase abgelöst wird. Die Tiere wurden 7, 10, 14 bzw. 21 Tage nach Applikation von Bleomycin getötet und die Lungen im Vergleich zu einer, nach identischer Applikationsform mit 0,9 % NaCl-behandelten, Kontrollgruppe untersucht. Hierbei fällt auf, dass sich die PAR-3-Expression sowohl auf m-RNA- als auch auf Proteinebene in der frühen inflammatorischen Phase bis Tag 7 nicht signifikant ändert. (Abb. 7 A, B, C) Im Verlauf der frühen und späten fibrotischen Phase innerhalb von Tag 10 bis 21 nach Applikation des Medikaments ist jedoch ein starker Anstieg der PAR-3 Expression sowohl auf m-RNA- als auch auf Proteinebene zu verzeichnen (Abb. 7A, B, C). In den repräsentativen Schnitten von Lungengewebe von Bleomycin-behandelten Mäusen (Tag 21 nach Applikation) zeigt die Immunhistochemie von PAR-3 eine verstärkte Reaktion im Bereich der Typ-II Pneumozyten und der bronchialen Epithelzellen (Abb. 7 D). Im Vergleich dazu weist die mit NaCl behandelte, gesunde Kontrollgruppe 21 Tage nach Applikation immunhistochemisch eine schwächere Reaktion im Bereich des bronchialen Epithelgewebes auf (Abb. 7 D).

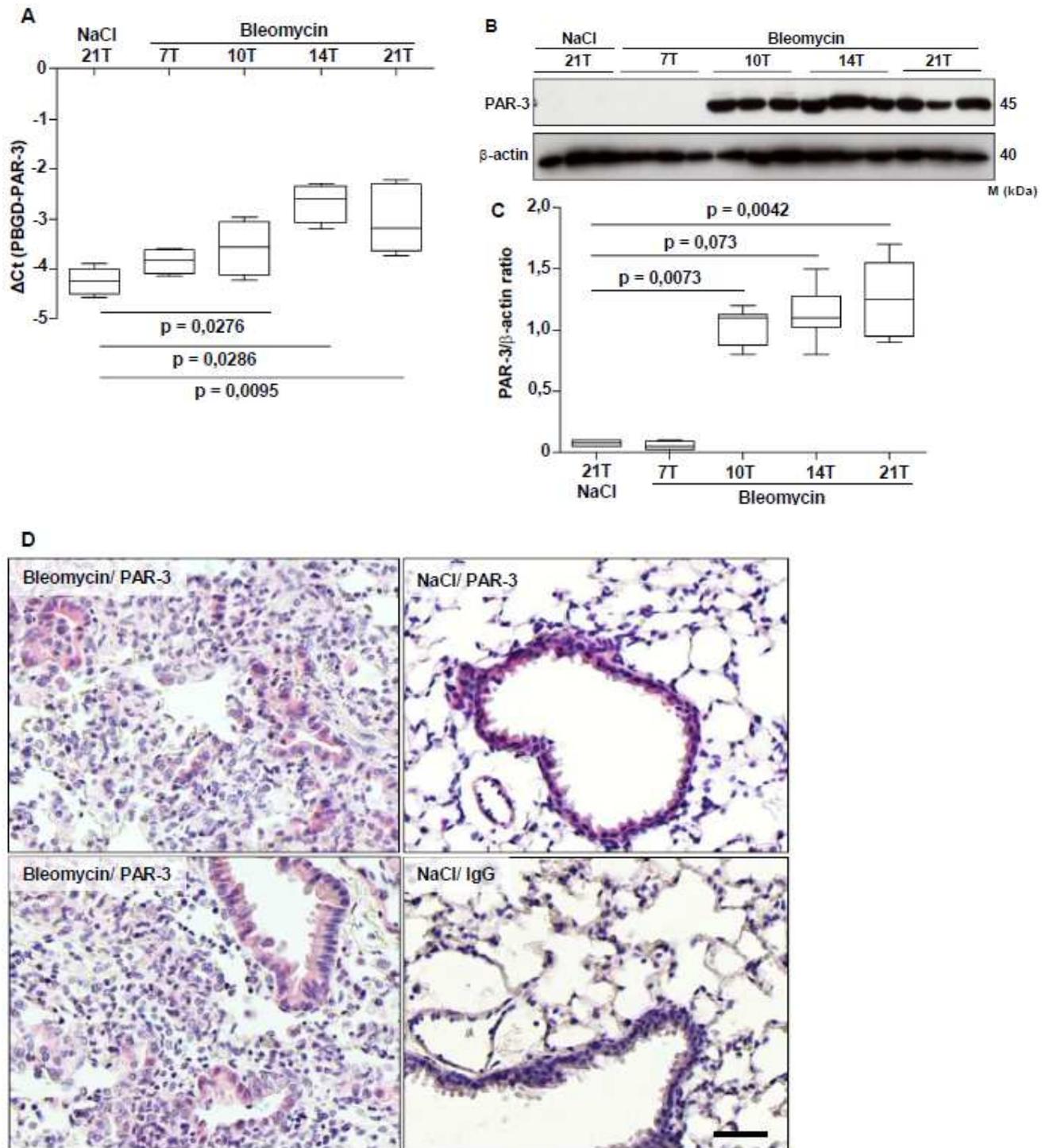


Abbildung 7: Verstärkte Expression von PAR-3 in Lungen von Bleomycin-behandelten Mäusen (A) mRNA-Expression von PAR-3 im Lungenhomogenat von Bleomycin-behandelten Mäusen an Tag 7, 10, 14 und 21 nach Applikation sowie der mit NaCl-behandelten Kontrollgruppe mittels qPCR (n=3-6/Gruppe). Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von PAR-3 im Lungenhomogenat von Bleomycin-behandelten Mäusen an Tag 7, 10, 14 und 21 (n=3/6) nach Applikation sowie der mit NaCl-behandelten Kontrollgruppe (n=3/6) mittels Western Blot. (C) Densitometrie zu (B) (n=6/Gruppe). (D) Immunhistochemie von PAR-3 in repräsentativen Schnitten des Lungengewebes von Bleomycin-behandelten Mäusen an Tag 21 nach Applikation und der mit NaCl-behandelten Kontrollgruppe. Kontrolle mit IgG. Balkengröße 100 μm .

3.2.2 Die PAR-3-Expression ist in isolierten murinen Typ-II Pneumozyten erhöht

Im nächsten Schritt wurde auch im Tiermodell die PAR-3 Expression in isolierten Lungenfibroblasten und isolierten Typ-II Pneumozyten sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene untersucht. Die Fibroblasten und Typ-II Pneumozyten wurden hierbei aus Lungengewebe von Mäusen isoliert, welche zuvor 21 Tage mit Bleomycin bzw. zur Kontrolle mit NaCl behandelt worden waren. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Anstieg der PAR-3 Expression sowohl auf m-RNA- als auch auf Proteinebene bei isolierten Fibroblasten von Bleomycin- behandelten Mäusen im Vergleich zu einer mit NaCl-behandelten Kontrollgruppe (Abb. 8 A, B, C). Im Gegensatz dazu zeigt sich bei isolierten Typ-II Pneumozyten aus dem Lungenhomogenat von Bleomycin-behandelten Mäusen im Vergleich zu der mit NaCl-behandelten Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der PAR-3-Expression sowohl auf der mRNA- als auch der Proteinebene (Abb. 9 A, B, C).

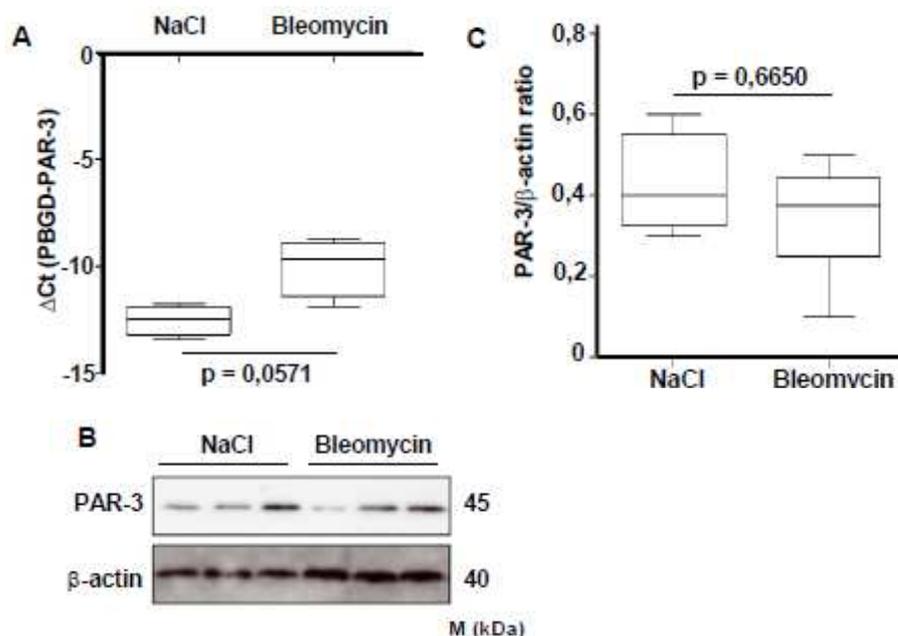


Abbildung 8: PAR-3 ist in murinen Fibroblasten nicht erhöht (A) mRNA-Expression von PAR-3 in isolierten Lungenfibroblasten von Bleomycin- behandelten Mäusen Tag 21 nach Applikation (n=5) und von NaCl-behandelten Kontrolltieren (n=5) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von PAR-3 in isolierten Lungenfibroblasten von Bleomycin-behandelten Mäusen Tag 21 nach Applikation (n=3/5) und mit NaCl-behandelten Kontrolltieren (n=3/5) mittels Western Blot. (C) Densitometrie zu (B) (n=5/Gruppe)

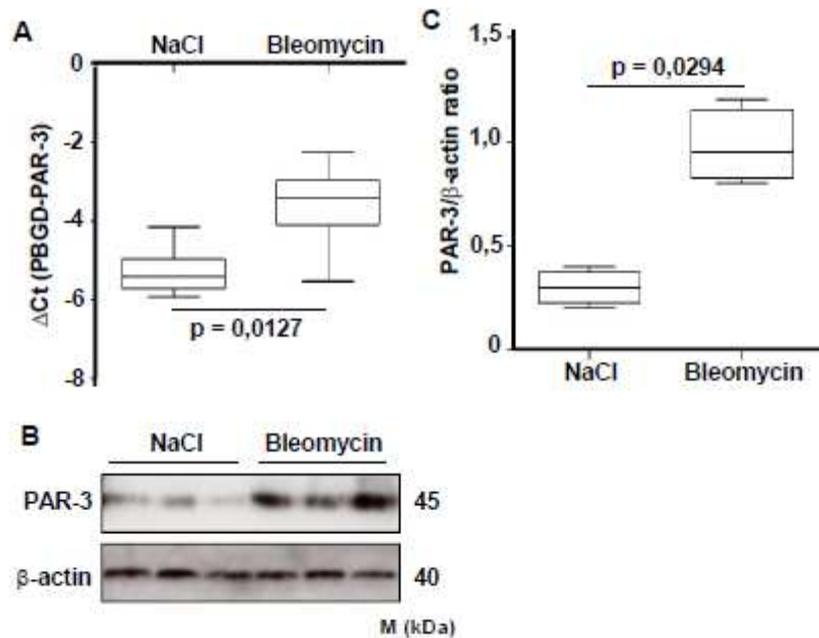


Abbildung 9: PAR-3 ist in murinen Typ-II Pneumozyten signifikant erhöht (A) mRNA-Expression von PAR-3 in isolierten Typ-II Pneumozyten von Bleomycin- behandelten Mäusen Tag 21 nach Applikation (n=5) und von NaCl-behandelten Kontrolltieren (n=5) mittels qPCR. Die qPCR-Ergebnisse werden als Δ Ct angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von PAR-3 in isolierten Typ-II Pneumozyten von Bleomycin-behandelten Mäusen Tag 21 nach Applikation (n=3/5) und von NaCl-behandelten Kontrolltieren (n=3/5) mittels Western Blot. (C) Densitometrie zu (B) (n=5/Gruppe).

3.2.3 Die Expression von PAR-4 ist in den fibrotischen Lungengeweben von Bleomycin-behandelten Mäusen nicht signifikant verändert

Die Untersuchung der Expression von PAR-4 am Tiermodell zeigt zunächst einen Abfall der PAR-4 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene am Tag 7 nach Applikation von Bleomycin im Vergleich zu der mit NaCl-behandelten Kontrollgruppe. Nach Abklingen der inflammatorischen Phase ca. ab dem 10 Tag nach Applikation ist im weiteren Verlauf von 10, 14 und 21 Tagen ein Wiederanstieg der PAR-4 Expression festzustellen. Das Expressionslevel bleibt während der fibrotischen Phase zwischen Tag 10 und 21 nach Applikation von Bleomycin sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nahezu konstant und zeigt sich nicht signifikant erhöht gegenüber der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe (Abb. 10 A, B, C).

Die immunhistochemische Analyse von Lungengewebe an Tag 21 nach Applikation von Bleomycin bzw. NaCl zeigt bei PAR-4 in repräsentativen Schnitten eine starke Reaktion in den hyperplastischen Typ-II Pneumozyten und dem umliegenden

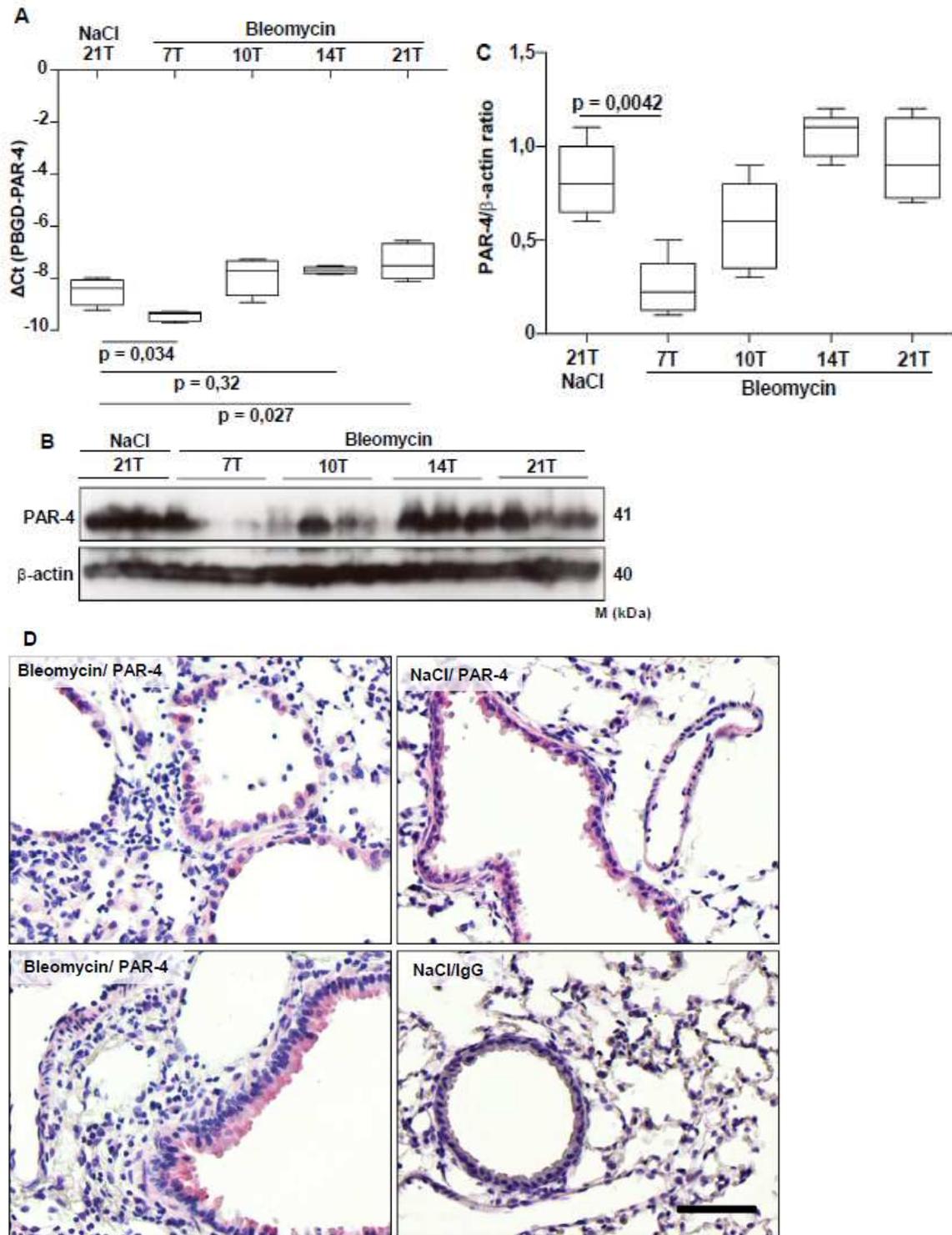


Abbildung 10: Keine Veränderung der Expression von PAR-4 in fibrotischen Lungen von Bleomycin-behandelten Mäusen (A) mRNA-Expression von PAR-4 im Lungenhomogenat von Bleomycin-behandelten Mäusen 7, 10, 14 und 21 Tage nach Applikation (n=3-6/Gruppe) und der mit NaCl-behandelten Kontrollgruppe (n=3-6/Gruppe) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von PAR-4 in Lungenhomogenat von Bleomycin-behandelten Mäusen 7, 10, 14 und 21 Tage nach Applikation 21 (n=3/6) und der mit NaCl-behandelten Kontrollgruppe (n=3/5) mittels Western Blot. (C) Densitometrie zu (B) (n=5-6/Gruppe). (D) Immunhistochemie von PAR-4 in repräsentativen Schnitten des Lungengewebes von Bleomycin-behandelten Mäusen an Tag 21 nach Applikation und der mit NaCl-behandelten Kontrollgruppe (NaCl). Als Kontrolle dient IgG. Balkengröße 100 μm .

alveolären Gewebe. In der Kontrollgruppe zeigt sich ebenfalls eine starke Färbung der Epithelien. Es finden sich hierbei im Vergleich zwischen den Bleomycin-behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der Reaktion (Abb. 10 D).

3.2.4 Die PAR-4-Expression ist in isolierten murinen Lungenfibroblasten und isolierten murinen Typ-II Pneumozyten nicht signifikant verändert

Im Anschluss wurde die PAR-4 Expression in isolierten murinen Lungenfibroblasten und isolierten murinen Typ-II Pneumozyten von Bleomycin- behandelten Mäusen an Tag 21 nach Applikation im Vergleich zu der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe untersucht. Hierbei zeigte sich bei den isolierten pulmonalen Fibroblasten und bei den isolierten Typ-II Pneumozyten kein signifikanter Unterschied in der PAR-4-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Abb. 11 A, B, C und Abb. 12 A, B, C).

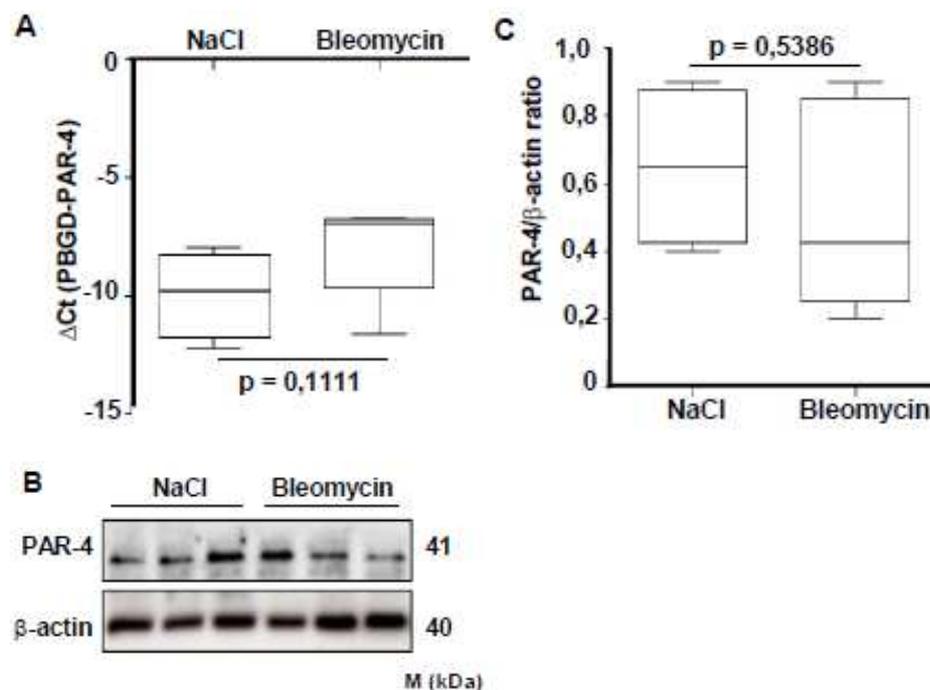


Abbildung 11: Keine Veränderung der Expression von PAR-4 in murinen Fibroblasten (A) mRNA-Expression von PAR-4 in isolierten Lungenfibroblasten von Bleomycin- behandelten Mäusen 21 Tage nach Applikation (n=5) und NaCl-behandelten Kontrolltieren (n=5) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von PAR-4 in isolierten Lungenfibroblasten von Bleomycin-behandelten Mäusen 21 Tage nach Applikation (n=3/5) und von NaCl-behandelten Kontrolltieren (n=3/5) mittels Western Blot. (C) Densitometrie zu (B) (n=5/Gruppe)

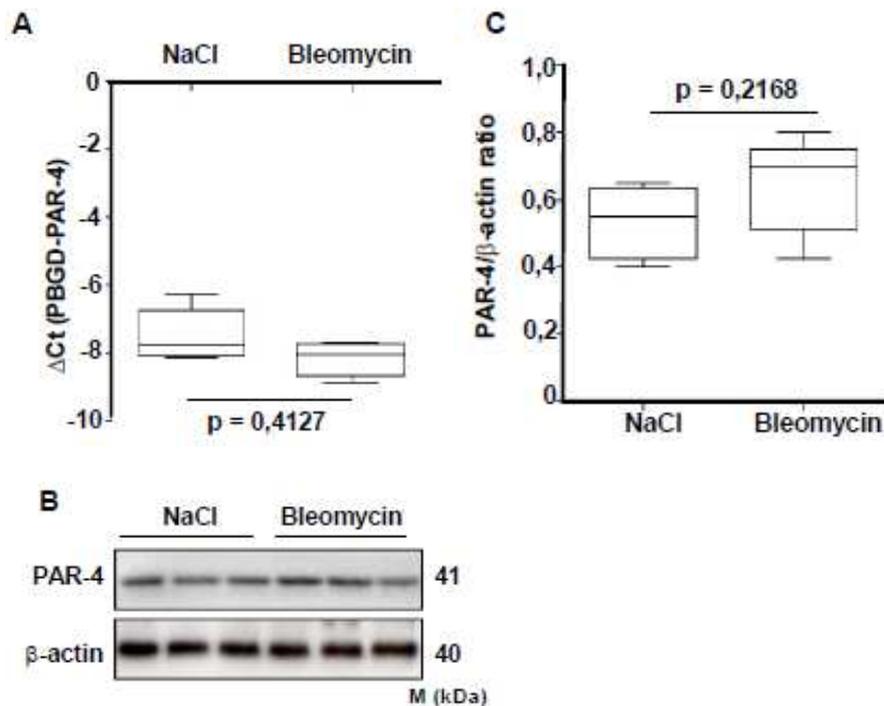


Abbildung 12 Keine Veränderung der Expression von PAR-4 in murinen Typ-II Pneumozyten (A) mRNA-Expression von PAR-4 in isolierten Typ-II Pneumozyten von Bleomycin-behandelten Mäusen 21 Tage nach Applikation (n=5) und NaCl-behandelten Kontrolltieren (n=5) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als Δ Ct angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von PAR-4 in isolierten Lungenfibroblasten von Bleomycin-behandelten Mäusen 21 Tage nach Applikation (n=3/5) und von NaCl-behandelten Kontrolltieren (n=3/5) mittels Western Blot. (C) Densitometrie zu (B) (n=5/Gruppe)

3.3 Analyse der Expression von PAR-3 und PAR-4 in den Lungengeweben von Patienten mit idiopathischer pulmonal-arterieller Hypertonie (IPAH)

3.3.1 PAR-3 ist überwiegend in den glatten Muskelzellen von IPAH-Patienten signifikant erhöht

Die Untersuchungen zur Expression von PAR-3 in den Lungengeweben von IPAH-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen sowohl auf der mRNA- als auch der Proteinebene einen signifikanten Anstieg (Abb. 13 A, B, C).

Die immunhistochemische Untersuchung repräsentativer serieller Lungenschnitte zeigt, dass PAR-3 vorwiegend in glatten Muskelzellen der pulmonalen Gefäßstrombahn exprimiert wird. Eine stärkere immunhistochemische Reaktion weisen die umgebauten Gefäße von IPAH-Patienten auf (Abb. 13 D).

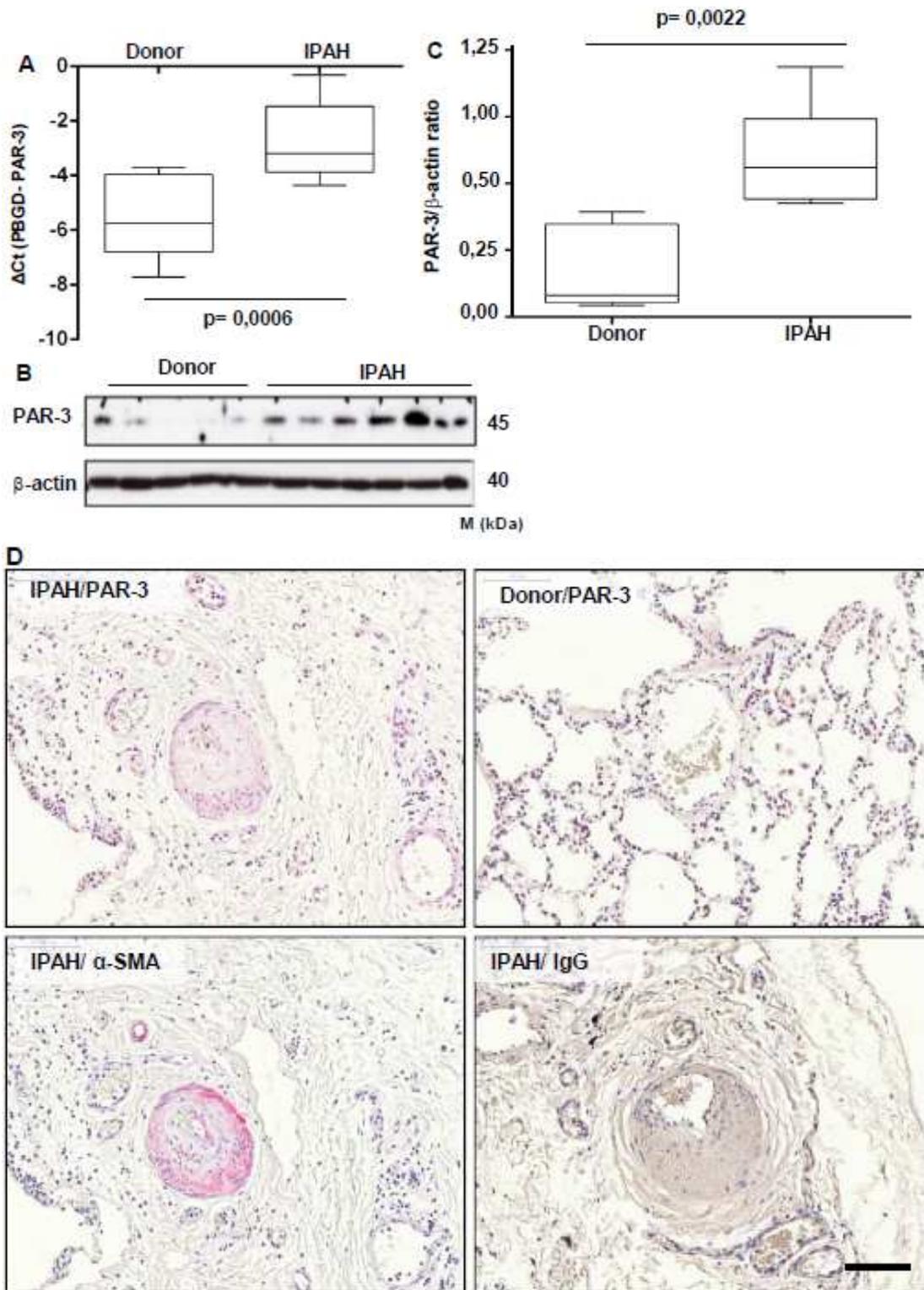


Abbildung 13: PAR-3 ist im Lungenhomogenat von IPAHA-Patienten signifikant erhöht (A) mRNA-Expression von PAR-3 im humanen Lungenhomogenat von Spendern (Donor: n=8) und IPAHA-Patienten (IPAHA: n=17) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von PAR-3 im humanen Lungenhomogenat von Donoren (n=5/8) und IPAHA-Patienten (n=7/17) mittels Western Blot. (C) Densitometriemessung zu (B) (Donor: n=8; IPAHA: n=17) (D) Immunhistochemie von PAR-3 in repräsentativen Schnitten des Lungengewebes von IPAHA-Patienten und Donoren. Die Anfärbung mit α -SMA dient als Nachweis, dass glatte Muskulatur gefärbt wurde. Kontrolle mittels IgG. Balkengröße 100 μ m.

3.3.2 Die Expression von PAR-4 im Lungengewebe von IPAH-Patienten ist nicht signifikant verändert

Die Auswertung der Ergebnisse zur PAR-4 Expression in Lungengeweben von IPAH-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt, dass sich weder auf der mRNA- Ebene noch auf der Proteinebene eine signifikante Änderung erkennen lässt (Abb. 14 A, B, C). Die immunhistochemische Untersuchung von repräsentativen seriellen Schnitten stellt dar, dass PAR-4 sowohl bei IPAH-Patienten als auch bei der Spendergruppe in den glatten Muskelzellen der pulmonalen Gefäßstrombahn und den alveolären Epithelien schwach positiv exprimiert wird. Die Intensität der Färbung indes zeigt sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant verändert (Abb. 14 D).

3.3.3 Die Aktivierung von FX ist bei IPAH-Patienten erhöht

Die Expression von PAR-3 und PAR-4 steht vermutlich im Zusammenhang mit einer Exazerbation der Gerinnungskaskade. Beide PARs werden durch Thrombin aktiviert. Für die Generierung von Thrombin ist Voraussetzung, dass FVII und FX in ihre aktiven Formen FVIIa und FXa übergehen und dadurch Thrombin aktiviert wird. Daher wurde in den Lungengeweben von IPAH-Patienten die Expression der FVII und FX sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene bestimmt. Die Expression von FVII in Lungengeweben von IPAH-Patienten ist auf mRNA-Ebene signifikant erhöht, auf Proteinebene ist die Expression von FVIIa jedoch nicht signifikant gesteigert (Abb. 15 A, B, C). FX ist in den Lungengeweben von IPAH-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe auf Ebene der mRNA nicht signifikant erhöht, auf Proteinebene ist FXa bei IPAH-Patienten erhöht. (Abb. 16. A, B, C).

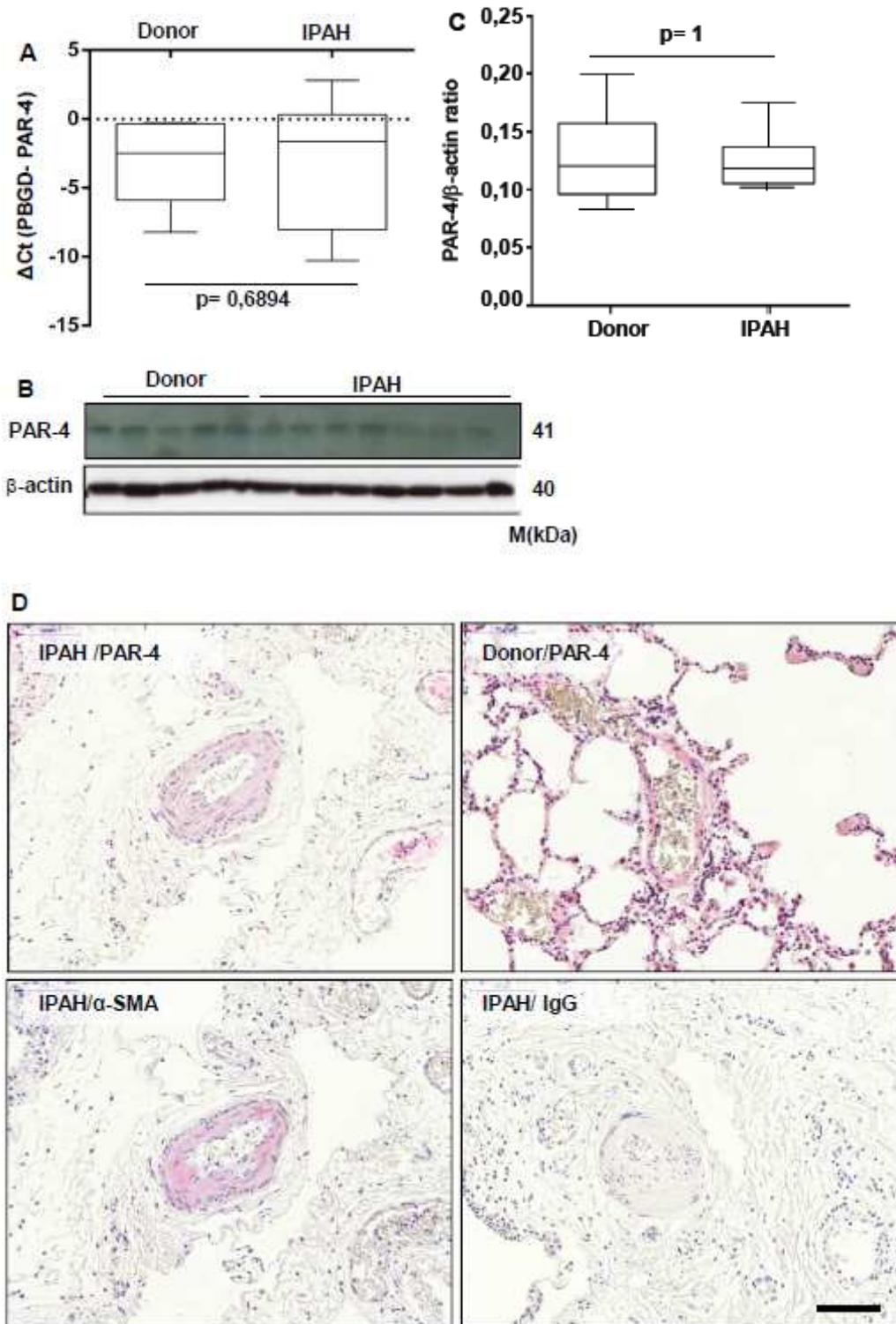


Abbildung 14: PAR-4 ist im Lungenhomogenat von IPAH-Patienten nicht erhöht (A) mRNA-Expression von PAR-4 im humanen Lungenhomogenat von Spendern (Donor: n=8) und IPAH-Patienten (IPAH: n=17) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als Δ Ct angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von PAR-4 im humanen Lungenhomogenat von Donoren (n=5/8) und IPAH-Patienten (n=7/17) mittels Western Blot. (C) Densitometriemessung zu (B) (Donor: n=8; IPAH: n=17) (D) Immunhistochemie von PAR-4 in repräsentativen Schnitten des Lungengewebes von IPAH-Patienten und Donoren. Die Anfärbung mit α -SMA dient als Nachweis, dass glatte Muskulatur gefärbt wurde. Kontrolle mittels IgG. Balkengröße 100 μ m.

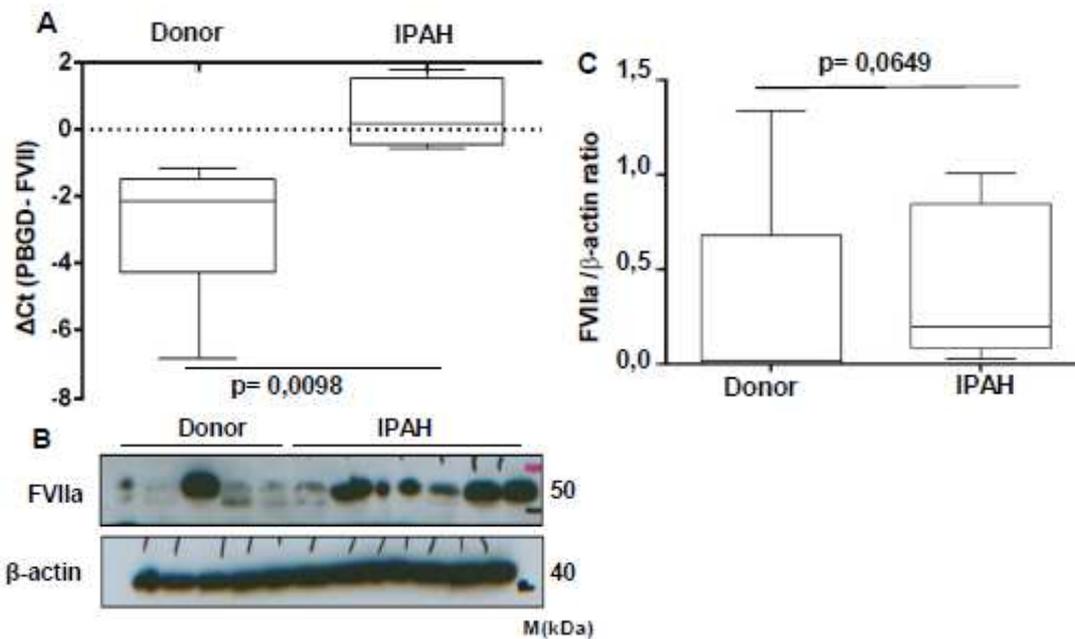


Abbildung 15: Die Levels von FVIIa ändern sich nicht in den Lungengewebe von IPAH-Patienten im Vergleich zu Spendern (A) mRNA-Expression von FVII im humanen Lungengewebe von Spendern (Donor: n=8) und IPAH-Patienten (IPAH: n=17) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als Δ Ct angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von FVIIa im humanen Lungengewebe von Donoren (Donor: n=5/8) und IPAH-Patienten (IPAH: n=7/17) mittels Western Blot. (C) Densitometriemessung zu (B) (Donor: n=8; IPAH: n=17).

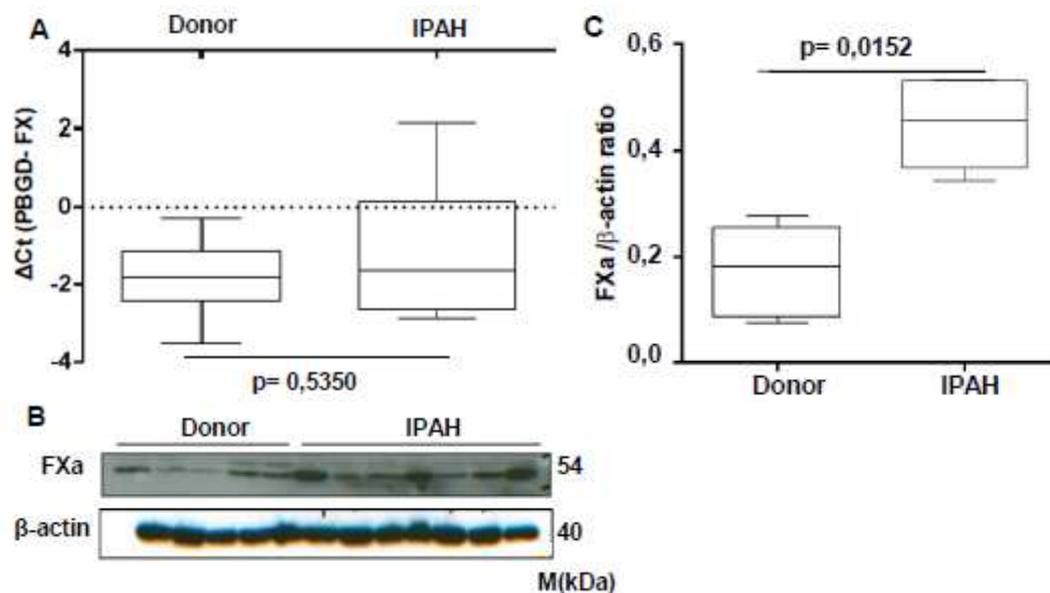


Abbildung 16: Die Levels von FXa sind in den Lungengewebe von IPAH-Patienten im Vergleich zu Spendern gesteigert (A) mRNA-Expression von FX im humanen Lungengewebe von Donoren (Donor: n=8) und IPAH-Patienten (IPAH: n=17) mittels qPCR. Die qPCR-Ergebnisse werden als Δ Ct angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von FXa im humanen Lungengewebe von Donoren (Donor: n=5/8) und IPAH-Patienten (IPAH: n=7/17) mittels Western Blot. (C) Densitometriemessung zu (B) (Donor: n=8; IPAH: n=17)

3.3.4 Im Blutplasma von IPAH-Patienten ist FX signifikant erniedrigt exprimiert

Die mittels ELISA bestimmte Expression von FVII und FX im Blutplasma von IPAH-Patienten zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe, dass sich die Expression von Faktor VII nicht signifikant verändert (Abb. 17 A). Die Expression von Faktor X hingegen ist signifikant erniedrigt (Abb. 17 A, B).

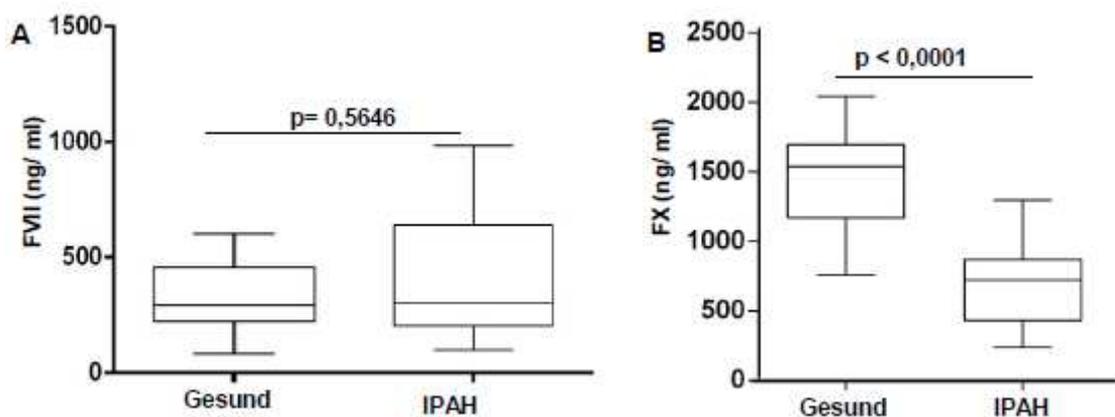


Abbildung 17: ELISA von FVII und FX (A) Konzentration von FVII im humanen Blutplasma von Gesunden (n=21) und IPAH-Patienten (IPAH: n=21) mittels ELISA. (B) Konzentration von FX im humanen Blutplasma von Gesunden (n=21) und IPAH-Patienten (IPAH: n=21) mittels ELISA.

3.3.5 PAR-3 wird im Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie nicht signifikant verstärkt exprimiert

Auf der tierexperimentellen Ebene wurde das Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie eingesetzt. Die Mäuse wurden hierfür 1 bis 21 Tage einer Hypoxie (Inspiratorische Sauerstofffraktion, $FiO_2 = 0,1$) ausgesetzt.

Auf mRNA-Ebene wurde das Lungenhomogenat von Tieren, welche 24 Stunden und 21 Tage der erniedrigten Sauerstofffraktion ausgesetzt waren, mit einer entsprechenden Kontrollgruppe verglichen. Hierbei zeigte sich die Expression von PAR-3 nicht signifikant verändert (Abb. 18 A). Auf der Proteinebene zeigte der Vergleich von 21 Tage behandelten Tieren mit der entsprechenden Kontrollgruppe ebenfalls keine

signifikante Änderung (Abb. 18 B, C). Die Immunhistochemie von repräsentativen seriellen Schnitten zeigte eine schwach positive PAR-3-Färbung in den glatten Muskelzellen der alveolären Gefäße, wobei sich zwischen den Hypoxie-Mäusen und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede in der Intensität feststellen ließen (Abb. 18 D).

3.3.6 PAR-4 wird im Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie nicht signifikant verstärkt exprimiert

Die Untersuchungen am Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie zeigen im Vergleich der 24 Stunden bzw. 21 Tage behandelten Hypoxie-Mäuse zu der jeweiligen Kontrollgruppe bei der PAR-4 Expression sowohl auf der mRNA-als auch Proteinebene keine signifikanten Veränderungen (Abb. 19 A, B, C).

Die Immunhistochemie zeigt in den repräsentativen seriellen Schnitten sowohl bei den erkrankten Tieren als auch der Kontrollgruppe eine starke Anfärbung von PAR-4 in den gesamten Lungengeweben, insbesondere in den alveolären Makrophagen und Typ-II Pneumozyten. Dabei zeigt sich zwischen den Vergleichsgruppen keine signifikante Änderung in der Intensität der Färbung (Abb. 19 D).

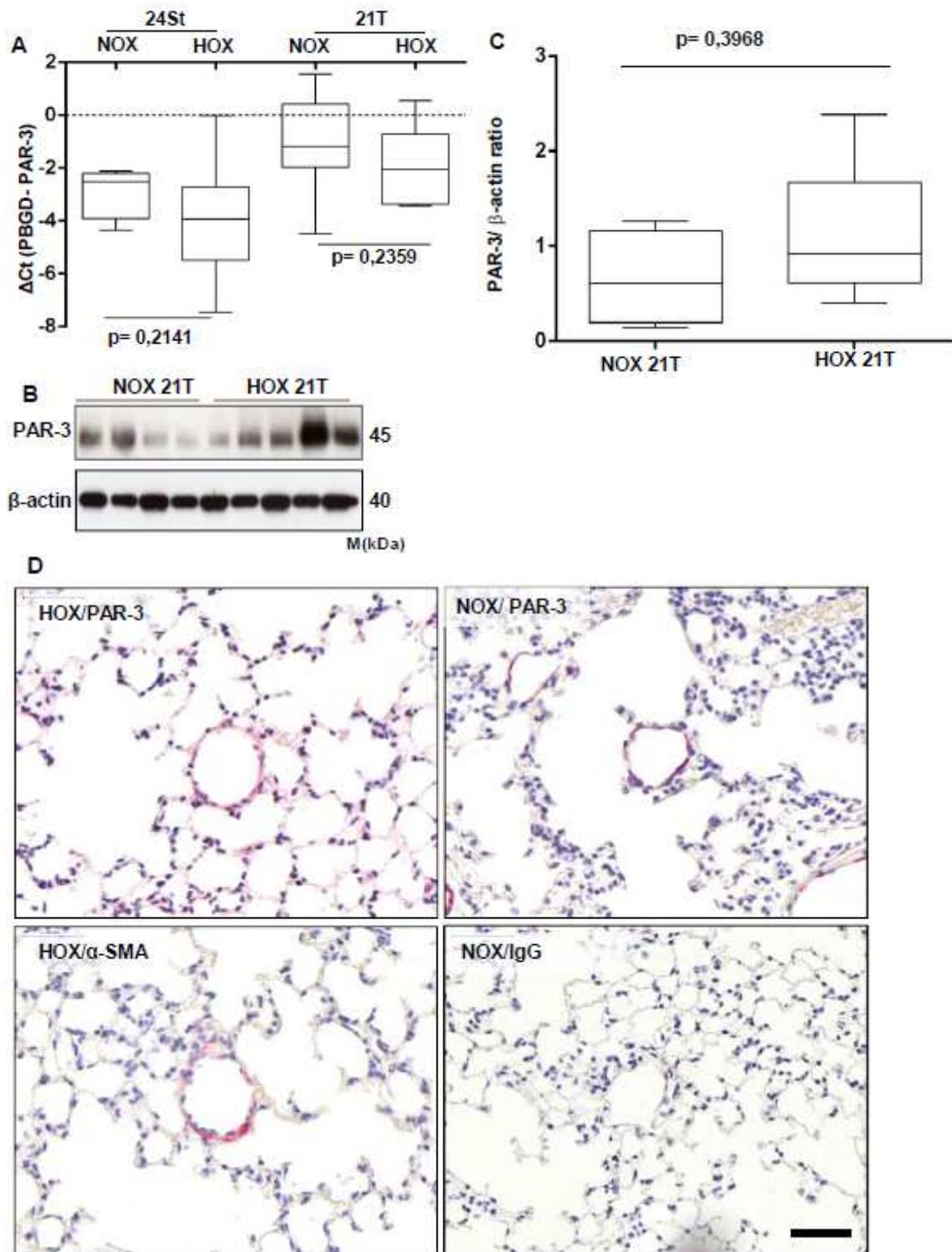


Abbildung 18: Keine Änderung der Expression von PAR-3 im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (A) mRNA-Expression von PAR-3 im Lungenhomogenat von Hypoxie-Mäusen (HOX) und der Kontrollgruppe (NOX) nach 24 Stunden (NOX 24St: n=7, HOX 24St: n=9,) und nach 21 Tagen (NOX 21T: n=9; HOX 21T: n=9) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als Δ Ct angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von PAR-3 im Lungenhomogenat von Hypoxie-Mäusen nach 21 Tagen (HOX 21T: n=5/9) und der Kontrollgruppe (NOX 21T: n=4/9) mittels Western Blot. (C) Densitometrie zu (B) (n=9).

(D) Immunhistochemie von PAR-3 in repräsentativen Schnitten des Lungengewebes von 21 Tagen behandelten Hypoxie-Mäusen und der Kontrollgruppe. Die Immunhistochemie mit α -SMA dient der Kontrolle, dass es sich um glatte Muskelzellen handelt. Kontrolle mit IgG. Balkengröße 50 μ m.

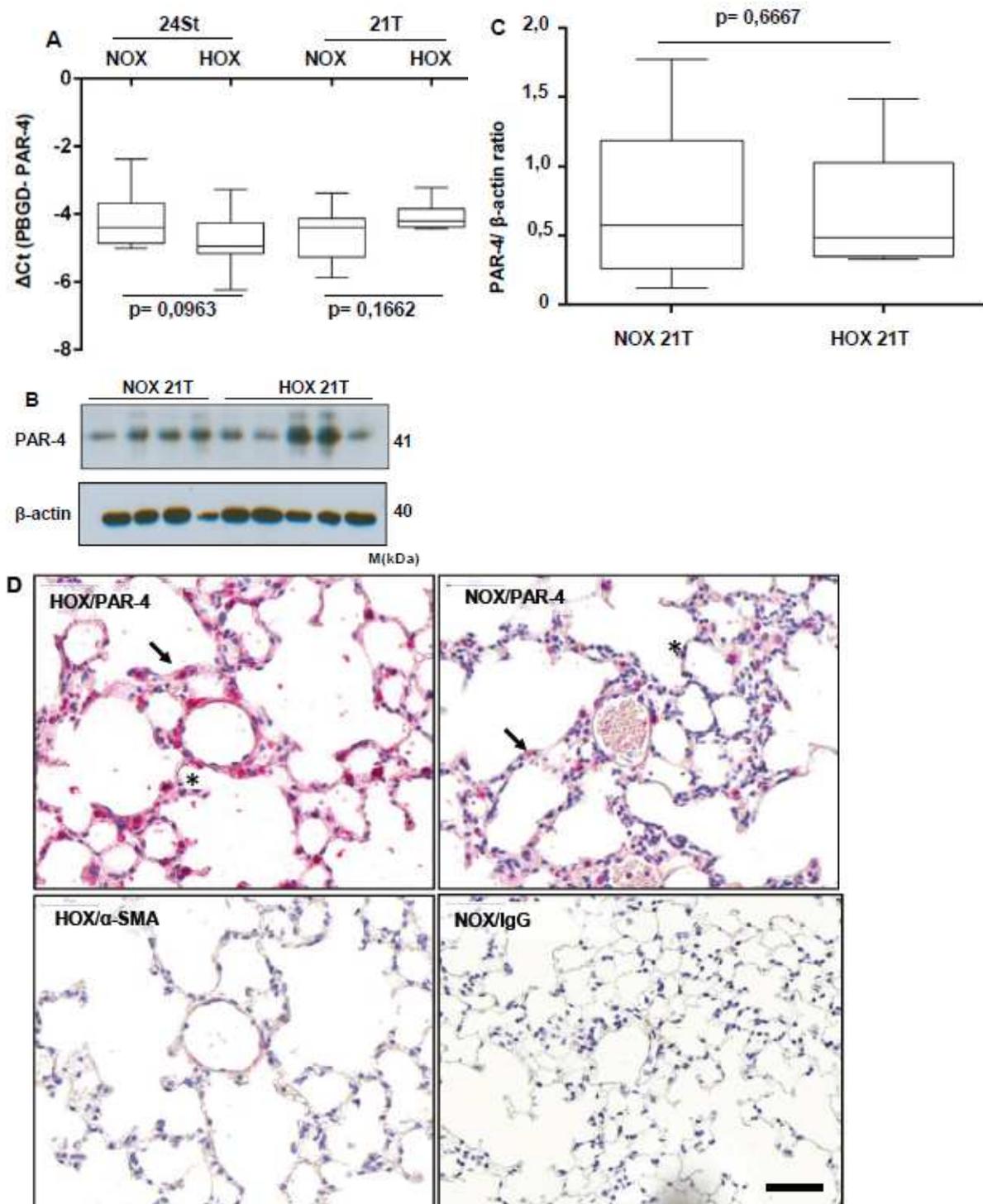


Abbildung 19: Keine Änderung der Expression von PAR-4 im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (A) mRNA-Expression von PAR-4 im Lungenhomogenat von Hypoxie-Mäusen (HOX) und der Kontrollgruppe (NOX) nach 24 Stunden (NOX 24St: n=7, HOX 24St: n=9,) und nach 21 Tagen (NOX 21T: n=9; HOX 21T: n=9) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von PAR-4 im Lungenhomogenat von Hypoxie-Mäusen nach 21 Tagen (HOX 21T: n=5/9) und der Kontrollgruppe (NOX 21T: n=4/9) mittels Western Blot. (C) Densitometrie zu (B) (n=9). (D) Immunhistochemie von PAR-4 in repräsentativen Schnitten des Lungengewebes von 21 Tagen behandelten Hypoxie-Mäusen und der Kontrollgruppe. Typ-II Pneumozyten mit Pfeil markiert, alveoläre Makrophagen mit Sternmarkierung. Die Immunhistochemie mit α -SMA dient der Kontrolle, dass es sich um glatte Muskelzellen handelt. Kontrolle mit IgG. Balkengröße 50 μ m.

3.3.7 FVII und FX sind im Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie nicht signifikant verändert

In Parallele zu den Untersuchungen an humanen Geweben wurden auch am Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie die Expression von FVII und FX nach 24 Stunden bzw. nach 21 Tagen untersucht. Hierbei zeigt sich bei beiden Faktoren sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene keine signifikante Veränderung im Vergleich zwischen behandelten Tieren und der Kontrollgruppe (Abb. 20 A, B, C und Abb. 21 A, B, C). Eine Testung mittels ELISA konnte nicht durchgeführt werden, da keine Plasmaproben vorlagen.

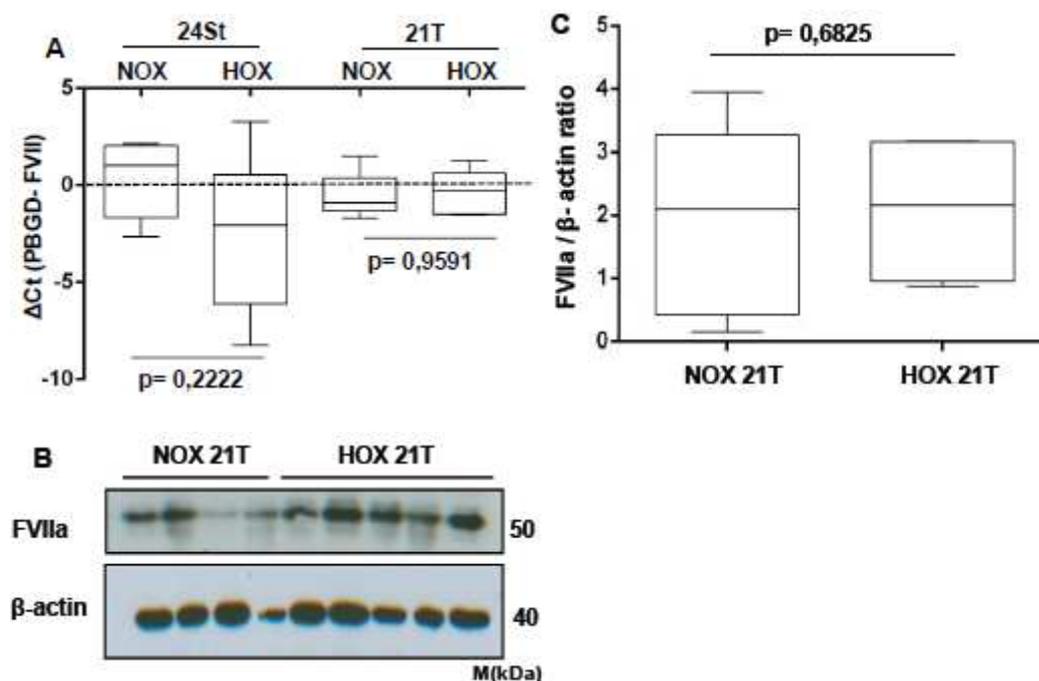


Abbildung 20: Keine Änderung der Levels von FVII bzw. FVIIa im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (A) mRNA-Expression von FVII im Lungenhomogenat von Hypoxie-Mäusen (HOX) und der Kontrollgruppe (NOX) nach 24 Stunden (NOX 24St: n=7, HOX 24St: n=9,) und nach 21 Tagen (NOX 21T: n=9; HOX 21T: n=9) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von FVIIa im Lungenhomogenat von Hypoxie-Mäusen nach 21 Tagen (HOX 21T: n=5/9) und der Kontrollgruppe (NOX 21T: n=4/9) mittels Western Blot. (C) Densitometrie zu (B) (n=9)

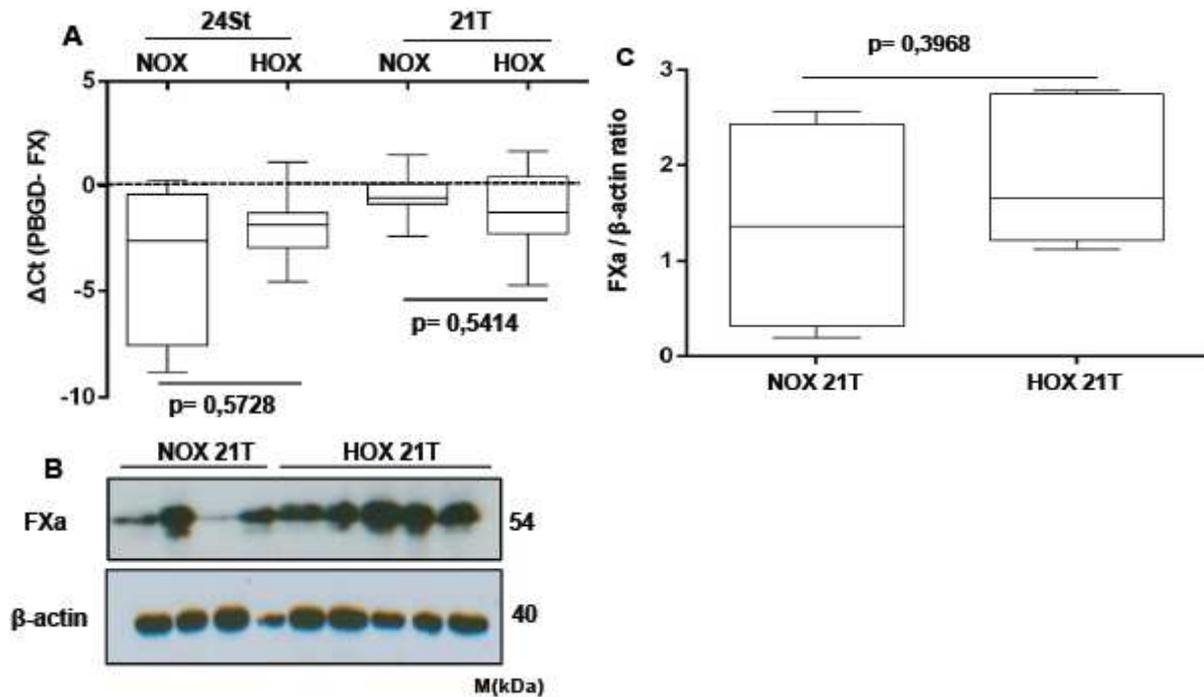


Abbildung 21: Keine Änderung der Levels von FX bzw. FXa im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (A) mRNA-Expression von FX im Lungenhomogenat von Hypoxie-Mäusen (HOX) und der Kontrollgruppe (NOX) nach 24 Stunden (NOX 24St: n=7, HOX 24St: n=9,) und nach 21 Tagen (NOX 21T: n=9; HOX 21T: n=9) mittels qPCR. Die qPCR Ergebnisse werden als ΔCt angegeben, dabei dient PBGD als Referenz-Kontrollgen. (B) Protein-Expression von FXa im Lungenhomogenat von Hypoxie- Mäusen nach 21 Tagen (HOX 21T: n=5/9) und der Kontrollgruppe (NOX 21T: n=4/9) mittels Western Blot. (C) Densitometrie zu (B) (n=9).

4. Diskussion

4.1 Expression der von PAR-3 und PAR-4 bei idiopathischer pulmonaler Fibrose und ihre mögliche pathophysiologische Relevanz

Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) ist eine chronische, progredient verlaufende Erkrankung des Lungenparenchyms in Form einer fibrosierenden interstitiellen Pneumonie [43, 44, 51]. Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt 2-3 Jahre. Klinische Zeichen sind eine zunehmende Belastungsdyspnoe, basal betontes inspiratorisches Knisterrasseln bei der pulmonalen Auskultation sowie Trommelschlegelfinger [43, 51]. Zur Diagnosestellung muss eine andere Form einer fibrosierenden Lungenerkrankung ausgeschlossen werden, der Goldstandard zur Diagnosesicherung ist die HRCT. Das sogenannte Honigwabennmuster, zystische Lufträume mit einem Durchmesser zwischen 3 bis 10 mm, ist dabei kennzeichnend für das Krankheitsbild [43,51]. Histopathologisch ist die IPF durch die Ausbildung

hyperplastischer und hypertropher Typ-II Pneumozyten sowie große und verlängerte bzw. schmale Epithelzellen gekennzeichnet [51]. Dabei gehen reguläre Epithelzellen zugrunde und es werden profibrotische Prozesse gefördert, die unter anderem durch Aktivierung der Gerinnungskaskade Zellmigration und Transition der alveolären Gewebe steigern [51]. Dabei bilden sich fibrotische Regionen aus Fibroblasten und Myofibroblasten, welche große Mengen an extrazellulärer Matrix produzieren, wodurch narbige Veränderungen resultieren, die zur Zerstörung des Lungengewebes der Patienten führen [43, 47, 51].

Nach aktuellem Forschungsstand scheinen die PARs an der Entstehung der profibrotischen Prozesse eine bedeutende Rolle zu spielen. Sie sollen unter anderem Signalkaskaden in Gang setzen, welche die Umwandlung von lokalen Fibroblasten zu Myofibroblasten, die EMT von Epithelzellen zu Myofibroblasten und die Rekrutierung von Fibrozyten des Blutplasmas, aus denen sich Myofibroblasten bilden, steigern.

So wird PAR-1 signifikant verstärkt in den lokalen Fibroblasten exprimiert. Daher kommt ihm unter anderem eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu [22, 30, 56]. Dabei scheint nach neuesten Erkenntnissen eine simultane Aktivierung mit PAR-2 notwendig zu sein, um die von PAR-1 induzierten profibrotischen Prozesse zu aktivieren [89]. Die Rolle von PAR-2 wird aktuell verstärkt diskutiert. So zeigten einige Studien, dass im Mausmodell die Inhibierung von PAR-2 einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf zeigte [92, 93], während eine klinische Studie an humanen Proben keine signifikante Steigerung der PAR-2-Expression ergab [94].

Erstmalig wurde daher die Expression von PAR-3 und PAR-4 bei der idiopathischen Fibrose untersucht. Der humane PAR-3 wird über Thrombin und das Enzym Adenomatous-polyposis-coli (APC) aktiviert [54], scheint nach heutigem Kenntnisstand meist als Cofaktor für die anderen drei PARs zu fungieren und deren Signalwege zu verstärken. So zeigte sich im vaskulären System, dass PAR-3 als Cofaktor von PAR-4 bei niedrigen Konzentrationen an Thrombin die Wirkung der PAR-4-getriggerten Signalwege verstärkt [72, 73, 100]. Im Nervensystem von Mäusen scheint PAR-3 als Cofaktor von PAR-1 über den von aktiviertem Protein C-vermittelten Signalweg die Neurone vor Apoptose zu schützen. [72, 74] Mittlerweile gibt es zudem zahlreiche Hinweise, dass eine eigenständige Aktivierung von PAR-3 zur Auslösung pathogenetisch relevanter Signalkaskaden führt. So fand man eine durch Thrombin-

induzierte Insulinsekretion mittels PAR-3 [79]. Im vaskulären System konnte eine PAR-3-vermittelte zytoprotektive sowie stabilisierende Funktion von aktivierter Protease C aufgezeigt werden. [78, 80, 81]. Bei akuter Leberschädigung in einem Rattenmodell konnte ebenfalls eine PAR-3-Erhöhung nachgewiesen werden. [82] Über die Rolle von PAR-3 in pulmonalen Krankheitsbildern gibt es aktuell nur geringe Kenntnisse. So wurde eine erhöhte PAR-3 Konzentration in einer, durch Endotoxin verursachten, akuten Lungenschädigung bei einem Ratten-Tiermodell gefunden [33].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PAR-3 in den Lungengeweben von IPF-Patienten als auch im gewählten Tiermodell signifikant verstärkt exprimiert wird. Insbesondere in den hyperplastischen Typ-II Pneumozyten scheint eine signifikante Expression von PAR-3 stattzufinden. Dabei lässt die Untersuchung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Krankheitsentwicklung am Tiermodell darauf schließen, dass PAR-3 in einem fortgeschrittenen Stadium, gekennzeichnet durch bereits ausgeprägte fibrotische Umbauprozesse, signifikant exprimiert wird und daher möglicherweise erst zu einem späten Zeitpunkt der Krankheitsentwicklung pathogenetisch relevant werden könnte. Einige der hierbei möglichen Mechanismen, über die PAR-3 an der Entwicklung der fibrotischen Umbauprozesse beteiligt sein könnte, seien im Folgenden genannt:

Es besteht die Möglichkeit, dass PAR-3 im Rahmen der pathologischen veränderten Signalkaskaden als Cofaktor für PAR-1 fungieren und dadurch unter anderem die Differenzierung von lokalen Fibroblasten zu Myofibroblasten triggern könnte [9, 10, 98, 100]. Die Aktivierung von PAR-3 in pulmonalen Fibroblasten könnte auch PAR-2 als Cofaktor dienen und PAR-2-induzierte fibrotische Umbauprozesse in der Pathogenese der IPF fördern. So könnte beispielsweise die von PAR-2 durch den FVIIa/ TF-Komplex geförderte Sezernierung profibrotischer Faktoren durch Aktivierung der Gerinnungskaskade und Produktion extrazellulärer Matrix aus lokalen Fibroblasten getriggert werden [24]. So wurde eine Rolle als Cofaktor von PAR-3 für PAR-2 bei humanen Podozyten beschrieben [78]. Einer möglichen Rolle von PAR-3 als Cofaktor von PAR-1 und PAR-2 in pulmonalen Fibroblasten steht jedoch die immunhistochemisch getroffene Feststellung gegenüber, dass PAR-3 in diesen Zelltypen nur sehr schwach angefärbt wurde und auch keine signifikante Exprimierung von PAR-3 in lokalen Fibroblasten nachgewiesen werden konnte. Die bereits zitierten Studien konnten allerdings aufzeigen, dass eine signifikant verstärkte PAR-3-Expression nicht notwendig ist, damit er Cofaktor zu den anderen PARs fungieren kann

[9, 10, 98, 100]. Daher sind zukünftige Forschungsschritte notwendig, um die mögliche Rolle von PAR-3 als Cofaktor zu PAR-1 und PAR-2 in Lungenfibroblasten zu eruieren. In den hyperplastischen Typ-II Pneumozyten sind PAR-1 und PAR-2 ebenfalls exprimiert, jedoch im Rahmen der IPF nicht signifikant gesteigert [24]. Typ-II-Pneumozyten exprimieren unter anderem verstärkt FX, TGF- β 1 und Endothelin 1. Dies sind Mediatoren, welche die EMT steigern und die Apoptose von Myofibroblasten reduzieren [52, 77]. Daher könnte PAR-3 als Cofaktor für PAR-1 an der EMT des alveolären Epithels zu Myofibroblasten beteiligt sein und die PAR-1-getriggerten Signalkaskaden verstärken. So steigerte die Stimulierung von Typ-II Pneumozyten mit Thrombin die EMT dieser Zellen, wobei möglicherweise auch die von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 gesteuerten Signalkaskaden getriggert wurden [56]. In der gleichen Studie zeigte ein simultaner Knockdown von PAR-1 und PAR-3 im Mausmodell, dass die sezernierenden Prozesse, welche die EMT triggern, nahezu komplett unterbunden wurden. Ein singulärer Knockdown jedes einzelnen der PARs hingegen zeigte ein wesentlich geringerer Effekt auf die EMT der Typ-II Pneumozyten. Weiterhin fand sich immunhistochemisch eine Co-Lokalisation von PAR-1 und PAR-3 in den pulmonalen Geweben, insbesondere auch in den hyperplastischen alveolären Geweben [56]. Die Studie zeigte zudem auf, dass eine signifikante Expression von PAR-1 in den hyperplastischen Typ-II Pneumozyten nicht notwendig scheint, um profibrotische Prozesse zu aktivieren [56].

Da PAR-3 aktuell der einzig signifikant erhöhte Rezeptor der PAR-Familie in den hyperplastischen Typ-II Pneumozyten zu sein scheint, sollte als weitere Hypothese formuliert werden, dass PAR-3 mit zellulären Rezeptoren Verbindungen eingehen könnte, welche nicht der PAR-Familie angehören. So könnte PAR-3 diesen, bisher nicht identifizierten Rezeptoren als Cofaktor dienen und damit die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die Proliferation bzw. Apoptose in den hyperplastischen Typ-II Pneumozyten triggern. Allerdings wurde bisher noch nicht der wissenschaftliche Beweis erbracht, dass PAR-3 mit Rezeptoren außerhalb der PAR-Familie Signalkaskaden aktiviert, daher bedarf es hier zukünftiger Studien.

Eine weitere höchst spekulative Hypothese ist, dass in den hyperplastischen Typ-II Pneumozyten eine autonome PAR-3-Aktivierung stattfinden könnte, welche die profibrotischen und transformierenden Prozesse der Zellen in Gang setzt. Eine autonome PAR-3-Aktivität wurde bereits nachgewiesen. So wurde eine Interleukin-8-

Induktion in Human Embryonic Kidney-293 Zellen durch eine autonome PAR-3-Aktivierung beobachtet [49]. Weiterhin fand man eine durch Thrombin-induzierte Insulinsekretion mittels PAR-3 [79].

PAR-4 wird zum aktuellen Zeitpunkt insbesondere in der Entstehung von inflammatorischen Prozessen sowie bei der Aktivierung und Steuerung der Thrombozytenfunktion intensiv erforscht. [9-11, 14] Im Mausmodell zeigte sich, dass die über Thrombin-induzierte PAR-4 Aktivierung entscheidend ist für eine Thrombozyten-vermittelte akute Inflammation [72, 75]. Ergänzend dazu wurde nachgewiesen, dass im Mausmodell eine Inhibierung von PAR-4 die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten reduziert [83, 84]. Bei humanen Thrombozyten konnte eine PAR-1 und PAR-4-vermittelte Stimulierung der Thrombozytenfunktion und -sekretion aufgezeigt werden [9-11, 21,85, 86]. Im Rahmen pulmonaler Krankheitsbilder gibt es über die Rolle von PAR-4 bisher ebenfalls sehr wenige Kenntnisse. So wurde eine erhöhte PAR-4 Expression bei akuter Lungenschädigung durch Endotoxin im Rattenmodell beobachtet [33]. Im Mausmodell konnte eine PAR-4 vermittelte Limitierung von Bakterienwachstum im späten Stadium einer Streptokokken-Pneumonie nachgewiesen werden [87].

Die PAR-4-Expression zeigt sich in den Untersuchungen zur Expression bei der IPF in den humanen Proben nicht signifikant verändert. Im Tiermodell der Bleomycin-induzierten Fibrose bei Mäusen zeigt sich im zeitlichen Verlauf ein Abfall der PAR-4 Konzentration in der frühen inflammatorischen Phase, jedoch keine signifikante Veränderung in der späten fibrotischen Phase. Möglicherweise ist dies ein Hinweis, dass PAR-4 im Rahmen von inflammatorischen Prozessen im Anfangsstadium der Erkrankung eine Rolle spielen könnte, beispielsweise als Cofaktor von PAR-1 bei Thrombozyten-vermittelter akuter Inflammation [72, 75]. Bei den Prozessen in der späten fibrotischen Phase scheint PAR-4 nach Erkenntnissen des gewählten Tiermodells nicht beteiligt zu sein. Zwar gibt es in früheren Studien Hinweise, dass nach entsprechender Stimulierung durch PAR-4 alveoläre Zellen vermehrt zur Transition mittels EMT angeregt werden [14, 34]. Es wurde jedoch ebenfalls nachgewiesen, dass ein singulärer Knockdown von PAR-4 keinerlei Auswirkung auf die EMT bei murinen Pneumozyten-Typ II hatte [56]. Dies Ergebnis stützt eine weitere Studie, welche im Mausmodell der Bleomycin-induzierten Fibrose bei einer Inhibition von PAR-4 keinen Schutz vor einer Krankheitsentwicklung aufzeigte [88]. Somit scheint nach den

Erkenntnissen dieser Arbeit fraglich, ob und inwieweit PAR-4 an der Pathogenese der IPF beteiligt ist.

Mögliche zukünftige Studien sollten daher die Rolle der PARs und deren ausgelöste Signalkaskaden weiter detailliert untersuchen. Daneben sollte exploriert werden, inwieweit eine Beteiligung der PARs an den drei vermuteten Hypothesen der Myofibroblasten-Rekrutierung zutreffen und welche Gewichtung sie dabei in der Pathogenese einnehmen. Dadurch würde auch die Gewichtung der einzelnen PARs zueinander und im Verhältnis zu anderen beteiligten Faktoren genauer eingegrenzt werden können. Insbesondere sollte auch ein Augenmerk auf die verstärkte Expression von PAR-3 in den hyperplastischen Typ-II Pneumozyten gesetzt werden und die von den diesen Zellen in Gang gesetzten Signalkaskaden genauer differenziert werden. So könnten *in vivo* Studien mittels PAR-3-Knockdown bzw. medikamentöse Inhibition von PAR-3 die Effekte auf die Krankheitsentwicklung näher erforschen, ähnlich wie dies bereits im Fall von PAR-1 und PAR-2 mit dem PAR-2 Antagonisten P2pal-18S erfolgreich durchgeführt wurde [92, 93]. Langfristig könnte die klinische und pharmazeutische Entwicklung von weiteren selektiven PAR- Antagonisten eine mögliche Strategie sein, um zukünftig die Therapieoptionen für Patienten mit einer idiopathischen Lungenfibrose zu erweitern.

4.2 Expression der PARs bei Idiopathischer Pulmonal-arterieller Hypertonie (IPAH) und ihre mögliche pathophysiologische Bedeutung

Die idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie ist definiert über einen in der Rechtsherzkatheteruntersuchung (RHK) gemessenen mittleren pulmonal-arteriellen Druck (mPAP) ≥ 25 mmHg [36, 37, 52]. Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt ca. 3 Jahre, wobei der Tod durch eine der zahlreichen Komplikationen beispielsweise bei Rechtsherzversagen bei Cor pulmonale eintritt. Die nichtinvasive Diagnostik erfolgt unter anderem mittels transthorakaler Echokardiographie, als Goldstandard dient der Rechtsherzkatheter zur genauen Messung der wichtigsten hämodynamischen Parameter wie des pulmonalarteriellen sowie rechtsarteriellen Druckes und des Herzzeitvolumens [36, 37, 52]. Histopathologisch zeichnet sich die IPAH durch eine Verdickung aller der Gefäßschichten der pulmonalen Gefäße aus, wobei insbesondere eine Proliferation der

glatten Muskulatur als auch der Endothelzellen und Fibroblasten zu beobachten ist. Dies führt zu bindegewebigen Umbauprozessen und Gefäßsklerose, wodurch die Wahrscheinlichkeit für in situ- Thrombosierung erhöht wird [12, 29, 39, 40].

Die Rolle von PAR-1 an der Pathogenese der IPAH ist umstritten. Eine Beteiligung von PAR-1 an vasokonstriktiven Prozessen sowie an der Entstehung von vermehrten thrombotischen Komplikationen wird diskutiert [20, 21, 31, 32]. Die Aktivierung von PAR-1-getriggerten Signalkaskaden an thromboembolischen Ereignissen im Rahmen der vaskulären bzw. kardialen Arteriosklerose wird aktuell intensiv erforscht und hier gibt es bereits vielversprechende Therapieansätze, bspw. mit dem PAR-1 Antagonisten Vorapaxar [105, 106]. PAR-2 scheint in der Pathogenese der IPAH insbesondere an Proliferation und Hypertrophie der glatten Muskulatur nach Aktivierung durch Tryptase essentiell beteiligt zu sein. Eine signifikant verstärkte Expression von PAR-2 in der glatten Muskulatur von IPAH-Patienten wurde bereits nachgewiesen [12, 97]. Zudem gibt es Studien welche zeigen, dass PAR-2 nach Aktivierung durch FXa in glatten Muskelzellen und Endothelzellen verstärkt exprimiert wird [103, 104]. Über die Expression von PAR-3 und PAR-4 bei der IPAH gab es bis dato keine Erkenntnisse. Die Daten dieser Arbeit legen dar, dass PAR-3 bei IPAH-Patienten, insbesondere in den pathologisch hypertrophierten glatten Muskelzellen des Gefäßsystems, signifikant exprimiert wird. PAR-3 wird durch Thrombin in seine aktive Form überführt; Thrombin wiederum wird durch FXa aktiviert, welches bei IPAH-Patienten nach den Daten dieser Arbeit signifikant exprimiert wird. Somit scheint die PAR-3 Aktivierung möglicherweise unter anderem durch eine Exazerbation der Gerinnung verursacht zu werden.

Die in den humanen Daten festgestellte signifikant erhöhte PAR-3- Expression konnte jedoch durch das gewählte Tiermodell nicht bestätigt werden. Für diese Divergenz zwischen humanen und murinen Daten kann es mehrere Erklärungsansätze geben. Das gewählte Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie ist kein explizit zur Simulierung der IPAH entwickeltes Modell. So zeigen sich hierbei substantielle Unterschiede zur Histopathologie der IPAH-Patienten. Das vaskuläre Remodelling ist im Mausmodell nur minimal ausgeprägt, während das vaskuläre Remodelling der Intima und Media essentiell für die Entwicklung der pulmonalen Hypertonie beim Menschen ist. Weiterhin zeigen sich Verdickung der Adventitia und fibrotische Veränderungen im Mausmodell eher im Bereich der proximalen pulmonalen Arterien,

während bei IPAH-Patienten diese Veränderungen eher im Bereich der distalen pulmonalen Arterien zu finden sind [29, 102]. Bisher gelang es weiterhin nicht, im Mausmodell die für die IPAH typischen irreversiblen fibrotischen Veränderungen der Intima sowie die plexiformen Läsionen der Gefäße zu simulieren [102] oder auch nur Ansatzweise die kardiale rechtsventrikuläre Hypertrophie, welche bei IPAH-Patienten essentiell ist, im Mausmodell geeignet nachzuvollziehen [101]. Das Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie bei Mäusen könnte daher aus zahlreichen Gründen ungeeignet sein, um eine PAR-3-Expression und eine mögliche pathogenetische Relevanz nachzuweisen. Hier seien einige potentielle Möglichkeiten genannt:

Der gewählte Zeitrahmen von 21 Tagen, in dem die Tiere einer Hypoxie ausgesetzt waren, könnte zu kurz gewählt worden sein, um pathogenetisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Eine signifikante Expression von PAR-3 könnte erst zu einem späteren Zeitpunkt bzw. in einem höheren Stadium der Krankheitsentwicklung erfolgen. Bisher haben jedoch frühere Studien gezeigt, dass nach 21 Tagen unter Hypoxie im Rahmen des Mausmodells der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie die Endstufe der möglichen Krankheitsentwicklung erreicht werden konnte [101, 107, 108]. Die Schwere der simulierten Gewebeschädigung durch Proliferation bzw. Hypertrophie bzw. das vaskuläre Remodelling der glatten Muskulatur der Gefäße könnte nicht ausgereicht haben, um eine verstärkte PAR-3-Expression zu induzieren. Die Art bzw. Konzentration an Proteasen oder anderen Transmittern, welche eine Aktivierung von PAR-3 zur Folge hätten, könnten sich zwischen murinen und humanen Lungengeweben signifikant unterscheiden. So wurde möglicherweise die signifikante PAR-3-Expression bei den IPAH-Patienten nicht durch Signalkaskaden aktiviert, welche durch die chronische Hypoxie induziert werden, sondern durch andere pathogenetisch relevante Faktoren ausgelöst. Eventuell sind bei IPAH-Patienten Alterungsprozesse, exogene Noxen oder eine stärkere inflammatorische Reaktion auf dem Boden einer vermehrten Schädigung der Lungengewebe ursächlich für eine signifikante Expression von PAR-3. Auch eine Exazerbation der Gerinnungskaskade könnte für die Krankheitsentwicklung beim Menschen ursächlich sein. Diese These stützt die in dieser Arbeit getroffene Beobachtung, dass der Thrombin-stimulierende FXa bei IPAH-Patienten signifikant erhöht ist, im Tiermodell jedoch keine signifikante Expression festgestellt werden konnte. Zusammenfassend lässt sich daher formulieren, dass die Unterscheide zwischen

humanen Daten und den divergenten Ergebnissen des Tiermodells möglicherweise durch die Unzulänglichkeiten des gewählten Modells bedingt sind. Alternative Ansätze, beispielweise der Wechsel auf eine andere Tierart oder ein anderer Modus der Krankheitssimulation, könnten zukünftig die humanen Daten bestätigen bzw. widerlegen.

Da sich in den humanen Daten eine signifikante Expression von PAR-3 nachweisen ließ, seien mögliche Ansätze einer Beteiligung von PAR-3 an der Pathogenese der IPAH im Folgenden genannt: Es besteht die Möglichkeit, dass PAR-3 als Cofaktor von PAR-1 bzw. PAR-2 im Rahmen der IPAH fungiert. Die Aktivität von PAR-3 als Cofaktor von PAR-1 konnte bereits aufgezeigt werden, so scheint im Nervensystem von Mäusen PAR-3 als Cofaktor von PAR-1 über den von aktiviertem Protein C-vermittelten Signalweg die Neurone vor Apoptose zu schützen [72, 74].

PAR-3 könnte auch in der Pathogenese der IPAH autonom Signalkaskaden aktivieren und dadurch möglicherweise die Proliferation und Migration der glatten Muskulatur verstärken. So wurde eine Interleukin-8-Induktion in Human Embryonic Kidney-293 Zellen durch eine autonome PAR-3-Aktivierung beobachtet [49]. Weiterhin fand man eine durch Thrombin-induzierte Insulinsekretion mittels PAR-3 [79]. Auch die Aktivierung und Triggerung von Rezeptoren, welche nicht zur PAR-Familie gehören, kann als mögliche pathogenetische Relevanz in Betracht gezogen werden. Diese These ist jedoch sehr spekulativ, da es hierzu bis dato keine wissenschaftlichen Erkenntnisse gibt.

Aufgrund der experimentellen Datenlage gibt es aktuell nahezu keine Hinweise darauf, dass pathogenetisch relevante Mechanismen existieren, welche zur Krankheitsentwicklung mithilfe einer Aktivierung von PAR-4 beitragen könnten. Aufgrund der Kenntnis, dass bei hohen Thrombinkonzentrationen eine PAR-4-vermittelte verstärkte Thrombozytenaggregation auftritt [9, 10, 13, 21], kann man darüber spekulieren, ob PAR-4 über diesen Mechanismus im Rahmen der IPAH zur Entstehung der in-situ Thrombosierung beiträgt. So könnte wie im Fall der chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie, deren Ätiologie auch weitestgehend unbekannt ist [109], die Entstehung von Thromben eine mögliche Ursache bzw. entscheidend für die Schwere der Krankheitsentwicklung sein. Ausgelöst durch eine PAR-4-vermittelte Plättchenaggregation im Rahmen einer exazerbierten Gerinnung

könnte die Formation von Thromben zudem auch wesentlichen Einfluss auf Histopathologie beispielsweise die Verdickung der Endothelgefäße nehmen.

Zukünftige Studien sollten andere Tiermodelle zur Untersuchung der PAR-3- bzw. PAR-4-Expression in Erwägung ziehen. So könnte möglicherweise der Wechsel auf das Rattenmodell der Monocrotaline-induzierten pulmonalen Hypertonie genaueren Aufschluss über die PAR-3-Expression geben [102]. In einem zukünftigen Tiermodell sollten generell ein schmales pulmonal-arterielles Gefäßlumen nach Obliteration, die Nichtreversibilität der pulmonal-arteriellen Hypertonie und auch die rechtsventrikuläre Hypertrophie nachvollzogen werden können [101, 102].

Ob und inwieweit PAR-4 an der Pathogenese der IPAH tatsächlich beteiligt ist, könnte an einem zukünftigen Tiermodell mittels gezieltem PAR-4 Knockdown möglicherweise erkannt werden. Weiterhin sollten die durch PAR-3 vermittelten Signalkaskaden genauer erforscht und deren potentielle Rolle in der Pathogenität der IPAH ermittelt werden. *In vivo* Studien könnten mittels PAR-3-Knockdown bzw. medikamentöser Inhibition von PAR-3 die Effekte auf die Krankheitsentwicklung näher erforschen. Die langfristige klinische und pharmazeutische Entwicklung von selektiven PAR-Antagonisten könnte eine mögliche Strategie zu sein, um zukünftig die Therapieoptionen für Patienten erweitern und dadurch den Krankheitsverlauf zu verlangsamen oder gar komplett aufzuhalten.

5. Zusammenfassung

Die idiopathische pulmonale Fibrose und die Idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie sind prognostisch ungünstige Krankheitsbilder unklarer Ätiologie, über deren histopathologische Mechanismen aktuell wenig bekannt ist. Bei beiden Krankheitsbildern scheint eine gestörte Gerinnungssituation an der Pathogenese beteiligt zu sein und an der Bildung von interstitiellem Lungenparenchym bzw. beim vaskulären Remodelling der pulmonalen Strombahn beizutragen.

Die bisher entdeckten 4 Mitglieder der Familie der PARs sind ubiquitär auf nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers vertreten und werden durch die Gerinnungsfaktoren verstärkt aktiviert.

Eine mögliche Rolle von PAR-1 und PAR-2 bei der Vermittlung zellulärer profibrotischer bzw. des vaskulären Remodellings fördernde Effekte wurde bereits in früheren Studien gezeigt. In der vorliegenden Dissertation wurde die Expression von PAR-3 und PAR-4 in der Pathogenese der IPF bzw. IPAH untersucht.

Die Ergebnisse zur Expression von PAR-3 zeigen, dass PAR-3 bei der IPF sowohl bei humanen Patienten als auch im Mausmodell der Bleomycin-induzierten Fibrose signifikant erhöht ist. Insbesondere in den hyperplastisch veränderten Typ-II Pneumozyten scheint eine verstärkte Expression im Krankheitsfall stattzufinden. Die Datenlage zur Expression von PAR-3 bei der IPAH ist nicht eindeutig. Die humanen Daten zeigen eine signifikante Expression vor allem in den hypertrophierten glatten Muskelzellen. Diese Signifikanz lässt sich jedoch im gewählten Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie nicht bestätigen.

Die Expression von PAR-4 ist bei beiden Krankheitsbildern nicht signifikant erhöht.

Somit bleibt es Teil zukünftiger Forschungsarbeit, die genauen Signalkaskaden nachzuweisen, an denen PAR-3 bei beiden Krankheitsbildern beteiligt und inwieweit die erhöhte Expression relevant für die Krankheitsentwicklung ist. Weiterhin könnte im Tierversuch bei Mäusen *in vivo* mittels PAR-3 Knockout bzw. medikamentöse Inhibition die potentielle Auswirkung auf die Krankheitsentwicklung beobachtet werden.

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) are lung diseases characterized by a poor prognosis and unclear aetiology. Underlying molecular mechanisms leading to the development of IPF and IPAH are barely understood. However, abnormalities in haemostasis seem to play a role in the pathogenesis of both diseases as they may influence pathologic remodelling of lung parenchyma and pulmonary vessels. Protease activated receptors (PARs) are found in almost all types of cells. Up to date four PAR receptors have been described. PARs are activated by proteases mainly belonging to the coagulation system. Recent studies show that PAR-1 and PAR-2 play a role in mediating profibrotic processes and vascular remodelling.

This study focus on the characterisation of the expression of PAR-3 and PAR-4 in the lungs of IPF and IPAH patients as well as mice subjected to bleomycin-induced lung injury or exposed to hypoxia. Results show significantly elevated expression of PAR-3 in the lungs of IPF-patients and mice administrated with bleomycin, mainly attributable to hyperplastic alveolar type II cells (ATII). In IPAH increased expression of PAR-3 was predominantly observed in hypertrophic smooth muscle cells of pulmonary vessels, no such alterations were visible in the animal model of hypoxia-induced pulmonary hypertension.

No changes were found in PAR-4 expression in both diseases.

Future studies, employing PAR-3 knockouts and pharmacological inhibitors, are required to find out the possible role of PAR-3 in the pathogenesis of IPF and IPAH, especially in regard to its significantly elevated expression in AT II cells and hypertrophic smooth muscle cells of pulmonary vessels.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALK 1	Activin receptor-like kinase 1
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatous-polyposis-coli
AT II	Alveolar Type II Zellen
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
BMPR	Bone morphogenetic protein receptor
BNP	Natriuretisches Peptid Typ B
BSA	Bovine serum albumine
CAV 1	Caveolin 1
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI	cardiac index
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronic obstruktive pulmonary disease
CTEPH	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
DCO	Kohlenmonoxid- Diffusionskapazität
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPLD	Diffuse parenchymal lung disease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Faktor
FP	Vorwärts Primer
FVC	forcierte expiratorische Vitalkapazität
g	Schwerebeschleunigung

HCl	Hydrogenchlorid
HEK	Human Embryonic Kidney Zellen
HOX	Hypoxie
HPAH	Hereditäre pulmonal-arterielle Hypertonie
HRCT	High-Resolution Computertomographie
hu	human
INR	International Normalized Ratio
IPAH	Idiopathische Pulmonal-arterielle Hypertonie
IPF	Idiopathische Pulmonale Fibrose
IZM	Intrazelluläre Matrix
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KCNK3	potassium channel, subfamily K, member 3
m	Maus
m	männlich
mA	milli Ampere
mM	milli Mol/ Liter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
ml	milliliter
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	mittlerer pulmonaler arterieller Druck
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
Na_3VO_4	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
ng	nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	Normoxie
NYHA	New York Heart Association
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PAI- 1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PAR	Protease aktivierter Rezeptor
PBGD	Porphobilinogen Deaminase

PCH	pulmonale kapilläre Hämangiomatose
PDGF	Platelet-derived growth factor
PH	Pulmonale Hypertonie
PVOD	Pulmonale veno-okklusive Erkrankung
proSP- C	Pro surfactant Protein-C
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVR	pulmonary vascular resistance
qPCR	Realtime-Polymerasekettenreaktion
RHK	Rechtsherzkatheter
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Rückwärts Primer
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
SMAD9	mothers against decapentaplegic homolog 9
SMC	Smooth Muscle Cell
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor – α
TXA ₂	Thromboxan A ₂
UIP	Usual Interstitial Pneumonia
UV	ultraviolett
VATS	Videoassestierte Thorakoskopie
vWF	von Willebrand Faktor
w	weiblich
μ l	mikroliter

7. **Abbildungsverzeichnis**

1. Die Zell- basierte Gerinnung	Seite 4
2. Darstellung der Aktivierungsprozesse an einem PAR	Seite 7
3. Signifikante Expression von PAR-3 in Lungengeweben von IPF-Patienten	Seite 37
4. Signifikante Erhöhung von PAR-3 in humanen Pneumozyten Typ II	Seite 38
5. Keine Veränderung in der Expression von PAR-4 in Lungengeweben von IPF-Patienten	Seite 39
6. Keine Veränderung in der Expression von PAR-4 in humanen Fibroblasten und Typ-II Pneumozyten von IPF-Patienten	Seite 40
7. Verstärkte Expression von PAR-3 in Lungen von Bleomycin- behandelten Mäusen	Seite 42
8. PAR-3 ist in murinen Fibroblasten nicht erhöht	Seite 43
9. PAR-3 ist in murinen Typ-II Pneumozyten signifikant erhöht	Seite 44
10. Keine Veränderung der Expression von PAR-4 in fibrotischen Lungen von Bleomycin-behandelten Mäusen	Seite 45
11. Keine Veränderung der Expression von PAR-4 in murinen Fibroblasten	Seite 46
12. Keine Veränderung der Expression von PAR-4 in murinen Typ-II Pneumoyzten	Seite 47
13. PAR-3 ist im Lungenhomogenat von IPAH-Patienten signifikant erhöht	Seite 48
14. PAR-4 ist im Lungenhomogenat von IPAH-Patienten nicht erhöht	Seite 50
15. Die Levels von FVIIa ändern sich nicht in den Lungengeweben von IPAH-Patienten im Vergleich zu Spendern	Seite 51
16. Die Levels von FXa sind in den Lungengeweben von IPAH- Patienten im Vergleich zu Spendern gesteigert	Seite 51
17. ELISA von FVII und FX	Seite 52
18. Keine Änderung der Expression von PAR-3 im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	Seite 54

19. Keine Änderung der Expression von PAR-4 im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	Seite 55
20. Keine Änderung der Levels von FVII bzw. FVIIa im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	Seite 56
21. Keine Änderung der Levels von FX bzw. FXa im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	Seite 57

8. Tabellenverzeichnis

1. Klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie nach Nizza	Seite 18
2. Klinische und demographische Charakteristika der Organspender	Seite 23
3. Klinische und demographische Charakteristika der Blutspender	Seite 24
4. Klinische und demographische Charakteristika der IPF-Patienten (Organspender)	Seite 24
5. Klinische und demografische Charakteristika der IPAH-Patienten (Organspender)	Seite 25
6. Klinische und demographische Charakteristika der IPAH-Patienten (Blutspender)	Seite 25
7. Komponenten zur c-DNA Synthese	Seite 33
8. Tabelle 8: Komponenten zur qPCR	Seite 33
9. Tabelle 9: Verwendete Primersequenzen	Seite 35

9 Literaturverzeichnis

- 1 Herold G (Hrsg.). *Innere Medizin*. Köln: Herold, 2010.
- 2 Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature*; 1964: 202.
- 3 Davie EW ROD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 1964; 1964:145
- 4 Romney G, Glick M. An updated concept of coagulation with clinical implications. *Journal of the American Dental Association*. 2009; 140: 567–574.
- 5 Hoffman M. Remodeling the Blood Coagulation Cascade. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2003; 16: 17–20.
- 6 Ferreira CN, de Oliveira Sousa M, Sant´Ana Dusse LM, das Gracas Carvalho, M. A cell-based model of coagulation and its implications. *Revista brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2010; 32: 416–421.
- 7 Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood Coagulation: Hemostasis and Thrombin Regulation. *Anesthesia & Analgesia*. 2009; 108: 1433–1446.
- 8 Dahlbäck B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of Internal Medicine*. 2005; 257: 209–223.
- 9 Coughlin SR. Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000; 407: 258–264.
- 10 Hirano KKH. Role of Protease-activated Receptors in the Vascular System. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2003; 10: 211–225.
- 11 Cirino G, Cicala C, Bucci MR, Sorrentino L, Maraganore JM, Stone SR. Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. *Journal of Experimental Medicine*. 1996; 183: 821–827.
- 12 Kwapiszewska G, Markart P, Dahal BK, Kojonazarov B, Marsh LM, Schermuly RT, Taube C, Meinhardt A, Ghofrani HA, Steinhoff M, Seeger W, Pressner KT, Olschewski A, Weissmann A, Weissmann N, Wygrecka M. PAR-2 Inhibition Reverses Experimental Pulmonary Hypertension. *Circulation Research*. 2012; 110: 1179–1191.
- 13 Ramachandran R, Hollenberg MD. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 153: 5263–5282.
- 14 Ramachandran R, Noorbakhsh F, DeFea K, Hollenberg MD. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012; 11: 69–86.
- 15 Macfarlane SR. Proteinase-Activated Receptors. *Pharmalogical Reviews*. 2001; 53: 245–282.

- 16 Mackie EJ, Pagel CN, Smith R, die Niese MR, Song SJ, Pike RN. Protease-Activated Receptors: A Means of Converting Extracellular Proteolysis into Intracellular Signals. *IUBMB Life*. 2002; 53: 277–281.
- 17 Sokolova E, Reiser G. A novel therapeutic target in various lung diseases: Airway proteases and protease-activated receptors. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007; 115: 70–83.
- 18 Trejo J, Hammes SR, Coughlin SR. Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Cell Biology*. 1998; 95: 13698–13702.
- 19 Böhm SK. Mechanisms of Desensitization and Resensitization of Proteinase-activated Receptor-2. *The Journal of biological Chemistry*. 1996; 271: 22003–22016.
- 20 Steinhoff M. Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. *Endocrine Reviews*. 2005; 26(1): 1–43.
- 21 Dugina TN, Kiseleva EV, Chistov IV, Umarova BA, Strukova SM. Receptors of the PAR Family as a Link between Blood Coagulation and Inflammation. *Biochemistry*. 2002; 67: 77–87.
- 22 Peters T, Henry PJ. Protease-activated receptors and prostaglandins in inflammatory lung disease. *British Journal of Pharmacology*. 2009; 158: 1017–1033.
- 23 Wygrecka M, Jablonska E, Guenther A, Preissner KT, Markart P. Current view on alveolar coagulation and fibrinolysis in acute inflammatory and chronic interstitial lung diseases. *Thrombosis and Haemostasis*. 2008; 99: 494–501.
- 24 Wygrecka M, Kwapiszewska G, Jablonska E, Gerlach S, Henneke I, Zakrzewicz D, Guenther A, Preissner KT, Markart P. Role of Protease-activated Receptor-2 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011; 183: 1703–1714.
- 25 Wygrecka M, Markart P, Ruppert C, Petri K, Preissner KT, Seeger W, Guenther A. Cellular origin of pro-coagulant and (anti)-fibrinolytic factors in bleomycin-injured lungs. *European Respiratory Journal*. 2007; 29: 1105–1114.
- 26 Kotani I. Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thrombosis Research*. 1995; 77: 493–504.
- 27 Olman MA. Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1995; 96: 1621–1630.
- 28 Wygrecka M, Morty RE, Markart P, Kanse SM, Andreasen PA, Wind T, Guenther A, Preissner KT. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is an Inhibitor of Factor VII-activating Protease in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282: 21671–21682.
- 29 Firth AL, Mandel J, Yuan JXJ. Idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Disease Models & Mechanisms*. 2010; 3: 268–273.

- 30 Howell DJC, Johns RH, Lasky JA, Shan B, Scotton CJ, Laurent GJ, Chambers RCf. Absence of Proteinase-Activated Receptor-1 Signaling Affords Protection from Bleomycin-Induced Lung Inflammation and Fibrosis. *American Journal of Pathology*. 2005; 166: 1353–1365.
- 31 Maki J, Hirano M, Hoka S, Kanaide H, Hirano K. Thrombin activation of proteinase-activated receptor 1 potentiates the myofilament Ca²⁺ sensitivity and induces vasoconstriction in porcine pulmonary arteries. *British Journal of Pharmacology*. 2010; 159: 919–927.
- 32 Maeda NY, Carvalho JH, Otake AH, Mesquita SM, Bydlowski SP, Lopes AA. Platelet protease-activated receptor 1 and membrane expression of P-selectin in pulmonary arterial hypertension. *Thrombosis Research*. 2010; 125: 38–43.
- 33 Jesmin S, Gando S, Zaedi S, Sakuraya F. Differential Expression, Time Course and Distribution of Four PARs in Rats with Endotoxin-induced Acute Lung Injury. *Inflammation*. 2007; 30: 14–27.
- 34 Ando S, Otani H, Yagi Y, Kawai K, Araki H, Fukuhara S, Inagaki C. Proteinase-activated receptor 4 stimulation-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Respiratory Research*. 2007; 8: 31.
- 35 Ramachandran R, Sadofsky LR, Xiao Y, Botham A, Cowen M, Morice AH. Inflammatory mediators modulate thrombin and cathepsin-G signaling in human bronchial fibroblasts by inducing expression of proteinase-activated receptor-4. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2007; 292: L788 – 798.
- 36 Olschewski H, Hoeper MM, Borst MM, Ewert R, Grünig E, Kleber FX, Kopp B, Opitz C, Reichenberger F, Schmeisser A, Schranz D, Schulze-Neick I, Wilkens H, Winkler J, Worth H. Diagnostik und Therapie der chronischen pulmonalen Hypertonie. *Pneumologie*. 2006; 60: 749–771.
- 37 Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Weissmann N, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F. Hypoxia- and non-hypoxia-related pulmonary hypertension: Established and new therapies. *Cardiovascular Research*. 2006; 72: 30–40.
- 38 Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009; 54: 43–54.
- 39 Johnson SR, Granton JT, Mehta S. Thrombotic Arteriopathy and Anticoagulation in Pulmonary Hypertension. *Chest*. 2006; 130: 545–552.
- 40 Pullamsetti SS, Savai R, Janssen W, Dahal BK, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA, Weissmann N, Schermuly RT. Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011; 17: 7–14.

- 41 Sahara M, Takahashi T, Imai Y, Nakajima T, Yao A, Morita T, Hirata Y, Nagai R. New Insights in the Treatment Strategy for Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiovasc Drugs and Therapy*. 2006; 20: 377–386.
- 42 Said SI. Mediators and modulators of pulmonary arterial hypertension. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2006; 291: L547.
- 43 Raghu G, Rochweg B, Zhang Y, Cuello Garcia CA, Azuma A, Behr J, Brozek JL, Collard HR, Cunningham W, Homma S, Martinez TJJ, Myers J, Protzko SL, Richeldi L, Rind D, Selman M, Theodore A, Wells AU, Hoogsteden H, Schünemann HJ. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2015; 192.
- 44 Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunology*. 2009; 2: 103–121.
- 45 Gribbin J, Hubbard RB, Le Jeune I, Smith CJP, West J, Tata LJ. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax*. 2006; 61: 980–985.
- 46 Raghu G. Incidence and Prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006; 174: 810–816.
- 47 Scotton CJ. Molecular Targets in Pulmonary Fibrosis*The Myofibroblast in Focus. *Chest*. 2007; 132: 1311.
- 48 Harari S, Caminati A. IPF: new insight on pathogenesis and treatment. *Allergy*. 2010; 65: 537–553.
- 49 Ostrowska E, Reiser G. The protease-activated receptor-3 (PAR-3) can signal autonomously to induce interleukin-8 release. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008; 65: 970–981.
- 50 Bae J, Rezaie AR. Protease activated receptor 1 (PAR-1) activation by thrombin is protective in human pulmonary artery endothelial cells if endothelial protein C receptor is occupied by its natural ligand. *Thrombosis and Haemostasis*. 2008; 100:101-109.
- 51 King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011; 378: 1949–61.
- 52 Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Noordegraaf AV, Beghetti M, Ghofrani A. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal*. 2016; 37: 67–119.
- 53 Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celemajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machardo RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013; 62: D34-41.

- 54 Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW. Biased signaling of protease-activated receptors. *Frontiers in Endocrinology*. 2014; 5: 1-16.
- 55 Alcorn JL, Smith ME, Smith JF, Margraf LR, Mendelson CR. Primary Cell Culture of Human Type II Pneumonocytes: Maintenance of a Differentiated Phenotype and Transfection with Recombinant Adenoviruses. *American Journal of respiratory cell and molecular biology*. 1997; 17: 672- 682.
- 56 Wygrecka M., Didiasova M, Berscheid S, Piskulak K, Taborski B, Zakrewicz D, Kwapiszewska G, Preissner KT, Markart P. Protease-activated receptors (PAR)-1 and -3 drive epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells – potential role in lung fibrosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2013; 110: 295-307.
- 57 Johnson SR, Granton JT, Mehta S. Thrombotic Arteriopathy and Anticoagulation in Pulmonary Hypertension. *Chest*. 2006; 130: 545-552.
- 58 Huber K, Beckmann R, Frank H, Kneussl M, Mlczoch J, Binder BR. Fibrinogen, t-PA, and PAI-1 plasma levels in patients with pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1994; 150: 929–933.
- 59 Rich S, Hart K. Familial pulmonary hypertension in association with an abnormal hemoglobin: insights into the pathogenesis of primary pulmonary hypertension. *Chest*. 1991; 99: 1208–1210.
- 60 Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1992; 327: 70–75.
- 61 Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1995; 333: 214–221.
- 62 Koli K, Myllarniemi M, Vuorinen K, Salmenkivi K, Ryyänen MJ, Kinnula VL, Keski-Oja J. Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology*. 2006; 169: 61–71.
- 63 White ES, Atrasz RG, Hu B, Phan SH, Stambolic V, Mak TW, Hogaboam CM, Flaherty KR, Martinez FJ, Kontos CD, Toews GB. Negative regulation of myofibroblast differentiation by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006; 173: 112–21.
- 64 Garcia-Alvarez J, Ramirez R, Sampieri CL, Nuttall RK, Edwards DR, Selman M, Pardo A. Membrane type-matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases*. 2006; 23: 13–21.
- 65 Chen P, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009; 108: 1233–43.
- 66 Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Flaherty KR, Hansell DM, Inoue Y, Kim DS, Kolb M, Nicholson AG, Noble PW, Selman M, Taniguchi H, Brun M, Le Maulf F, Girard M, Stowasser S, Schlenker-

- Herceg R, Disse B, Collard HR. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 2014; 370: 2071-82.
- 67 Zhen JP, Wen, FQ, Bai CX, Wan HY, Kang J, Chen P, Yao WZ, Ma XL, Xia L, Raiteri L, Sardina M, Gao Y, Wang BS, Zhong NS. Twice daily N-acetylcysteine 600 mg for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (PANTHEON): a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2014; 2: 187–194.
- 68 Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circulation Research*. 1994; 75: 539–545.
- 69 Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by pdgf inhibition. *Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115: 2811–2821.
- 70 Jablonska E, Markart P, Zakrzewicz, D, Preissner KT, Wygrecka M. Transforming Growth Factor- β 1 Induces Expression of Human Coagulation Factor XII via Smad3 and JNK Signaling Pathways in Human Lung Fibroblasts. *The Journal of biological Chemistry*. 2010; 285: 11638–11651.
- 71 Gonzales L, Angampalli S, Guttentag SH, Beers MF, Feinstein SI, Matlapudi A, Ballard PL. Maintenance of differentiated function of the surfactant system in human fetal lung type II epithelial cells cultured on plastic. *Pediatric Pathology and Molecular Medicine*. 2001; 20: 387-412.
- 72 Adams M, Ramachandran R, Yau MK, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, Hooper JD. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacology & Therapeutics*. 2011; 130: 248–282.
- 73 Arachiche A, de la Fuente M, Nieman T. Calcium Mobilization and Protein Kinase C Activation Downstream of Protease Activated Receptor 4 (PAR4) Is Negatively Regulated By PAR3 In Mouse Platelets. *Plos one*. 2013; 8: 1-10.
- 74 Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernandez JA, Griffin JH, Zlokovic BV. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron*. 2004; 41, 563–572.
- 75 Busso N, Chobaz-Peclat V, Hamilton J, Spee P, Wagtmann N, So A. Essential role of platelet activation via protease activated receptor 4 in tissue factor-initiated inflammation. *Arthritis Research and Therapy*. 2008; 10: R42.
- 76 Andersson-Sjöland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramírez R, Pardo A, Westergren-Thorsson G, Selman M. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008; 40: 2129–40.
- 77 Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research*. 2005; 6: 56.

- 78 Madhusudhan T, Wang H, Straub BK, Gröne E, Zhou Q, Shahzad K, Müller-Krebs S, Schwenger V, Gerlitz B, Grinnell BW, Griffin JH, Reiser J, Gröne HJ, Esmon CT, Nawroth PP, Isermann B. Cytoprotective signaling by activated protein C requires protease-activated receptor-3 in podocytes. *Blood*. 2012; 119: 874-83.
- 79 Hänzelmann S, Wang J, Güney E, Tang Y, Zhang E, Axelsson AS, Nenonen H, Salehi AS, Wollheim CB, Zetterberg E, Berntorp E, Costa IG, Castelo R, Rosengren AH. Thrombin stimulates insulin secretion via protease-activated receptor-3. *Islets*. 2015; 7: e1118195.
- 80 Burnier L, Mosnier LO. Novel mechanisms for activated protein C cytoprotective Activities involving noncanonical activation of protease-activated receptor 3. *Blood*. 2016; 122.5: 807–816.
- 81 Stavenuiter F, Mosnier LO. Noncanonical PAR3 activation by factor Xa identifies a novel pathway for Tie2 activation and stabilization of vascular integrity. *Blood*. 2014;124: 3480-9.
- 82 Jesmin S, Gando S, Zaedi S, Sakuraya F. Chronological expression of PAR isoforms in acute liver injury and its amelioration by PAR2 blockade in a rat model of sepsis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2006; 96: 830-8.
- 83 Gomides LF, Lima OC, Matos NA, Freitas KM, Francischi JN, Tavares JC, Klein A. Blockade of proteinase-activated receptor 4 inhibits neutrophil recruitment in experimental inflammation in mice. *Inflammation Research*. 2014; 63: 935-41.
- 84 Fu Q, Cheng J, Gao Y, Zhang Y, Chen X, Xie J. Protease-activated receptor 4: a critical participator in inflammatory response. *Inflammation*. 2015; 38: 886-95.
- 85 Etulain J, Mena HA, Negrotto S, Schattner M. Stimulation of PAR-1 or PAR-4 promotes similar pattern of VEGF and endostatin release and pro-angiogenic responses mediated by human platelets. *Platelets*. 2015; 26: 799-804.
86. Nylander M, Osman A, Ramström S, Aklint E, Larsson A, Lindahl TL. The role of thrombin receptors PAR1 and PAR4 for PAI-1 storage, synthesis and secretion by human platelets. *Thrombosis Research*. 2012; 129: e51-8.
- 87 de Stoppelaar SF, Van't Veer C, van den Boogaard FE, Nieuwland R, Hoogendijk AJ, de Boer OJ, Roelofs JJ, van der Poll T. Protease activated receptor 4 limits bacterial Growth and lung pathology during late stage Streptococcus pneumoniae induced pneumonia in mice. *Thrombosis and Haemostasis*. 2013; 110: 582-92.
- 88 Borensztajn K, Duitman J, Brüggemann LW, Spek CA. Protease-activated receptor-4 deficiency does not protect against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *European Respiratory Journal*. 2012; 40:1056-7.
- 89 Lin C, von der Thüsen J, Daalhuisen J, ten Brink Marieke, Crestani B, van der Poll T, Borensztajn K, Spek CA. Protease-activated receptor (PAR)-2 is required for PAR-1signalling in pulmonary fibrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2015; 19: 1346-1356.

- 90 Afonso C, Henrique D. PAR3 acts as a molecular organizer to define the apical domain of chick neuroepithelial cells. *Journal of Cell Science*. 2006; 119: 4293-304.
- 91 Borensztajn K, Bresser P, van der Loos C, Bot I, van den Blink B, den Bakker MA, Daalhuisen J, Groot AP, Peppelenbosch MP, von der Thüsen JH, Spek CA. Protease-activated receptor-2 induces myofibroblast differentiation and tissue factor up-regulation during bleomycin-induced lung injury: potential role in pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology*. 2010; 177: 2753–64.
- 92 Wygrecka M, Kwapiszewska G, Jablonska E, von Gerlach S, Henneke I, Zakrewicz, D, Guenther A, Preissner KT, Markart P. The role of proteinase activated receptor-2 in idiopathic pulmonary fibrosis: is there really novel therapeutic potential here?. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2012; 185: 458–9.
- 93 Lin C, von der Thüsen J, Daalhuisen J, ten Brink M, Crestani B, van der Poll T, Borensztajn K, Spek CA. Pharmacological Targeting of Protease-Activated Receptor 2 Affords Protection from Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Molecular Medicine*. 2015; 21: 576 – 583.
- 94 Park YS, Yoo CG. The clinical assessment of protease-activated receptor-2 expression in inflammatory cells from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 2013; 74: 264–8.
- 95 Lin C, Duitman, JW, Daalhuisen J, ten Brink M, von der Thüsen J, van der Poll T, Borensztajn K, Spek CA. Targeting protease activated receptor-1 with P1pal-12 limits bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Thorax*. 2014; 69: 152-60.
- 96 Austin K, Nguyen N, Javid G, Covic L, Kuliopulos A. Noncanonical Matrix Metalloprotease-1-Protease-activated Receptor-1 Signaling Triggers Vascular Smooth Muscle Cell Dedifferentiation and Arterial Stenosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288: 23105–23115.
- 97 Berger P, Perng DW, Thabrew H, Compton SJ, Cairns JA, McEuen AR, Marthan R, Tunon de Lara JM, Walls AF. Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway Smooth muscle cells. *Journal of Applied Physiology*. 2001; 91:1372–9.
- 98 Lin H, Liu, AP, Smith TH, Trejo J. Cofactoring and Dimerization of Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacological Reviews*. 2013; 65: 1198–1213.
- 99 Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schönemann HJ. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011; 183: 788–824.

- 100 Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*. 2000; 404: 609–613.
- 101 Gomez-Arroyo J, Saleem SJ, Mizuno S, Syed AA, Bogaard HJ, Abbate A, Taraseviciene-Stewart L, Sung Y, Kraskauskas D, Farkas D, Conrad DH, Nicolls MR, Voelkel NF. A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2012; 302: L977–L991.
- 102 Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2009; 297: L1013-32.
- 103 Jobi K, Rauch BH, Dangwal S, Freidel K, Doller A, Eberhardt W, Fischer JW, Schrör K, Rosenkranz AC. Redox regulation of human protease-activated receptor-2 by activated factor X. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 51: 1758–1764.
- 104 Rana S, Yang L, Hassanian SM, Rezaie AR. Determinants of the Specificity of Protease-activated Receptors 1 and 2 Signaling by Factor Xa and Thrombin. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012; 113: 977–984.
- 105 Arif SA, D'Souza J, Gil M, Gim S. Vorapaxar for reduction of thrombotic cardiovascular events in myocardial infarction and peripheral artery disease. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2015; 72:1615-22.
- 106 Tantry US, Liu F, Chen G, Gurbel PA. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombosis. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2015; 13:1293-1305.
- 107 Yu L, Hales CA. Hypoxia Does neither Stimulate Pulmonary Artery Endothelial Cell Proliferation in Mice and Rats with Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling nor in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells. *Journal of Vascular Research*. 2011; 48: 465–475.
- 108 Vanderpool RR, Kim AR, Molthen R, Chesler NC. Effects of acute Rho kinase inhibition on chronic hypoxia-induced changes in proximal and distal pulmonary arterial structure and function. *Journal of Applied Physiology*. 2011; 110: 188–198.
- 109 Lang I, Madani M. Update on Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Circulation*. 2014; 130: 508-518.

Erklärung zur Dissertation

„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 Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein Dank für die wunderbare Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit gilt in erster Linie meinem Doktorvater Frau Prof. Dr. Malgorzata Wygrecka, die mir jederzeit mit Rat und Tat und großer Geduld zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Grazyna Kwapiszewska und Herrn Prof. Dr. med. Philipp Markart für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken

Auch allen Mitgliedern der AG Wygrecka und der AG Weismann gilt mein Dank. Mit ihren Tipps und Tricks, ihren Anregungen und Anleitungen haben sie diese Doktorarbeit erst möglich gemacht. Besonders erwähnen möchte ich Darek, Ewa, Christine, Yvonne, Gisela und Horst.

Danke an meine Familie, Freunde und Katrin, die mich bis zur Vollendung dieser Arbeit motiviert und gestützt haben!

Publikation:

Wygrecka M, Didiasova M, Berscheid S, Piskulak K, Taborski B, Zakrzewicz D, Kwapiszewska G, Preissner KT, Markart P. Protease-activated receptors (PAR)-1 and -3 drive epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells - potential role in lung fibrosis, *Thromb Haemost.* 2013, 110, 295-307