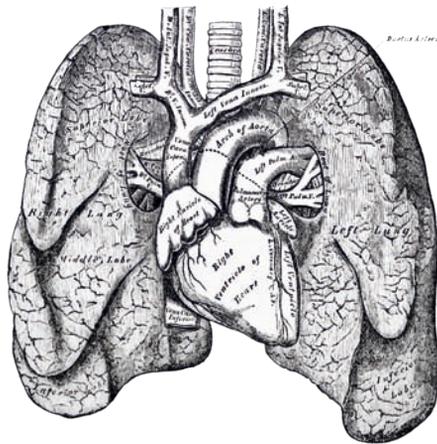


Der Einfluss des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors Sunitinib auf den rechten Ventrikel bei der experimentellen pulmonalen Hypertonie

Matthäus Johann Majewski



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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Der Einfluss des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors
Sunitinib auf den rechten Ventrikel bei der
Experimentellen Pulmonalen Hypertonie**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Matthäus Johann Majewski

aus Groß Strehlitz (Polen)

Gießen 2013

Aus dem Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik II der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort
Gießen

Leiter: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Ralph T. Schermuly

Gutachter: Frau Prof. Dr. Susanne Rohrbach

Tag der Disputation: 12.11.2013

1 EINLEITUNG	1
1.1 EINFÜHRUNG IN DIE PULMONALE HYPERTONIE (PH)	1
1.2 DEFINITION UND HISTORISCHE EINORDNUNG	1
1.3 KLASSIFIKATION	2
1.4 PATHOLOGISCHE UND HISTOLOGISCHE KENNZEICHEN DER PH	4
1.5 ROLLE DES RECHTEN HERZENS IM KONTEXT DER PH	6
1.6 ZELLULÄRE ABLÄUFE BEI DER PH	7
1.7 MOLEKULARE ABLÄUFE BEIM KARDIALEN REMODELING	8
1.8 REZEPTORTYROSINKINASEN UND WACHSTUMSFAKTOREN	9
1.9 THERAPIE DER PH	12
1.9.1 SPEZIFISCHE PHARMAKOTHERAPIE	12
1.9.1.1 VASODILATATIVE THERAPIE	12
1.9.1.2 ANTIPROLIFERATIVE THERAPIE	14
1.10 SUNITINIB	15
1.11 EXPERIMENTELLE TIERMODELLE	15
1.11.1 MONOCROTALIN MODELL	16
1.11.2 PULMONARY ARTERY BANDING (PAB)	16
1.12 ZIELE DER ARBEIT	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 MATERIAL	18
2.1.1 REAGENZIEN UND SUBSTANZEN	18
2.1.2 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL	20
2.1.3 ANTIKÖRPER	21
2.1.4 PRIMER	21
2.2 METHODEN	22
2.2.1 VERSUCHSTIERE	22
2.2.1.1 MONOCROTALIN MODELL	22
2.2.1.2 PAB MODELL	23
2.2.2 BESTIMMUNG DER HÄMODYNAMISCHEN PARAMETER	23
2.2.3 BESTIMMUNG DES ORGANGEWICHTS	24
2.2.4 GEWINNUNG DER RNA AUS DEN RECHTEN VENTRIKELN	24
2.2.5 REVERSE TRANSKRIPTASE-POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-PCR)	25
2.2.6 REAL TIME QUANTITATIVE PCR (RTq-PCR)	25
2.2.7 PROTEINISOLATION AUS DEN RECHTEN VENTRIKELN	26
2.2.8 ANALYSE DER PROTEINKONZENTRATION	27
2.2.9 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTOPHORESE (SDS-PAGE)	27

2.2.10 WESTERN BLOTTING	28
2.2.11 ANTIKÖRPERINKUBATION UND ENTWICKLUNG	28
2.2.12 MEMBRANSTRIPPING	28
2.2.13 BANDENQUANTIFIZIERUNG	29
2.2.14 ZELLKULTIVIERUNG	29
2.2.15 [³H]THYMIDIN-PROLIFERATIONSASSAY	29
2.2.16 STATISTISCHE AUSWERTUNG	31
3 ERGEBNISSE	32
<hr/>	
3.1 ÜBERSICHT ÜBER DIE GEWONNENEN DATEN	32
3.2 MCT MODELL	32
3.2.1 mRNA-EXPRESSIONSPROFIL DER SUNITINIB ZIELSTRUKTUREN	32
3.2.2 PROTEINEXPRESSION VON PDGFR β IM RECHTEN VENTRIKEL	34
3.2.3 VERHÄLTNIS DES RECHTEN VENTRIKEL ZUM LINKEN VENTRIKEL UND SEPTUM	35
3.2.4 RECHTSVENTRIKULÄRER SYSTOLISCHER DRUCK	36
3.2.5 SYSTEMISCH-ARTERIELLER BLUTDRUCK	37
3.2.6 mRNA EXPRESSION VON HYPERTROPHIEMARKERN IM RECHTEN VENTRIKEL	38
3.2.7 mRNA-EXPRESSION VON FIBROSEMARKERN IM RECHTEN VENTRIKEL	42
3.3 PAB MODELL	43
3.3.1 mRNA-EXPRESSIONSPROFIL DER SUNITINIB ZIELSTRUKTUREN	43
3.3.2 PROTEINEXPRESSION VON PDGFR β IM RECHTEN VENTRIKEL	45
3.3.3 VERHÄLTNIS VON RECHTEN VENTRIKEL ZUM LINKEN VENTRIKEL UND SEPTUM	46
3.3.4 RECHTSVENTRIKULÄRER SYSTOLISCHER DRUCK	47
3.3.5 SYSTEMISCH-ARTERIELLER BLUTDRUCK	48
3.3.6 mRNA-EXPRESSION VON HYPERTROPHIEMARKERN IM RECHTEN VENTRIKEL	49
3.3.7 mRNA-EXPRESSION VON FIBROSEMARKERN IM RECHTEN VENTRIKEL	52
3.4 ANTIPROLIFERATIVE EFFEKTE VON SUNITINIB AUF KARDIALE FIBROBLASTEN	53
4 DISKUSSION	55
<hr/>	
4.1 DISKUSSION DER TIERMODELLE	56
4.2 NACHWEIS DER ZIELSTRUKTUREN VON SUNITINIB IM RECHTEN VENTRIKEL	58
4.3 WIRKUNG VON SUNITINIB AUF DIE RECHTSVENTRIKULÄRE HYPERTROPHIE	59
4.4 VERGLEICH VON SUNITINIB UND SORAFENIB	61
4.5 POTENTIELLE KARDIOTOXIZITÄT VON REZEPTORTYROSINKINASE-INHIBITOREN	61
4.6 FAZIT UND KLINISCHER AUSBLICK	62
5 ZUSAMMENFASSUNG	64
<hr/>	

6 SUMMARY	66
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	67
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	71
9 TABELLENVERZEICHNIS	72
10 LITERATURVERZEICHNIS	73
11 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	87
12 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	88
13 DANKSAGUNG	89
14 TABELLARISCHER LEBENSLAUF	90

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Pulmonale Hypertonie (PH)

Die Pulmonale Hypertonie (PH) ist ein Sammelbegriff für Erkrankungen, die durch einen Anstieg im Gefäßwiderstand der Lunge (PVR) gekennzeichnet sind. Dieser wird durch einen erhöhten Tonus sowie einen Umbau der Lungenarterien bewirkt. In Folge der chronischen Nachlasterrhöhung kommt es zur Ausbildung eines *Cor pulmonale* (Bogaard et al. 2009a). Das rechtsventrikuläre Versagen ist der größte limitierende Faktor im Überleben der Patienten, unbehandelt liegt dieses bei nur 2,8 Jahren (Sandoval et al. 1994; D'Alonzo et al. 1991).

1.2 Definition und historische Einordnung

Ab einem pulmonalarteriellen Druck von ≥ 25 mmHg in Ruhe spricht man von einer pulmonalen Hypertonie.

Die Erstbeschreibung dieses Krankheitsbildes geht auf Ernst von Romberg zurück, der 1891 seine Beobachtungen nach einer Autopsie in „Über Sklerose der Lungenarterie“ darstellte. Die frühen Fallbeschreibungen und die ersten klinischen Studien ermöglichten eine Skizzierung der pathologischen Korrelate der PH, wie zum Beispiel vaskuläre Läsionen oder die Hypertrophie des rechten Herzens (Kay et al. 1967).

Als Meilenstein in der Diagnostik gilt die in den 1940er Jahren entwickelte Technologie der pulmonalarteriellen Katheterisierung, durch die es möglich wurde entscheidende hämodynamische Parameter zu bestimmen (Cournand 1941). Der von Zaiman et al. als „Hämodynamische Era“ bezeichnete Zeitraum brachte wichtige Entdeckungen hervor, beispielsweise das Prinzip der hypoxischen Vasokonstriktion (Euler 1946). Um ein tieferes Verständnis über die PH zu erlangen, wurden Tiermodelle etabliert. Dies begann gegen Ende der 1960er Jahre mit dem Monocrotalin-Modell (Kay et al. 1967) und dem Hypoxie-Modell (Barer et al. 1970). Das Verständnis über die Rolle einzelner Zelltypen auf die Umbauprozesse in den Lungengefäßen und im Herzen, der Einfluss verschiedener Mediatoren und letztendlich die Entwicklung von vornehmlich vasodilatativen Therapieansätzen, von denen Patienten nun seit den 1980er Jahren profitieren, sind hierauf zurückzuführen (Galiè et al. 2009a).

Grundlegend neue Ideen für die Behandlung ergaben sich durch die 1998 veröffentlichte Beschreibung der Gemeinsamkeiten von Neoplasien und der Proliferation bei der PH von Voelkel und Tudor (Voelkel et al. 1998; Lee et al 1998). Der Forschungsschwerpunkt verlagerte sich dadurch hin zu antiproliferativen Wirkstoffen mit Ursprung in der Onkologie (Grimminger et al. 2010).

1.3 Klassifikation

Die Heterogenität des Krankheitsbildes und die Häufung von neuen Erkenntnissen spiegeln sich in einem wiederholten Wechsel der Einteilung der PH wider. Ursprünglich wurde sie auf dem 1. Symposium der Weltgesundheitsorganisation 1973 abhängig davon, ob ein Auslöser eruierbar war oder nicht, in eine primäre und eine sekundäre Form eingeteilt (Hatano 1975). Auf der 2. Weltkonferenz 1998 in Evian erfolgte eine Gruppierung nach „zugrunde liegenden Ursachen und klinischen Ähnlichkeiten“, ebenso wie eine Schweregradeinteilung, die sich an den Kriterien der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association (NYHA) orientiert (Fishman 2004) (Tabelle 1: Funktionelle Schweregradeinteilung). Als Weiterentwicklung ist die Einteilung der 3. Weltkonferenz 2003 in Venedig zu verstehen, bei der eine Gliederung in fünf Gruppen vorgenommen wurde, welche auch nach der 4. Weltkonferenz 2008 in Dana Point grundsätzlich erhalten blieb (Rosenkranz und Erdmann 2008) (Tabelle 2: Dana Point Klassifikation der PH (2008)). Die Einteilungskriterien sind von pathologischer, pathophysiologischer sowie therapeutischer Natur.

Tabelle 1: Funktionelle Schweregradeinteilung

Klasse 1	Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität. Normale körperliche Belastungen führen nicht zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.
Klasse 2	Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit einer leichten Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Normale körperliche Aktivität führt zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.
Klasse 3	Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Bereits leichtere als normale Belastungen führen zu Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.
Klasse 4	Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit Unfähigkeit, irgendwelche körperliche Belastung ohne Beschwerden auszuführen. Zeichen der manifesten Rechtsherzinsuffizienz. Dyspnoe und/oder Müdigkeit können bereits in Ruhe vorhanden sein. Bei geringster Aktivität werden die Beschwerden verstärkt.

Tabelle 2: Dana Point Klassifikation der PH (2008)

1. Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)
 - 1.1 Idiopathische PAH (IPAH)
 - 1.2 Erbliche Form PAH
 - 1.2.1 BMPR2
 - 1.2.2 ALK1, Endoglin (mit oder ohne hereditärer hämorrhagischer Telangiectasie)
 - 1.2.3 Unbekannt
 - 1.3 Medikamente/Giftstoffe
 - 1.4 PAH assoziiert mit:
 - 1.4.1 Kollagenosen
 - 1.4.2 HIV-Infektion
 - 1.4.3 Portale Hypertonie
 - 1.4.4 Angeborenen Herzfehlern
 - 1.4.5 Schistosomiasis
 - 1.4.6 Chronisch-hämolytischer Anämie
 - 1.5 Persistierende pulmonale Hypertonie der Neugeborenen
- 1' Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose (PCH)
2. Pulmonale Hypertonie bei linksventrikulärer Herzerkrankung
 - 2.1 Systolische Funktionsstörungen
 - 2.2 Diastolische Funktionsstörungen
 - 2.3 Herzklappenerkrankungen
3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen mit/ohne Hypoxämie
 - 3.1 Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen
 - 3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen
 - 3.3 andere Lungenerkrankungen mit gemischten restriktiven und obstruktiven Mustern
 - 3.4 Schlafapnoesyndrom
 - 3.5 Zentrale alveoläre Hypoventilationssyndrome
 - 3.6 Chronische Höhenkrankheit
 - 3.7 Entwicklungsbedingte Fehlbildungen
4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
5. Pulmonale Hypertonie bei unklaren multifaktoriellen Mechanismen
 - 5.1 Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Störungen, Splenektomie
 - 5.2 Systemische Störungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans Zell Histiozytose: Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
 - 5.3 andere Erkrankungen (der Schilddrüse, Glykogenspeicherkrankheit, Gaucher)
 - 5.4 andere: Kompression der Pulmonalgefäße durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, dialysepflichtige chronische renale Insuffizienz

1.4 Pathologische und histologische Kennzeichen der PH

Die charakteristischen histopathologischen Kennzeichen finden sich vor allem bei Patienten mit einer IPAH. Nichtsdestotrotz sind auch bei den anderen Gruppen in der Klassifikation diese typischen aber nicht spezifischen Pathologien auffindbar. Die sichtbaren Korrelate sind eine Bildung von in-situ Thrombosen, sowie der pulmonale Gefäßumbau, die zu einer chronischen Erhöhung des Druckes führen (Rubin 1997). Die typischen Veränderungen finden sich primär in muskularisierten Pulmonalarterienästen mit einem Durchmesser von $\leq 500 \mu\text{m}$ (Dorfmueller et al. 2006). Im histologischen Schnitt zeigt sich der Gefäßumbau in allen drei Wandschichten. Es kommt zu einem Einwandern von Fibroblasten und Myofibroblasten sowie glatten Muskelzellen in die Intima, was zu einer Fibrosierung und letztendlich zur Bildung einer Neointima zwischen dem Endothel und der Lamina elastica interna führt. Ein überschießendes Wachstum von glatten Muskelzellen bewirkt eine Hypertrophie der Tunica media. Diese manifestiert sich bereits zu einem frühen Krankheitszeitpunkt, häufig noch bevor andere Merkmale auftreten (McLaughlin et al. 2009). Die Tunica adventitia wird durch eine Vermehrung der extrazellulären Matrix und eine Erhöhung der Fibroblastenzahl verdickt (Abbildung 1: Pulmonalvaskuläres Remodeling) (Chazova et al. 1995). Weiterhin können sich charakteristische plexiforme Läsionen zeigen. Die Läsionen sind gefüllt mit endothelialisierten Kanälen (Abbildung 2: Plexiforme Läsion) (Smith et al. 1990). Patienten mit PH weisen ferner eine Rarefizierung der kleinen prekapillären Arterien auf und es kommt zu einer Muskularisierung von peripheren Arterienästen (Meyrick et al. 1974; Rabinovitch 2008).

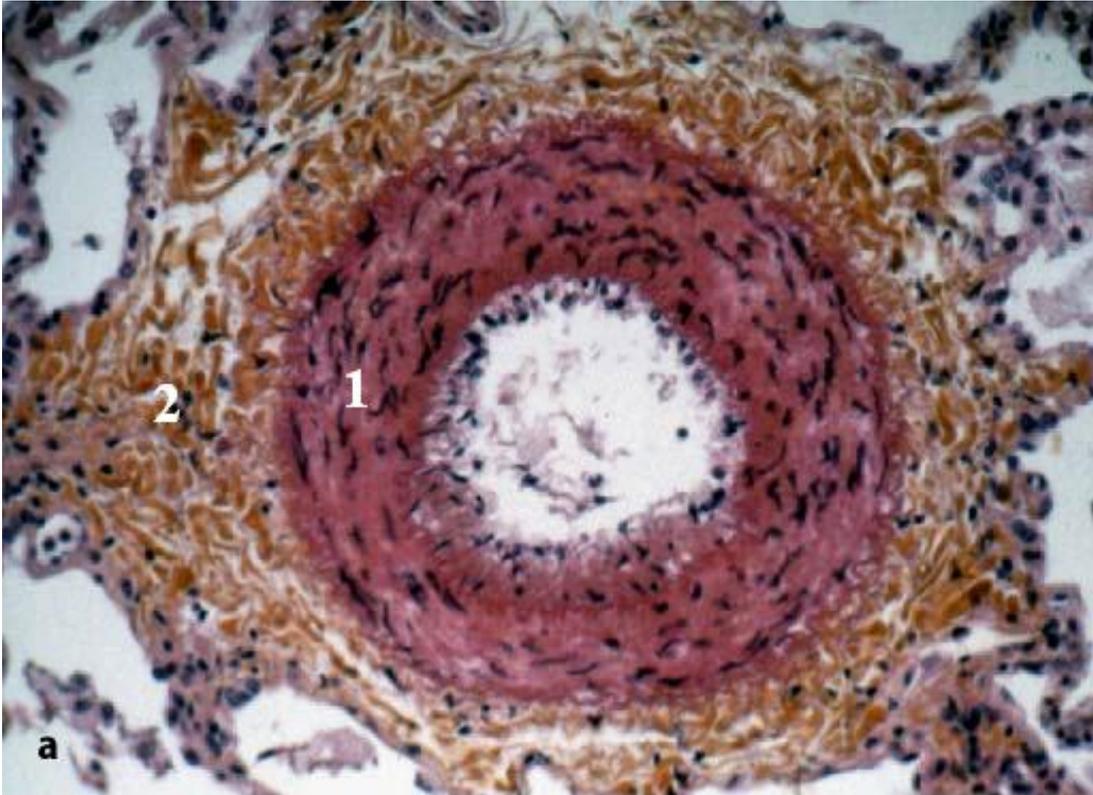


Abbildung 1: Pulmonalvaskuläres Remodeling (EvG-Färbung Vergrößerung 200:1) Deutliche Mediahypertrophie (1) und Fibrose der Adventitia (2) modifiziert nach (Dorf Müller et al. 2006)

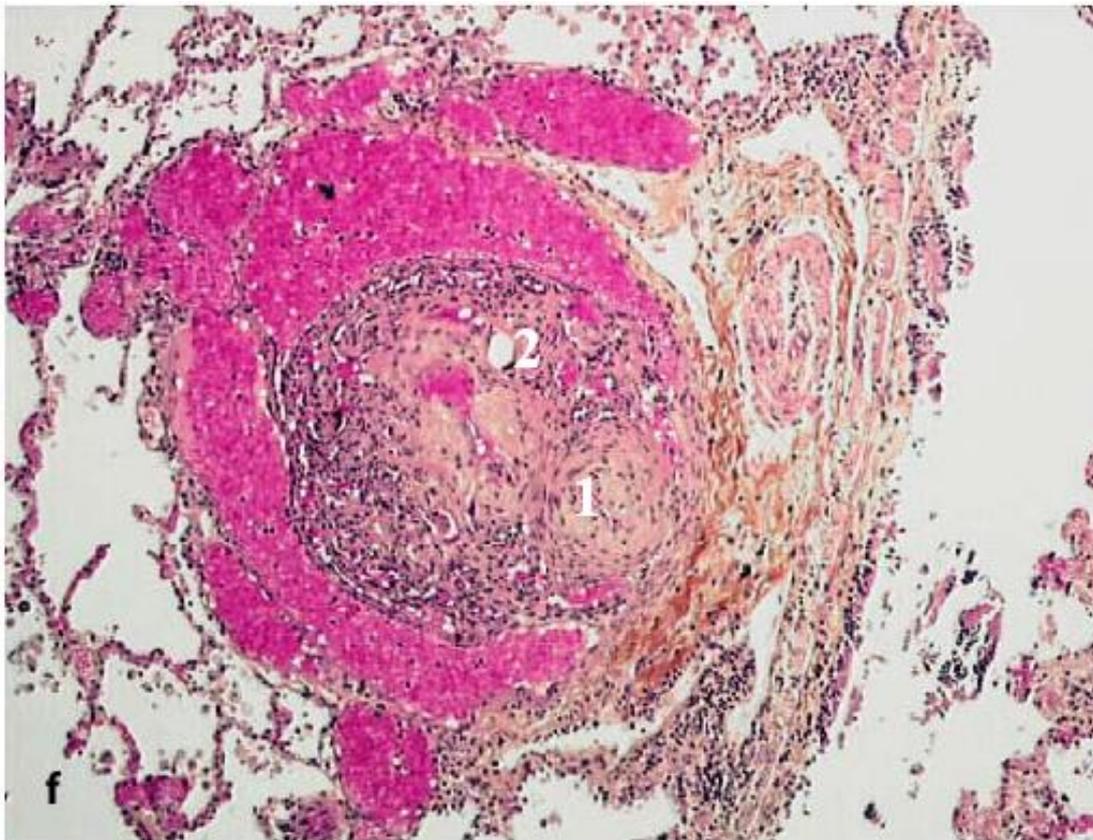


Abbildung 2: Plexiforme Läsion (HE-Färbung Vergrößerung 100:1) Plexiforme Läsion mit myofibroblasterer Anordnung (1) und endothelialisierten Kanälen (2) modifiziert nach (Dorf Müller et al. 2006)

1.5 Rolle des rechten Herzens im Kontext der PH

Von der Forschung häufig eher stiefmütterlich behandelt und im Allgemeinen von seiner Bedeutung her unterschätzt, spielt das rechte Herz bei der pulmonalen Hypertonie eine zentrale Rolle. Im Vergleich zum linken Herzen ist das rechte Herz muskelschwach und dünnwandig, muss es doch beim gesunden Menschen nur Maximaldrücke von 20 bis 30 mmHg aufbauen (Cecconi et al. 2006). Hintergrund hierfür ist, dass es in den physiologischerweise durch einen niedrigen Gefäßwiderstand gekennzeichneten Lungenkreislauf eingebunden ist. Die Fähigkeit zur Rekrutierung von parallelen Kapillaren und die hohe Compliance der Lungengefäße bedingen die gute Anpassungsfähigkeit an schwankende Volumenverhältnisse und somit den niedrigen Gesamtwiderstand. Unter akuter Druckbelastung wie bei einer Lungenembolie liegen die Spitzendrücke, die im rechten Ventrikel (RV) erreicht werden können bei maximal 50 mmHg (Leschke und Wädlich 2007). Bei höheren Drücken ist mit einer akuten kardialen Dysfunktion zu rechnen. Eine chronische Widerstandserhöhung, die bei einer PH auftritt, bewirkt eine Adaptation des Myokards und erlaubt den Aufbau von höheren Drücken (Dias et al. 2002). Dies ist notwendig um trotz der erhöhten Nachlast ein adäquates Auswurfvolumen aufrecht erhalten zu können. In Folge der Anpassungsprozesse vollführt der dünne, dem Septum und dem linken Herzen anliegende rechte Ventrikel eine Konformationsänderung von einem Tetraeder bis sichelförmigem Trapezoid hin zu einer Kugel, welche sogar die Größe des linken Ventrikels übersteigen kann (Abbildung 3: Schematische Darstellung der Konformationsänderung des rechten Ventrikels (Voelkel et al. 2006a). Im Verlauf stellt sich eine zunehmende RV Insuffizienz ein, die durch eine kontraktile Dysfunktion, Dilatation, Trikuspidalinsuffizienz und ein abnehmendes Schlagvolumen gekennzeichnet ist (Leschke und Wädlich 2007; Sandoval et al. 1994). Es entsteht ein circulus vitiosus aus Insuffizienz und Myokardischämie, dessen Endpunkt schließlich das tödliche Rechtsherzversagen ist (Budev et al. 2003; Cecconi et al. 2006).

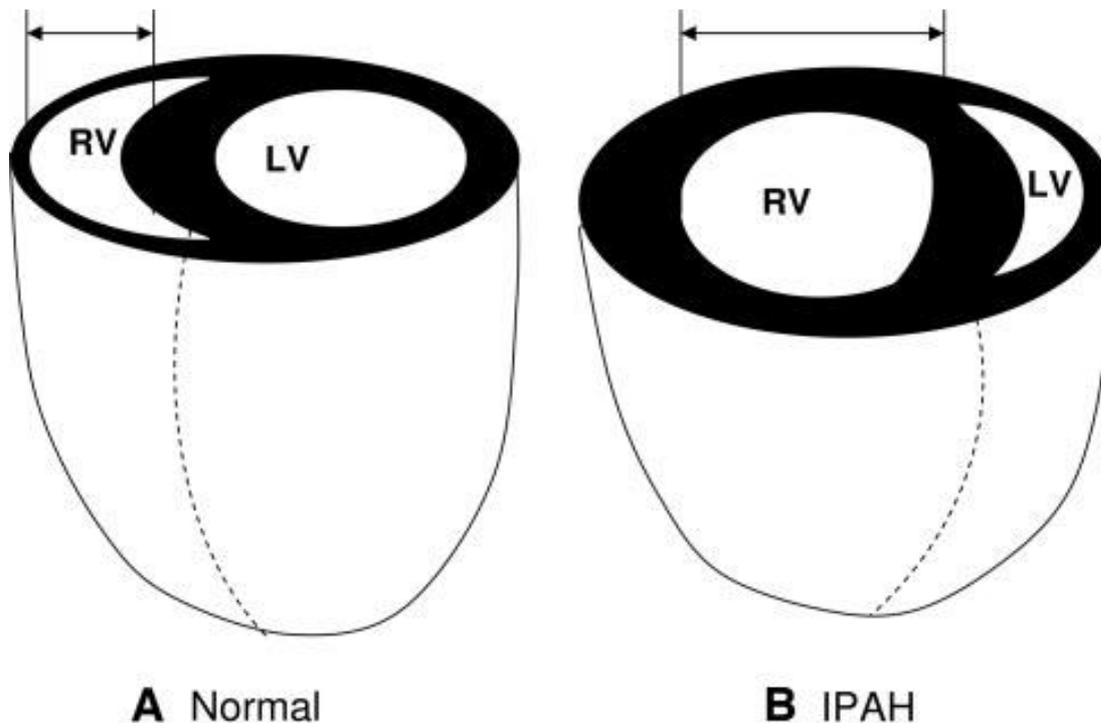


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Konformationsänderung des rechten Ventrikels (Voelkel et al. 2006a)

1.6 Zelluläre Abläufe bei der PH

Jahrzehnte der Forschung haben eine hohe Zahl von verschiedenen Faktoren zu Tage gefördert, welche die zellulären Abläufe bei der PH kennzeichnen. Schon früh stand das Missverhältnis von vasoaktiven Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Thromboxan- A_2 (TXA $_2$), Endothelin-1 (ET-1) oder Prostaglandin I $_2$ (PGI $_2$) im Fokus, dementsprechend umfassend ist das Wissen hierzu. Angeborene und erworbene Störungen im Stoffwechsel, die Rolle von Entzündung, eine gestörte Endothelfunktion, der Einfluss auf die Extrazelluläre Matrix durch Enzyme wie Matrixmetalloproteasen (MMPs) sowie Elastasen und die Bildung von in-situ Thrombosen, sind des Weiteren Aspekte der molekularen Abläufe im komplexen Gesamtbild der PH (Schermulý et al. 2011) (vgl. Abbildung 4: Molekulare Faktoren bei der PH). Von zunehmendem Interesse ist auch das Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise dem Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF), dem Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF), dem Epidermalen-Wachstumsfaktor (EGF), dem Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF), dem Insulinähnlichen-Wachstumsfaktor-1 (IGF-1), dem Transforming-Growth-Factor β (TGF- β) und deren Rezeptoren auf Proliferation, Gefäß- und Organumbau. Einen besonderen Stellenwert nehmen hierbei Rezeptortyrosinkinasen ein, haben sie sich doch bereits als wirkungsvolles Ziel für neue

Therapien erwiesen (vgl. 1.9.1.2 Antiproliferative Therapie). Hervorzuheben ist ebenfalls das beginnende Interesse an den zellulären Abläufen der Rechtsherzhypertrophie.

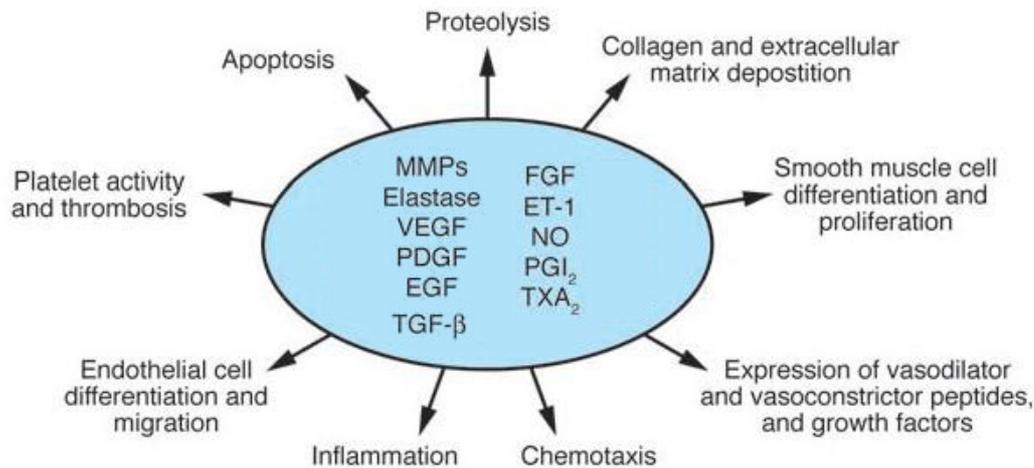


Abbildung 4: Molekularen Faktoren bei der PH modifiziert nach (Barst 2005)

1.7 Molekulare Abläufe beim kardialen Remodeling

Bei Patienten mit PH kommt es zu einem Remodeling des rechten Ventrikels. Dies meint eine Umgestaltung bestehender Strukturen, betrifft Kardiomyozyten wie auch kardiale Fibroblasten und ist definitionsgemäß maladaptiv (Swynghedauw 1999). Es ist bekannt, dass die kardiale Adaptation bei Sportlern Unterschiede zum Remodeling aufweist (Frey und Olson 2003). Kennzeichnend für eine maladaptive Anpassung ist etwa ein vermehrter Kollagengehalt im Myokard als Ausdruck einer Fibrose (Medugorac 1980). Hypertrophiemarker wie das atriale natriuretische Peptid (ANP), das Brain-Natriuretic-Peptide (BNP) und Endothelin-1 (ET-1) sind vermehrt nachweisbar (Iemitsu et al. 2001) und es kommt zu einer gesteigerten Expression von fetalen Isoformen bestimmter Strukturproteine, wie beispielsweise der β -Myosin-Schweren-Kette (β MHC) gegenüber der in adulten Zellen üblichen α -Myosin-Schweren-Kette (α MHC) (Izumo et al. 1988; Voelkel et al. 2006a). Ein weiteres Kennzeichen des Remodeling ist das Auftreten von Myofibroblasten im Herzen, welche über Marker wie α -2-Aktin (α -SMA) nachweisbar sind. Myofibroblasten sind mit Ausnahme der Klappen nicht originär im gesunden Herzen zu finden (Tomasek et al. 2002; Manabe et al. 2002). Kardiale Fibroblasten stellen den häufigsten Zelltyp im Herzen dar (Baudino et al. 2006). Sie sind sowohl für den Aufbau von extrazellulärer Matrix, etwa Kollagen I und III, als auch für ihren Abbau durch Matrixmetalloproteasen

verantwortlich. Des Weiteren produzieren sie Zytokine und Wachstumsfaktoren (Pelouch et al. 1993). Damit sind sie die Stellgröße für interstitielle und perivaskuläre Fibrose im Herzen. Über die Bildung von parakrinen Faktoren können sie direkt Einfluss auf die Hypertrophie der Kardiomyozyten nehmen (Manabe et al. 2002). Im Zuge der chronischen Druckbelastung des rechten Ventrikels kommt es weiterhin zu einer zunehmenden reaktiven Fibrose.

1.8 Rezeptortyrosinkinasen und Wachstumsfaktoren

Mit Hilfe von Signalkaskaden können im Körper durch relativ kleine Stimuli in Form von Liganden wie etwa Zytokinen oder Wachstumsfaktoren über eine Beeinflussung der Genexpression deutliche Veränderungen bewirkt werden. So können beispielsweise Proliferation, Angiogenese, Überleben und Wachstum von Zellen gesteuert werden. Eine zentrale Rolle spielen hierbei Rezeptortyrosinkinasen, welche eine Schaltstelle von extra- zu intrazellulärer Informationsübertragung sind (vgl. Abbildung 5 Mechanismus der Wirkung von Rezeptortyrosinkinasen). Die gesamte Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen lässt sich anhand von strukturellen Eigenschaften und unterschiedlichem Bindungsverhalten in insgesamt etwa 20 Familien einteilen (Robinson et al. 2000). Wachstumsfaktoren bewirken durch die Bindung an eine extrazellulär liegende Domäne die Dimerisierung und Aktivierung der Rezeptoren. In Folge dessen kommt es zur Autophosphorylierung an intrazellulär lokalisierten Tyrosinstellen, welche als Andockstellen für Moleküle dienen, die SH2 oder PTB Domänen tragen (Ullrich und Schlessinger 1990). Daraufhin können Enzyme direkt aktiviert werden oder intrazelluläre Signalkaskaden wie etwa der Ras/Raf/Erk1/2-MAP-Kinase-Signalweg angestoßen werden (Pawson 1995).

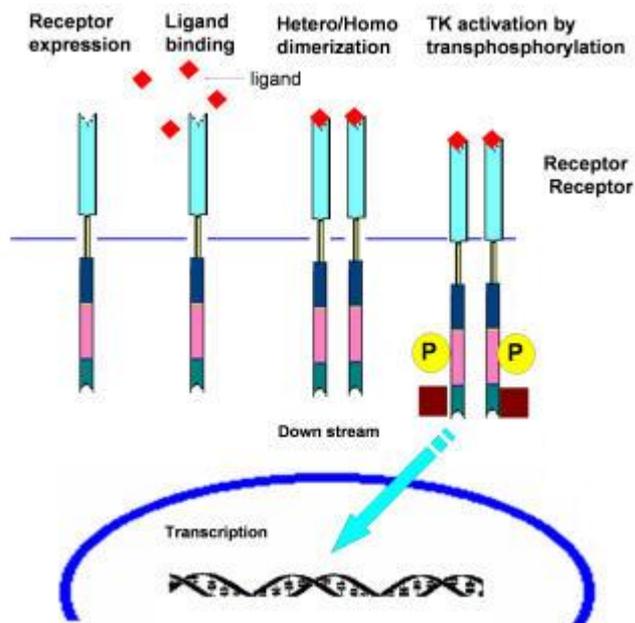


Abbildung 5: Mechanismus der Wirkung von Rezeptortyrosinkinasen. Eine Ligandenbindung bewirkt eine Dimerisierung von Rezeptoranteilen, was wiederum zu einer Autophosphorylierung führt. Über Kaskaden wird die Genexpression beeinflusst. Modifiziert nach (Paul und Mukhopadhyay 2004)

Bei den aktivierenden Liganden handelt es sich in den meisten Fällen um Wachstumsfaktoren. Im Speziellen konnte bei der vaskulären Proliferation ein Einfluss von PDGF sowie FGF, IGF-1 und EGF gezeigt werden (Barst 2005). Insbesondere Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF) als Ligand und Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor β (PDGFR β) als Zielstruktur haben ein breites Interesse geweckt, da eine Überexpression sowohl im Tiermodell als auch in PH Patienten nachweisbar ist (Humbert et al. 1998; Schermuly et al. 2005; Perros et al. 2008). Die wichtige Rolle von Rezeptortyrosinkinasen beim vaskulären Umbau bei der PH ist nach dem heutigen Stand der Forschung gesichert. Eine Hemmung beispielsweise durch Imatinib (STI 571, Glivec®) beeinflusst das vaskuläre Remodeling im Tiermodell positiv (Schermuly et al. 2005) und zeigt gute Effekte bei Patienten (Ghofrani et al. 2005). Bei weitem weniger klar ist hingegen, welchen Stellenwert Rezeptortyrosinkinasen bei der Entwicklung der rechtsventrikulären Hypertrophie haben und inwiefern eine Inhibition das myokardiale Remodeling zu verändern vermag. Es ist bekannt, dass Kardiomyozyten über Integrine auf biomechanischen Stress mit einer Hypertrophie reagieren. Vermittelt wird dies über eine Hemmung von SHP2. Über die FAK, ein fokales Adhäsionsprotein und SRC wird die PI3-Kinase aktiviert, welche wiederum MAP-Kinase Signalwege auslöst (Marin et al. 2008). Für Sorafenib konnte eine direkte Verbesserung der kardialen Funktion im Monocrotalin-Modell nachgewiesen werden. Hierbei wurde eine Wirkung

über den Raf-1 Kinase Signalweg angenommen, welcher ebenfalls über MAP-Kinasen arbeitet (Klein et al. 2008). Des Weiteren wurde diskutiert, dass eine Hemmung dieses Signalwegs über p38 einer Dekompensation des Herzens entgegenwirken kann (Kaiser et al. 2004). Eine Verflechtung von Rezeptortyrosinkinasen in dieses komplexe Signalsystem konnte für den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gezeigt werden (Kagiyama et al. 2003). Ein Einfluss weiterer Rezeptortyrosinkinasen auf die rechtsventrikuläre Hypertrophie erscheint somit durchaus möglich und vor dem Hintergrund neuer Therapien als lohnenswertes Ziel für weitere Forschung. In einem Modell der linksventrikulären Hypertrophie konnte eine PDGFR β Überexpression nachgewiesen werden (Akiyama et al. 1999). Auf Grund seiner zentralen Rolle in den Lungengefäßen bei der PH bietet sich insbesondere PDGFR β für weitere Untersuchungen am rechten Herzen an (Schermuly et al. 2005).

Unklarheit besteht bezüglich der Rolle des VEGF und seiner Rezeptorfamilie im Kontext der PH. Physiologischerweise spielen sie eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Funktion von Endothelzellen respektive bei der Angiogenese. Verschiedene Isoformen und Rezeptoren von VEGF sind in hohem Maße in der Lunge exprimiert und stellen ein überaus komplex reguliertes System dar (Voelkel et al. 2006b). Zahlreiche Multikinaseinhibitoren besitzen die VEGFR Familie als Angriffspunkt und blockieren so die Blutversorgung von Neoplasien. Man weiß, dass bei PH die VEGFR-1-Expression erhöht ist. In plexiformen Läsionen findet sich überwiegend VEGFR-2 (Humbert et al. 2004). Wenig ist über die Rolle bekannt, die das VEGF System im Herzen spielt. Dass es durchaus von Relevanz sein könnte, konnte in Hypertrophie modellen gezeigt werden. Nach Verengung der pulmonalen Ausflussbahn zeigt sich ein verändertes Genexpressionsprofil, welches unter anderem VEGF betrifft (Izumo et al. 1988; Carroll et al. 1995). Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass sich durch eine VEGFR Blockade aus einer kompensatorischen Linksherzhypertrophie ein Herzversagen entwickeln kann und dass es zu einer Rarefizierung von Kapillaren kommen kann (Izumiya et al. 2006). Demgegenüber stehen Daten, nach denen eine Überexprimierung von VEGF zu einem kardialen Ödem und zur Bildung von abnormalen Gefäßnetzwerken führt (Dor et al. 2002). In der Synopse zeigt sich ein noch uneinheitliches Bild mit weiterem Klärungsbedarf.

1.9 Therapie der PH

Die aktuellen gemeinsamen Leitlinien der European Respiratory Society und der European Society of Cardiology von 2009 beschreiben allgemeine sowie spezifische therapeutische Maßnahmen zur Behandlung der PH (Galiè et al. 2009a). Die tatsächliche Strategie variiert je nach der Zuordnung in die jeweiligen Klassifikationsgruppen. Die Metaanalyse von 23 randomisierten klinischen Studien verglich PH Patienten mit einer spezifischen Pharmakotherapie und Patienten die ein Placebo erhielten und konnte bezüglich der Mortalität eine Verbesserung um 43% und hinsichtlich der Hospitalisierung eine Verbesserung um 61% belegen. Nichtsdestotrotz ist die PH nach wie vor nicht heilbar und auch unter aktueller, leitliniengerechter Therapie mit hohen funktionellen Einschränkungen sowie einer hohen Mortalität behaftet (Galiè et al. 2009b).

1.9.1 Spezifische Pharmakotherapie

1.9.1.1 Vasodilatative Therapie

Kalziumkanalantagonisten

Seit Mitte der 1980er Jahre werden Kalziumkanalantagonisten bei der PH verwendet. Nach einer vorausgehenden positiven Testung der Vasoreagibilität im Rechtsherzkatheter können sie primär bei IPAHA & familiärer PAHA den pulmonal arteriellen Druck senken (Rich et al. 1992). Tatsächlich liegt jedoch eine positive Testung bei weniger als 10% der IPAHA Patienten vor, was die Anwendung von Kalziumkanalantagonisten deutlich einschränkt (Barst et al. 2009).

Prostazyklinanaloga

Bei PH Patienten findet sich durch eine verminderte Expression der Prostazyklinsynthese am Endothel ein Mangel an Prostazyklin in den Lungengefäßen. Durch das Überwiegen des Gegenspielers Thromboxan-A₂ kommt es zur Vasokonstriktion, Proliferation, Entzündung und Thrombosierung (Galiè et al. 2003; Giaid und Saleh 1995). Da Prostazyklin selbst sehr instabil ist, werden Analoga zur Therapie verwendet, um dem beschriebenen Ungleichgewicht entgegenzuwirken. Die Applikation erfolgt entweder intravenös (Epoprostenol, Treprostinil, Iloprost), subkutan (Treprostinil), inhalativ (Iloprost) oder oral (Iloprost, Beroprost) (Badesch et al. 2004).

Phosphodiesterase-5 Inhibitoren (PDE-5 Hemmer)

Eine weitere Pathologie im pulmonalen Gefäßsystem von PH Patienten betrifft den Stickstoffmonoxidstoffwechsel. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) ist vermindert exprimiert. Somit fehlt Stickstoffmonoxid (NO), ein potenter Vasodilatator, der weiterhin ein Proliferationshemmer von glatten Muskelzellen ist (Galiè et al. 2005). Sildenafil wurde ursprünglich als oral verfügbares Mittel gegen die erektile Dysfunktion eingesetzt (Goldstein et al. 1998). PH Patienten profitieren durch die hohe Expression der Phosphodiesterase-5 im Lungengefäßsystem ebenfalls von Hemmstoffen wie Sildenafil oder Tadalafil (Galiè et al. 2005; Barst et al. 2009). Angesiedelt im Stickstoffmonoxidstoffwechsel baut die Phosphodiesterase-5 zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ab, das durch die Guanylatzyklase gebildet wird. CGMP vermittelt über Proteinkinase G und weitere Schritte die Vasodilatation (Moncada und Higgs 1993). PDE-5 Hemmer bewirken somit über eine Erhöhung von cGMP eine verstärkte Vasodilatation sowie eine schwache Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen in den pulmonalen Gefäßen (Galiè et al. 2005; Schermuly et al. 2004). Durch die Senkung des Druckes in den Lungengefäßen kommt es sekundär zu einer Entlastung des rechten Ventrikels. Ein direkter Einfluss auf den Umbau im rechten Herzen scheint indes nicht zu bestehen (Schäfer et al. 2009).

Endothelin-Rezeptorantagonisten

Endothelin-1 (ET-1) ist ein starker Vasokonstriktor, der außerdem die Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen induziert. Das Endothelinsystem ist in PH Patienten verstärkt aktiv (Giaid et al. 1993). Die Wirkung von ET-1 wird über die Rezeptoren ET_A und ET_B vermittelt (Galié et al. 2004). Die älteste Substanz aus der Gruppe der Endothelin-Rezeptorantagonisten ist Bosentan. Es wirkt über eine duale Hemmung von ET_A und ET_B (Channick et al. 2001; Galiè et al. 2008a). Die selektiven ET_A Hemmer Sitaxentan & Ambrisentan zeigten in Studien ebenfalls einen positiven Effekt (Barst et al. 2006; Benza et al. 2008; Galié et al. 2005; Galiè et al. 2008b).

Kombinationstherapie

Auf Grund der unterschiedlichen pathophysiologischen Angriffspunkte der eingesetzten Medikamente lässt sich ein synergistischer Effekt bei einer kombinierten Gabe vermuten (Barst et al. 2009). Dieser konnte in verschiedenen klinischen Studien bestätigt werden (Bendayan et al. 2008; Hoeper et al. 2006; Launay et al. 2010; Mathai

et al. 2007; Simonneau et al. 2008; Galiè et al. 2009b; Humbert et al. 2004). Die ideale Kombinationstherapie in Bezug auf Arzneimittelinteraktionen und Nutzen ist aber aktuell noch nicht bekannt (Fox et al. 2011).

1.9.1.2 Antiproliferative Therapie

Voelkel und Tudor stießen einen Wechsel im Verständnis der PH an und stellten eine gestörte Zell-Zell-Interaktion, die fehlende Apoptose und Hyperproliferation in den Fokus des Interesses (Voelkel et al 1998; Lee et al. 1998). Auf diese Gemeinsamkeiten mit malignen Erkrankungen gründen sich neue Therapieansätze wie der Einsatz von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren. Als Wegbereiter ist hierbei Imatinib (Gleevec®) zu sehen, ein Inhibitor der PDGFR Familie, BCR-ABL und Kit, das als Therapeutikum der chronischen myeloischen Leukämie erstmals in Erscheinung trat (Druker et al. 1996). Zunächst im Tiermodell, bald auch in Fallbeschreibungen und aktuell in einer Phase III Studie zeigt es positive Effekte, die über die Wirkung der aktuellen Standardtherapie deutlich hinausgehen (Schermuly et al. 2005; Ghofrani et al. 2005; Ghofrani et al. 2010) (ClinicalTrials.gov NCT00902174). Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren aus der onkologischen Therapie haben teils ein sehr breites, teils ein schmaleres Spektrum an beeinflussten Zielstrukturen. Inwiefern diese differenzierten Wirkprofile jeweils bei der PH zu nutzen sein könnten, ist bis jetzt unzureichend geklärt.

Sorafenib

Sorafenib (Nexavar®) (Abbildung 7) ist ein Multikinaseinhibitor, der für die Therapie beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom sowie für die Behandlung des Leberzellkarzinoms zugelassen ist. Er blockiert einerseits die Autophosphorylierung der Serin-/Theroninkinasen Raf-1 und B-Raf, andererseits die der Rezeptortyrosinkinasen der Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor Familie (VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3), den Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor β (PDGFR β) und Kit. Eine positive Wirkung auf des anti-Remodeling in den Lungengefäßen sowie die Umkehr der Hypertrophie im Herzen konnte experimentell gezeigt werden (Klein et al. 2008; Moreno-Vinasco et al. 2008). Die Wirkung auf das Herz scheint unter anderem durch den Raf-1 Signalweg vermittelt zu sein (Harris et al. 2004). Aktuell befindet sich Sorafenib in einer Phase I Studie (ClinicalTrials.gov NCT00452218).

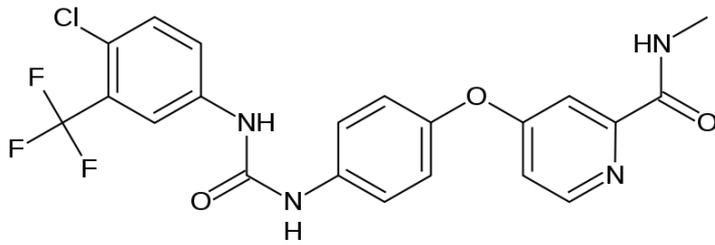


Abbildung 6: Struktur von Sorafenib

1.10 Sunitinib

Bei Sunitinib (Sutent®) (Abbildung 8) handelt es sich um einen reinen Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor mit einer Zulassung bei der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms, Imatinib-restistenten gastrointestinalen Stromatumoren, die entweder metastasiert oder nicht resezierbar sind und neuroendokrinen Tumoren des Pankreas. Sunitinib zeichnet sich durch ein sehr weites Wirkspektrum aus, das bei mindestens acht Zielstrukturen liegt. Darunter ist die VEGFR Familie (VEGFR1-VEGFR3) Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor (PDGFR α und PDGFR β), Kit, Flt-3 sowie der Colony-stimulating Factor-1 Receptor (CSF-1R) und RET (Roskoski 2007; Kim et al. 2009). Eine erhöhte Expression von PDGFR α und PDGFR β ist bei der PH nachweisbar (Humbert et al. 1998; Perros et al. 2008). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Kit, welches auf der Oberfläche von Mastzellen zu finden ist, über die Bildung von PDGF-A eine Rolle bei der Ausbildung von kardialer Hypertrophie spielen könnte (Levick et al. 2009; Liao et al. 2010).

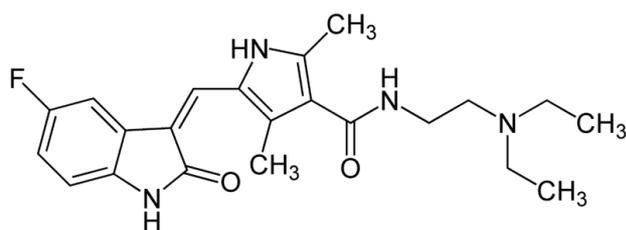


Abbildung 7: Struktur von Sunitinib

1.11 Experimentelle Tiermodelle

Das Verständnis für die Pathophysiologie der PH und somit die Entwicklung von gezielten Therapien beruht zu einem großen Teil auf Tiermodellen wie dem Monocrotalin-Modell in der Ratte (Kay et al. 1967). Der limitierende Faktor im Überleben von PH Patienten ist meist eine Dekompensation des rechten Ventrikels (Chin et al. 2005). Das rechte Herz verändert sich bei angioproliferativen Modellen wie dem Monocrotalin-Modell in Abhängigkeit von der Schwere der PH und ist als

sekundärer Effekt zu sehen (Hessel et al. 2006). Um eine chronische Druckbelastung mit resultierender Hypertrophie isoliert betrachten zu können und eine direkte Wirkung von Therapieansätzen untersuchen zu können wird das pulmonary artery banding (PAB) verwendet, eine operativ induzierte Pulmonalstenose (Faber et al. 2006).

1.11.1 Monocrotalin Modell

Entwickelt in den 1960 Jahren handelt es sich beim Monocrotalin-Modell um ein Modell der PH, welches auf Entzündungsreaktionen beruht. Monocrotalin (MCT) ist ein Pyrrolizidinalkaloid, das aus den Samen von *Crotalaria spectabilis* gewonnen wird. Nach einmaliger intraperitonealer respektive subkutaner Injektion wird es durch Cytochrome P450 3A4 in der Leber zu Dehydromonocrotalin (MCTP) verstoffwechselt und dadurch toxifiziert (Pan et al. 1991). Es schädigt über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus (Gomez-Arroyo et al. 2011) vermutlich direkt das Endothel der Lungengefäße und bewirkt eine endotheliale Dysfunktion (Rosenberg und Rabinovitch 1988). Die Folge ist eine progressiv verlaufende Entzündungsreaktion in der Tunica adventitia mit einer starken Einlagerung von Kollagen sowie eine Hypertrophie der Tunica media (Wilson et al. 1989). Weiterhin kommt es zur Muskularisierung von eigentlich muskelfreien Arteriolen. Die hämodynamische Belastung bewirkt eine Hypertrophie des rechten Ventrikels. Es kommt zur Ausbildung eines *Cor pulmonale* und in der überwiegenden Zahl der Fälle schlussendlich zum Tod (Meyrick et al. 1980).

1.11.2 Pulmonary artery banding (PAB)

Von Patienten mit einer angeborenen Pulmonalstenose ist bekannt, dass diese in Abhängigkeit von der Schwere der Obstruktion ein Rechtsherzversagen entwickeln können (Graham 1991; Hayes et al. 1993). Um bei der PH direkte Effekte auf das rechte Herz betrachten zu können kann operativ eine Verengung der rechtsventrikulären Ausflussbahn mit Hilfe einer Naht oder eines Clips durchgeführt werden. Dies wurde ursprünglich bereits 1924 beschrieben und zunächst auf Grund der schwierigen Technik bei größeren Säugetieren wie Hunden durchgeführt (Reid 1924; Tarnavski et al. 2004). Eine Durchführung bei kleineren Versuchstieren wie Ratten wird seit den letzten Jahren etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass es analog zu Patienten mit einer PH in Folge der Druckbelastung zu einer Hypertrophie kommt, die in einer Dilatation, einer eingeschränkten Pumpleistung, einer Fibrose sowie einer Rarefizierung der Kapillaren des RV mündet (Schäfer et al. 2009; Piao et al. 2010). Das PAB Modell ermöglicht

somit, zwischen direktem anti-Remodeling und sekundären Effekten über eine Druckentlastung zu unterscheiden.

1.12 Ziele der Arbeit

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist trotz neuer Therapien eine lebensbedrohliche Erkrankung. Sie ist gekennzeichnet durch eine progressive Erhöhung des Drucks in den Lungengefäßen. Diese wird durch die Konstriktion und den Umbau der pulmonalen Gefäße bewirkt. Limitierende Faktoren im Überleben der Patienten sind allerdings die pathologischen Zustände im rechten Herzen. Aus einer zu Beginn kompensatorischen Hypertrophie entwickelt sich ein Rechtsherzversagen. Neue Therapieansätze zielen darauf ab, diese Prozesse umzukehren. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, indem sie das Verständnis für die molekularen Abläufe im rechten Ventrikel verbessert sowie die Eigenschaften des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors Sunitinib auf das rechte Herz untersucht. Die konkreten Ziele der Untersuchung sind:

- Die Expression von Rezeptortyrosinkinasen im rechten Ventrikel in zwei Modellen der rechtsventrikulären Hypertrophie (MCT und PAB Modell) nachzuweisen.
- Die Wirkung des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors Sunitinib auf die Hämodynamik *in vivo* zu untersuchen.
- Die Beeinflussung von Hypertrophie und Fibrose im rechten Herzen durch Sunitinib im MCT und PAB Modell aufzuzeigen.
- Die Wirkung von Sunitinib auf die Proliferation von kardialen Fibroblasten *in vitro* zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Substanzen

Reagenzien und Substanzen	Hersteller
Acrylamid	Roth, Deutschland
Amonium persulfat	Roth, Deutschland
bFGF	PeptoTech, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Calcium Chlorid	Sigma-Aldrich, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, USA
DC-Protein Assay	Bio-Rad, USA
DEPC Wasser	Roth, Deutschland
dNTP Mix	Promega, USA
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham, UK
EGF	PeptoTech, USA
Ethanol absolut	Riedel-de Haën, Deutschland
Fetales Kälber Serum (FCS)	Biowest, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
[³ H]-Thymidin	Amersham, UK
HBSS	Invitrogen, USA
ImProm-II TM Reverse Transcriptase	Promega, USA
ImProm-II TM 5X Reaktions Puffer	Promega, USA
Isopropanol	Roth, Deutschland
Kardiale Fibroblasten (Ratte) (RCF)	Cell Applications Inc., USA
Magnesium Chlorid	Promega, USA
Methanol	Fluka, Deutschland
Milchpulver	Roth, Deutschland

Natriumdodecylsulfat	Roth, Deutschland
Natronlauge	Sigma-Aldrich, USA
Oligo(dT) ₁₅ Primer	Promega, USA
PDGF-BB	PeptoTech, USA
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Fluka, Germany
Phosphate-buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, USA
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Deutschland
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, USA
2-Propanol	Fluka, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Schweiz
Rainbow Protein Marker	Amersham, UK
RCF Basalmedium	Cell Applications Inc., USA
RCF Wachstumsmedium	Cell Applications Inc., USA
RIPA Puffer	Santa Cruz, USA
RNase Away	Roth, Deutschland
Rnasin® Ribonuklease Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
Salzsäure	Promega, USA
SDS Solution, 10% w/v	Promega, USA
Sorafenib	Bayer, Deutschland
Sunitinib	Pfizer, USA
Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich, USA
Trichlor Essigsäure	Sigma-Aldrich, USA
Tris buffered saline (TBS)	Sigma-Aldrich, USA
Tris-Hcl	Sigma-Aldrich, USA
Trizol	Invitrogen, Deutschland
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, USA

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
Autoklaviergerät	Tuttnauer, Niederlande
Beta Counter	Canberra Packard, Deutschland
BioDoc Analyzer	Biometra Deutschland
Centrifuge 5417D	Eppendorf, USA
Elektrophoresekammern	Biometra, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäß	Eppendorf, USA
Falcon Gefäße	Greiner Bio-One, Deutschland
Film Kassetten	Kodak, USA
Flüssigstickstoff	Linde, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop	Leica, Deutschland
Gefrierschränke (+4°C, -20 °C, -80 °C)	Bosch, Deutschland
Heizblock	Grant Industries, UK
Homogenisator Precellys	PeqLab, Deutschland
Hypersensitiver Röntgenfilm	Amersham, UK
Infinite® 200 Mikroplatten Reader	Tecan, Schweiz
Inkubator (Zellkultur)	Hera Cell Heraeus, Deutschland
Inolab PH-Meter	WTW, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph, Deutschland
Multifuge Zentrifuge	Heraeus, Deutschland
Mx3000P® qPCR	Stratagene, USA
Netzteil	Biometra, Deutschland
Nitrocellulosemembranen	Bio-Rad, USA
PCR-Thermocycler	Biometra, Deutschland
PCR Tube Stripes	Eppendorf, USA
Petrischalen & Zellkulturgefäße	Greiner Bio-One, Deutschland
Pipetten, Pipetboy & Pipettenspitzen	Eppendorf, USA
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe Plus, Deutschland

Precellys Keramik Kit	PeqLab, Deutschland
Rainbow Marker	Amersham, UK
Röntgenfilm	Kodak, USA
Schüttler	Biometra, Deutschland
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One, Deutschland
Spektrophotometer	PeqLab, Deutschland
Tumbling Table WT17	Biometra, Deutschland
Vortexer	VWR, Deutschland
Wasserbad (Zellkultur)	Medingen, Deutschland
Western Blot Kammern	Biometra, Deutschland
Zellkulturflaschen und Platten	Greiner Bio-One, Deutschland

2.1.3 Antikörper

Primärantikörper

	Hersteller
Maus anti-GAPDH monoklonaler Antikörper	Sigma-Aldrich, USA
Kaninchen anti-PDGFR- β polyklonaler Antikörper	Santa Cruz, USA
Kaninchen anti-p-PDGFR- β (Tyr 1021) polyklonaler Antikörper	Santa Cruz, USA

HRP-gekoppelte Sekundärantikörper

	Hersteller
Kaninchen anti-Maus IgG	Sigma-Aldrich, USA
Ziege anti-Kaninchen IgG	Pierce, USA

2.1.4 Primer

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

Gen (Ratte)	Vorwärtsprimersequenz	Rückwärtsprimersequenz
ANP	5' TCAAGCTGCTTCGGGGGTAG 3'	5' ACCTCTCAGTGGCAATGCGA 3'
BNP	5' CAGCTGCCTGGCCCATCACT 3'	5' GCTCCAGCAGCTTCTGCATCGT 3'
α SMA	5' GGCACCCAGGGCCAGAGTCA 3'	5' TGACACCCTGGTGACGGGGC 3'
Kollagen3a1	5' CCCTGCTCGGAATTGCAGAGACC 3'	5' CCGCGGGACAGTCATGGGAC 3'
α MHC	5' CGGACACTGGAGGACCAGGC 3'	5' GCCTAGCCAGCTCGCCGTTC 3'

βMHC	5' ACCGGAGAATCCGGAGCTGGT 3'	5' CAAGGTGCCCTTGCTGGGG 3'
HPRT1	5' GACTTTGCTTTCCTTGGTCA 3'	5' AGTCAAGGGCATATCCAACA 3'
PBGD	5' CAAGGTTTTTCAGCATCGCTACCA 3'	5' ATGTCCGGTAACGGCGGC 3'
KIT	5' GGCCACTCACACGGGCAAAT 3'	5' CCTGTGGGTCTGTCAGGGGG 3'
VEGFR 1	5' TAACTGCCGAGGACGCAGGG 3'	5' GCCCAGTGGGTAGAGAGGTGG 3'
VEGFR 2	5' ATAGCCCGGAACGCTACCCC 3'	5' CCCTGGCCCGCAAAGTC 3'
VEGFR 3	5' CCAGACCCTCACCTGCACCA 3'	5' CGATGGGGTTCACAGCGTCC 3'
PDGFR α	5' AAGTGGTCAACGCCTCAGCG 3'	5' GTGCGGAGGACGCAGGG 3'
PDGFR β	5' CGTGTGAAGGTGTCAGAAGCGG 3'	5' GCCCCGACAGCGGAGTATCT 3'
CSF-1R	5' TGCAAGGCTGTTGTGAACGCT 3'	5' TGAGTGAGTGGCCGAGCACA 3'
Flt-3	5' TGTGGGAAGGAACAACACCGG 3'	5' GCATCAGATTTGTGGGTACGC 3'
RET	5' GATGGCGAAAGCGAGGTCCG 3'	5' AGCTGGGCACTTCTCCAGGG 3'

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden männliche Ratten (*Rattus norvegicus*) des Zuchtstammes Sprague-Dawley verwendet. Diese wurden über die Firma Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH in Sulzfeld bezogen. Die Haltung erfolgte im Tierstall der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Giessen. Die Ratten hatten Zugang zu Altromin® Standarddiätfutter und Wasser. Die Beleuchtungsdauer betrug 12 Stunden pro Tag, die Umgebungstemperatur im Mittel 25°C. Die Genehmigungen für die Tierversuche wurden bei den Regierungspräsidien Giessen und Darmstadt eingeholt und sind unter den Aktenzeichen GI 20/10 Nr. 17/2010, GI 20/10 Nr. 68/2007 und B2 191 einzusehen.

2.2.1.1 Monocrotalin Modell

Ausgewachsenen Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 300-350 g wurden subkutan 60 mg/kg Monocrotalin respektive das Lösungsmittel injiziert. Dies geschah unter Isoflurananästhesie. Die 21-Tage-Kontrolltiere erhielten am Tag 1 eine subkutane Monocrotalininjektion, die Organentnahmen erfolgten am Tag 21. Die übrigen Tiere wurden 21 Tage nach der MCT Injektion für die zweimal tägliche Gabe von Sunitinib (10 mg/kg; 5 mg/kg; 1 mg/kg pro Tag,), die einmal tägliche Gabe von Sorafenib (10 mg/kg pro Tag) oder einem Placebo randomisiert. Die Behandlung dauerte bis zum Tag 35 an.

Die experimentellen Gruppen gliederten sich wie folgt:

Tabelle 3: Übersicht MCT Gruppe

Kontrolle	n = 8
MCT + Placebo 21 Tage	n = 4
MCT + Placebo 35 Tage	n = 12
MCT + Sunitinib 10 mg/kg	n = 9
MCT + Sunitinib 5 mg/kg	n = 9
MCT + Sunitinib 1 mg/kg	n = 8
MCT + Sorafenib 10 mg/kg	n = 7

2.2.1.2 PAB Modell

Das PAB Modell imitiert eine Rechtsherzbelastung wie sie bei einer PH auftritt. Es wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 180-200 g verwendet. Die Tiere wurden mit 3% Isofluran narkotisiert, intubiert und beatmet. Währenddessen wurde die Pulmonalarterie mit einer 0,9 mm weiten Titanklammer verengt (Hemoclip®, Edward Weck, Research Triangle Park, NC, USA) Dies entspricht einem Stenosegrad von etwa 60%. Anschließend wurde der Brustkorb verschlossen. Kontrolltiere wurden scheinoperiert. Sieben Tage nach der Prozedur wurden die Tiere für die zweimal tägliche Gabe von Sunitinib (10 mg/kg), die einmal tägliche Gabe von Sorafenib (10 mg/kg) oder einem Placebo über 14 Tage bzw. 7 Tage randomisiert. Die Organentnahme erfolgte am Tag 7 respektive am Tag 21.

Tabelle 4: Übersicht PAB Gruppe

Scheinoperierte (Sham)	n = 9
PAB 7 Tage + Placebo	n = 5
PAB 21 Tage + Placebo	n = 11
PAB 21 Tage + Sunitinib 10 mg/kg	n = 11
PAB 21 Tage + Sorafenib 10 mg/kg	n = 11

2.2.2 Bestimmung der hämodynamischen Parameter

Für die hämodynamischen Messungen wurden die Ratten mit Ketamin und Xylazine i.p. anästhesiert. Die linke Arteria carotis und die rechte Jugularvene wurden freipräpariert, punktiert und mit Druckabnehmern versehen. Der venöse

Druckabnehmer wurde bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Die typische dreigipfelige und atemverschieblichen Druckkurve diente zur Lagekontrolle des Rechtsherzkatheters. Die von den flüssigkeitsgefüllten Druckabnehmern registrierten Drücke wurden verstärkt, digitalisiert und auf einen Personal Computer übertragen. Nach der Kalibrierung wurden die Werte für 10 – 20 Minuten aufgezeichnet. Es wurde der systolische Druck im RV (RVSP) sowie der systolische Druck im Körperkreislauf bestimmt (SAP).

Für die Durchführung dieser Versuche und der hämodynamischen Messungen danke ich der Arbeitsgruppe.

2.2.3 Bestimmung des Organgewichts

Der rechte Ventrikel wurde von dem linken Ventrikel und dem Septum getrennt. Das Feuchtgewicht der beiden Organanteile wurde bestimmt. Die RV Hypertrophie wurde als Verhältnis von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel und dem Septum angegeben. Die Organanteile wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Für die Gewichtsbestimmungen danke ich ebenfalls der Arbeitsgruppe.

2.2.4 Gewinnung der RNA aus den rechten Ventrikeln

Es wurden 50 mg des zu untersuchenden Organs abgewogen und 0,5 ml Trizol hinzugegeben. Die Masse wurde homogenisiert und im Anschluss zehn Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Dann wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, die Proben durch Schütteln gemischt und erneut bei Raumtemperatur für zehn Minuten stehen gelassen. Im Anschluss hieran fand eine Zentrifugation bei 10500 RPM für 15 Minuten statt. Die oberste, wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein ribonuklease freies Behältnis überführt. Es wurden nun 250 µl Isopropanol zugegeben und durch Invertieren vermischt. Daraufhin folgte erneut eine Ruhephase von zehn Minuten bei Raumtemperatur. Der folgende Zentrifugationsschritt fand bei 10500 RPM statt und dauerte zehn Minuten. Das nun sichtbare RNA Pellet wurde durch vorsichtiges Abkippen und Abpipettieren von dem wässrigen Überstand befreit und mit 500 µl 75% Ethanol gewaschen. Hierzu fand eine Zentrifugation bei 6600 RPM für fünf Minuten statt. Der Überstand wurde erneut vorsichtig entfernt und Flüssigkeitsreste um das Pellet abpipettiert. Dieses wurde nun 15 Minuten bei Raumtemperatur zum Trocknen gelagert. Nun folgend wurde das Pellet in 25 µl DEPC freiem Wasser resuspendiert und

für zehn Minuten bei 55 °C inkubiert um die RNA in Lösung zu bringen. Mit Hilfe eines NanoDrop Spektrophotometer wurde die Qualität und Konzentration der RNA validiert. Die gewonnenen Proben wurden bei -80 °C gelagert. Die zuvor beschriebenen Schritte fanden wenn nicht anders erläutert auf Eis statt. Die Zentrifugationsschritte wurden bei +4 °C durchgeführt.

2.2.5 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe eines bestimmten Enzyms, der Reversen-Transkriptase, ist es möglich, RNA in eine stabilere Form umzuwandeln, die cDNA. Für diese Reaktion wurde das ImProm II System von Promega genutzt. Es arbeitet in zwei Schritten. Zunächst wurde 1 µg RNA mit oligo(dT)₁₅-Primer (0.5 µg/µl) auf ein Gesamtvolumen von 5 µl gebracht und für sechs Minuten bei 70 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das vorbereitete Reaktionsgemisch (Tabelle 5) hinzugegeben und für fünf Minuten bei 25 °C, dann für 60 Minuten bei 42 °C und abschließend für weitere 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 5: Ansatz für die cDNA-Synthese

Komponenten	Konzentration	Volumen
Nuklease freies Wasser	-	4µl
ImProm-II 5X Reaktionspuffer	1x	4µl
25 mM MgCl ₂	5 mM	4µl
10 mM dNTP Mix	0,5 mM	1µl
RNasin® Ribonuklease Inhibitor (1U/µl)	1U	1µl
ImProm-II Reverse Transkriptase (1U/µl)	1U	1µl
Gesamt Volumen		15µl

2.2.6 Real time quantitative PCR (RTq-PCR)

Die Real time quantitative PCR ist ein Verfahren, das auf der herkömmlichen PCR beruht und bei gleichzeitiger Vermehrung die Quantifizierung bestimmter Genprodukte ermöglicht. Als Grundlage dienen das Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG von Invitrogen und das MX3000p qPCR Gerät von Stratagene. Die Reaktionskomponenten wurden nach entsprechendem Schema pipettiert:

Tabelle 6: RTq-PCR Reaktionsansatz

Komponenten	Konzentration	Volumen
SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 2x	1x	12,5µl
50mM MgCl ₂	5mM	2µl
ROX		0,5µl
10 µM Vorwärtsprimer	0,2 µM	1µl
10 µM Rückwärtsprimer	0,2 µM	1µl
cDNA der jeweiligen Probe		1µl
Nuklease freies Wasser		7µl

In den Negativkontrollen wurde die cDNA durch nukleasefreies Wasser ersetzt. Der Ablauf der 40 einzelnen Arbeitszyklen gestaltete sich wie folgt:

Tabelle 7: Ablauf der RT-qPCR Zyklen

Aktivierung	50 °C	2 Minuten
Denaturierung	95 °C	2 Minuten
Hybridisierung	59 °C	30 Sekunden
Verlängerung	72 °C	30 Sekunden

Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Der cycle threshold (Ct-Wert), also der RT-qPCR Zyklus an dem die Fluoreszenz über den Wert der Hintergrund Fluoreszenz stieg, wurde sowohl für das zu untersuchende Gen wie auch für ein unabhängiges Referenzgen bestimmt. Als Referenzgene dienten die Porphobilinogen Desaminase (PBDG) bzw. die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT1). Der Ct-Wert des Zielgens in den einzelnen Gruppen wurde vom Ct-Wert des Referenzgens subtrahiert um den Δ Ct-Wert zu erhalten. Durch die Subtraktion der Δ Ct-Werte der jeweiligen Zielgruppen von den Δ Ct-Werten der Kontrollgruppe wurde der $\Delta\Delta$ Ct-Wert berechnet. Bei der Darstellung der Sunitinib Zielrezeptoren wurden die Δ Ct-Werte verwendet. Dies geschah, um die Unterschiede zu den Kontrollgruppen besser sichtbar machen zu können.

2.2.7 Proteinisolation aus den rechten Ventrikeln

Es wurden 100 mg der Organe abgewogen und mit 800 µl kaltem RIPA Lysispuffer versetzt. Zuvor wurden ein Protease-Inhibitor-Cocktail sowie PMSF und Natriumorthovanadat hinzugegeben. Die Masse wurde zerkleinert und im Anschluss für

30 Minuten bei 12000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde verworfen.

2.2.8 Analyse der Proteinkonzentration

Als Grundlage für die Konzentrationsbestimmung diente das DC-Protein Assay von Bio-Rad, das auf dem Lowry-Test basiert. Hierbei kommt es zunächst zur Reaktion von Kupferartrat mit den Proteinen in einem alkalischen Milieu. Der Kupferproteinkomplex reduziert in einem zweiten Schritt die dazugegebene Folinreagenz und erzeugt so eine Blaufärbung mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm. Die Messung erfolgte mit einem Tecan Mikrotiterplatten Reader. Als Standard diente bovines Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 2 µg/µl, 1µg/µl, 0,5µg/µl und 0,25 µg/µl. Es wurde im Doppelansatz gearbeitet.

2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden in ihren Konzentrationen angeglichen, im Verhältnis 4:1 mit 5-fach SDS Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 100 °C aufgeköcht, um eine Denaturierung zu erreichen. Das SDS bewirkt eine Angleichung der Ladungsverhältnisse und ermöglicht somit eine Auftrennung im elektrischen Feld anhand der Proteingröße. Die verwendeten Gele setzten sich aus einem 6% Sammel- und einem 7,5% Trenngelanteil zusammen. Die Elektrophorese fand in Kammermodulen der Firma Biometra statt und wurde in Lauffpuffer für etwa eineinhalb Stunden bei 120 V und Raumtemperatur durchgeführt. Es wurde für jedes Gel ein Rainbow Marker der Firma Amersham zur Bestimmung der Proteingröße geladen. Es wurden jeweils 15 µg Protein der einzelnen Proben für den GAPDH Antikörper bzw. 30 µg Protein für die übrigen Antikörper verwendet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Lauffuffers

	Zielkonzentration
Tris-HCl	25 mM
Glycin	192 mM
SDS 10%	0.1%

Tabelle 9 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Sammelgel (6%)	Menge	Trenngel (7,5%)	Menge
Aqua dest.	1,34 ml	Aqua dest.	2,65 ml
0,5M Tris; pH=6,8	0,625 ml	1,5M Tris; pH=8,9	1,5 ml
10% SDS	25 µl	10% SDS	60 µl
Acrylamid	0,5 ml	Acrylamid	0,5 ml
10% APS	12,5 µl	10% APS	30 µl
TEMED	2,5 µl	TEMED	6 µl

2.2.10 Western Blotting

Die aufgetrennten Proteine wurden in einer mit Transferpuffer gefüllten Blottingkammer vom Gel auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Dies geschah bei 100 V für eine Stunde unter Kühlung.

2.2.11 Antikörperinkubation und Entwicklung

Die Nitrocellulosemembranen wurde entnommen und in 5% fettfreie Milch/TBST gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden die Membranen mit den entsprechenden, in Milch verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Dies geschah für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler und wurde über Nacht bei +4 °C im Kühlschrank fortgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Membranen zunächst dreimal für zehn Minuten mit TBST gewaschen und dann für eine Stunde unter Schütteln mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper inkubiert. Dieser war mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran erneut nach zuvor beschriebenem Schema mit TBST gewaschen dann eine ECL-Lösung von Amersham hinauf gegeben und fünf Minuten unter Lichtabschirmung einwirken gelassen. Zur Darstellung wurden abhängig von der Signalintensität normale oder hypersensitive Filme verwendet.

2.2.12 Membranstripping

Je nach Notwendigkeit wurden die verwendeten Membranen mit einem Strippingpuffer (Tris 0,5M pH 6,8; SDS 10%, β-Mercaptoethanol & Aqua dest.) versetzt und für 30 Minuten bei 60 °C unter Schütteln inkubiert, mit TBST gewaschen, dann mit 5%

fettfreier Milch/TBST geblockt und anschließend neu mit einem Primärantikörper inkubiert.

2.2.13 Bandenquantifizierung

Die Quantifizierung des Proteingehalts wurde mit dem Biometra Illuminator und der BioDoc Software durchgeführt. Als Referenzwert diente die Intensität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

2.2.14 Zellkultivierung

Die Grundlage für die Zellkulturexperimente stellten kardiale Fibroblasten der Ratte (RCF) dar, welche von der Firma Cell Applications bezogen wurden. Diese wurden aus Sprague-Dawley Ratten isoliert und in Passage zwei kryokonserviert. Die Zellen wurden mit einem RCF Wachstumsmedium (Cell Applications Inc.) ernährt und bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ und 95% O₂ gelagert. Um das Wachstum zu überprüfen wurde ein Phasenkontrastmikroskop verwendet. Das Wachstumsmedium wurde alle drei Tage gewechselt bis eine Wachstumsdichte von etwa 80% erreicht war. Es folgte eine weitere Subkultivierung für die die Zellen mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA Lösung angedaut wurden um sie von der Oberfläche zu lösen. Zur Neutralisierung diente eine gefilterte FCS Lösung. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer bestimmt und entsprechend der Anforderungen in Wachstumsmedium gegeben und erneut ausgesät.

2.2.15 [³H]Thymidin-Proliferationsassay

Die Messung der Proliferation basiert bei diesem Assay auf der Inkorporation von radioaktivem Thymidin in die replizierte DNS und deren Bestimmung durch einen Szintillationszähler. Vor der Stimulation mit spezifischen Wachstumsfaktoren bzw. der Behandlung mit den Inhibitoren wurden die Zellen für 24 Stunden mit einem RCF Basalmedium behandelt, um einen Einfluss des zuvor verwendeten Wachstumsmediums auszuschließen. Die Stimulation erfolgte mit PDGF-BB, EGF und bFGF (Tabelle 10).

Tabelle 10: Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktor	Konzentration
Platelet-Derived-Growth-Factor BB (PDGF-BB)	30 ng/ml
Epidermal-Growth-Factor (EGF)	50 ng/ml
Basic-Fibroblast-Growth-Factor (bFGF)	50 ng/ml

Als Inhibitor diente Sunitinib in verschiedenen Konzentrationen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Inhibitor

Inhibitor	Konzentration
Sunitinib	3 nM; 10 nM; 30 nM; 100 nM, 300 nM

Die Experimentanordnung erfolgte auf 48-Well Platten. Die Gruppengröße betrug jeweils Fünf. Jedes Experiment wurde drei mal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

Tabelle 12: Experimentanordnung Proliferationsassay

Basal	Wachstumsfaktor	WF + Sunitinib 3 nM	WF + Sunitinib 10 nM	WF + Sunitinib 30 nM	WF + Sunitinib 100 nM	WF + Sunitinib 300 nM
Basal	Wachstumsfaktor	WF + Sunitinib 3 nM	WF + Sunitinib 10 nM	WF + Sunitinib 30 nM	WF + Sunitinib 100 nM	WF + Sunitinib 300 nM
Basal	Wachstumsfaktor	WF + Sunitinib 3 nM	WF + Sunitinib 10 nM	WF + Sunitinib 30 nM	WF + Sunitinib 100 nM	WF + Sunitinib 300 nM
Basal	Wachstumsfaktor	WF + Sunitinib 3 nM	WF + Sunitinib 10 nM	WF + Sunitinib 30 nM	WF + Sunitinib 100 nM	WF + Sunitinib 300 nM
Basal	Wachstumsfaktor	WF + Sunitinib 3 nM	WF + Sunitinib 10 nM	WF + Sunitinib 30 nM	WF + Sunitinib 100 nM	WF + Sunitinib 300 nM

RCF Basalmedium wurde für alle Gruppen außer der Kontrollgruppe mit einem der Wachstumsfaktoren versetzt. Weiterhin wurden alle Gruppen bis auf eine mit dem Inhibitor in beschriebener Konzentration behandelt. Nach 20 Stunden wurde zu allen Gruppen [³H]Thymidin gegeben, nach weiteren vier Stunden folgten zwei Waschschrte mit HBSS Puffer und eine Inkubation in kaltem Methanol für 15 Minuten bei +4 °C. Danach wurden die Zellen für 15 Minuten mit 10% TCA inkubiert um die Nukleinsäuren auszufällen. Im Anschluss hieran folgten zwei Waschschrte mit

Aquadest und die Lysierung der Zellen mit 0,1 M Natronlauge unter Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Messung erfolgte mit dem Canberra-Packard β -counter und wurde als Detektionen pro Minute (CPM) angegeben.

2.2.16 Statistische Auswertung

Die GraphPad Prism 5 Software diente als Grundlage für die statistische Auswertung. Verwendet wurde die 1-way ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Hoc-Test. Werte mit einer Irrtums-Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. $P < 0,01$ wurde als zweifach, $p < 0,001$ als dreifach signifikant bewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht über die gewonnenen Daten

- Tierexperimentell im MCT und im PAB Modell:
 - mRNA Bestimmung im RV
 - Rezeptorexpression der Sunitinib-Zielstrukturen
 - Hypertrophiemarker (ANP, BNP, α MHC, β MHC)
 - Fibrosemarker (Kollagen 3a1, α SMA)
 - PDGFR β Proteinexpression im RV
 - Strukturelle Parameter
 - Verhältnis des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel und dem Septum (RV/(LV+S)) als Marker für die Rechtsherzhypertrophie
 - Hämodynamische Parameter
 - Rechtsventrikulär systolischer Druck
 - Systemischer-arterieller Blutdruck
- In der Zellkultur:
 - Proliferation kardialer Fibroblasten

3.2 MCT Modell

3.2.1 mRNA-Expressionsprofil der Sunitinib Zielstrukturen

Die mRNA-Expression der Sunitinib Zielstrukturen VEGFR 1-3, PDGFR α und β , KIT, CSF-1R, Flt3 und RET wurde in rechten Ventrikeln von gesunden Kontrolltieren sowie in Tieren die sich drei Wochen bzw. fünf Wochen nach der Injektion mit MCT befanden und eine PH mit rechtsventrikulärer Hypertrophie entwickelt hatten, untersucht. Drei Wochen nach MCT Injektion zeigten sich bereits Tendenzen zu einer erhöhten Expression für PDGFR α und β , sowie CSF-1R. In den Tieren, die fünf Wochen nach Injektion untersucht wurden, war ein signifikanter Anstieg der oben genannten Parametern gegenüber den Kontrolltieren festzustellen (Abbildung 10). Bei VEGFR 1-3 zeigten sich keine eindeutigen Tendenzen zwischen den Gruppen (Abbildung 8). Für RET, KIT sowie Flt-3 konnten keine Veränderungen zwischen den Kontrollen und den erkrankten Tieren festgestellt werden (Abbildung 9).

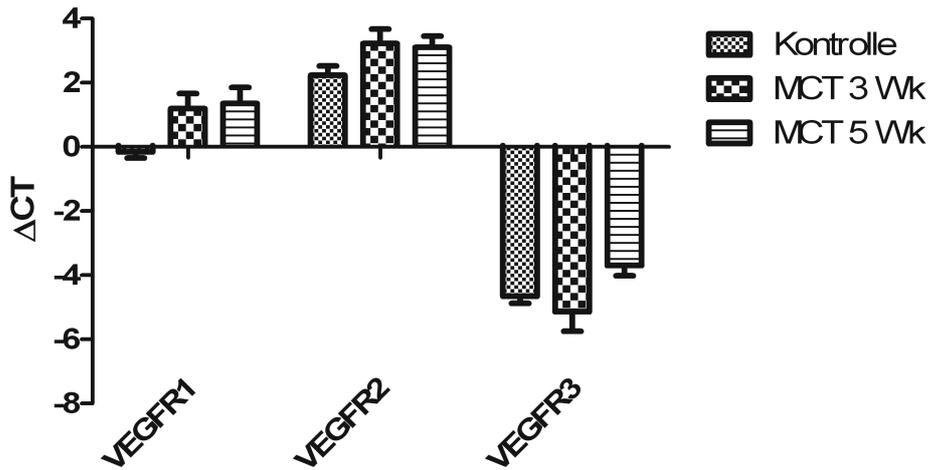


Abbildung 8: mRNA Expression von Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor 1-3 (VEGFR 1-3) im rechten Ventrikel von Ratten. Dargestellt ist das Niveau der mRNA von VEGFR 1-3 im RV von Kontrolltieren sowie in Tieren drei und fünf Wochen nach Monocrotalin Injektion. Angegeben als Δ CT Wert, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1.

Kontrolle: Gesunde Kontrolltiere	n = 4
MCT 3Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT	n = 4
MCT 5Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 4

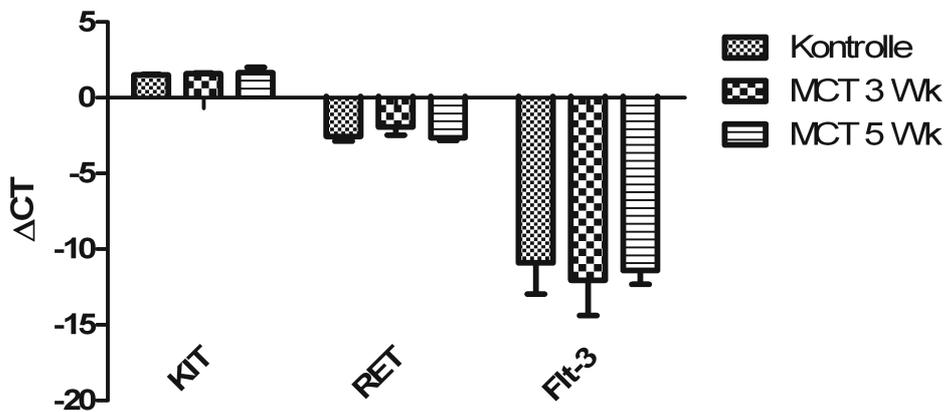


Abbildung 9: mRNA Expression von KIT, RET und Flt-3 im rechten Ventrikel von Ratten. Dargestellt ist das Niveau der mRNA von KIT, RET und Flt-3 im RV von Kontrolltieren sowie in Tieren drei und fünf Wochen nach Monocrotalin Injektion. Angegeben als Δ CT Wert, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1.

Kontrolle: Gesunde Kontrolltiere	n = 4
MCT 3Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT	n = 4
MCT 5Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 4

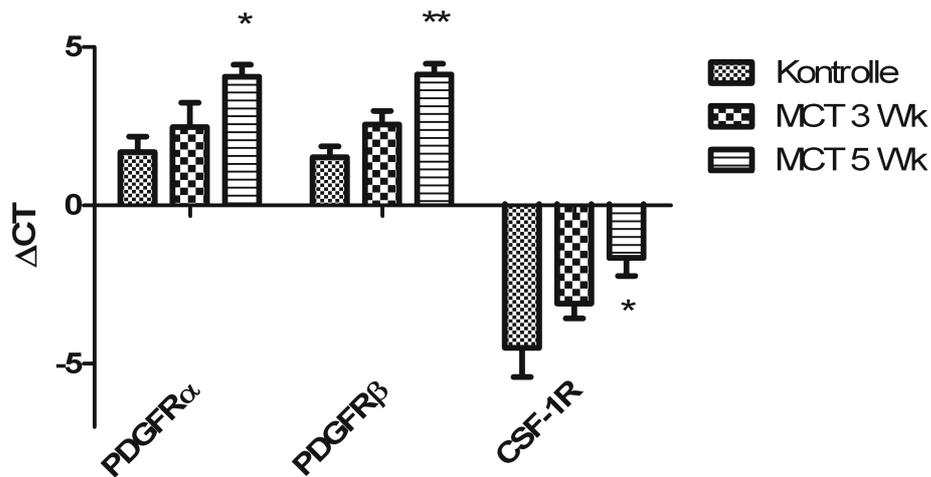


Abbildung 10: mRNA Expression von Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor (PDGFR α , PDGFR β) und CSF-1R im rechten Ventrikel von Ratten. Dargestellt ist das Niveau der mRNA von PDGFR α , PDGFR β und CSF-1R im RV von Kontrolltieren sowie in Tieren drei und fünf Wochen nach Monocrotalin Injektion. Alle Werte sind als Δ CT angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ MCT vs. Kontrolle.

Kontrolle: Gesunde Kontrolltiere	n = 4
MCT 3Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT	n = 4
MCT 5Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 4

3.2.2 Proteinexpression von PDGFR β im rechten Ventrikel

Das Proteinexpressionsprofil des PDGFR β im RV wurde im Western Blot überprüft. Verglichen wurden gesunde Ratten und Tiere mit PH und rechtsventrikulärer Hypertrophie fünf Wochen nach MCT Injektion. Für die Normalisierung wurde ein Antikörper gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Es wurden ein regulärer PDGFR β Antikörper, sowie ein Phospho-Antikörper gegen die Phosphorylierungsstelle am Tyrosin 1021 genutzt, um eine Aussage über die Rezeptoraktivität treffen zu können. Gegenüber den Kontrollen zeigte sich in den MCT Tieren bei der densitometrischen Auswertung eine signifikant erhöhte Expression von PDGFR β und p-PDGFR β (Abbildung 11).

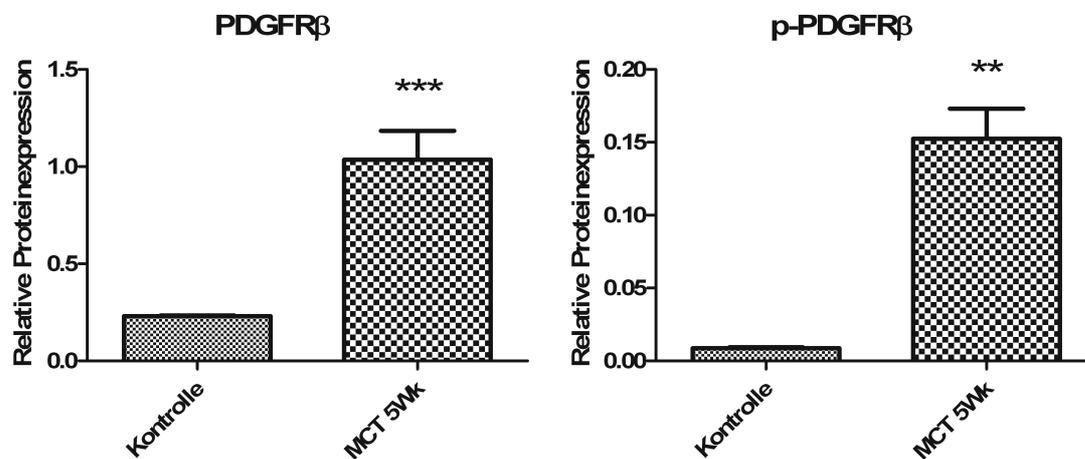
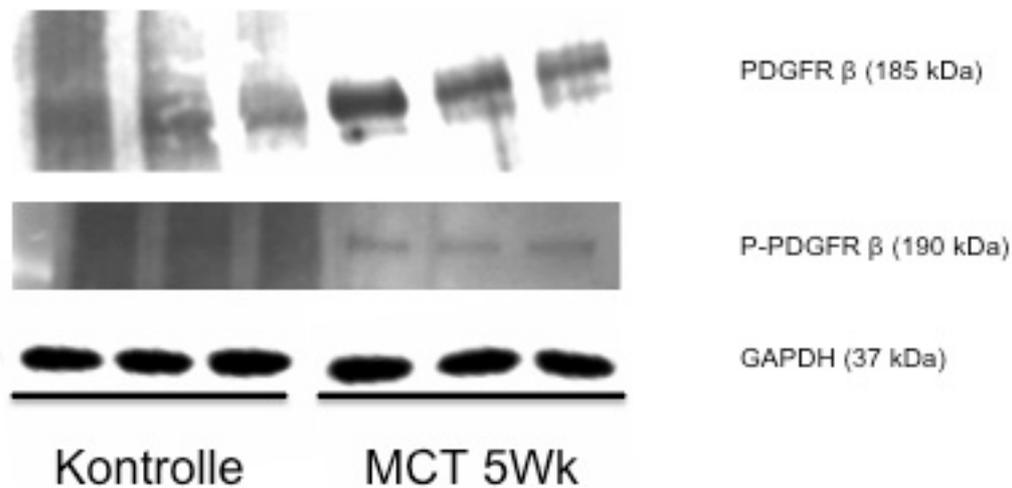


Abbildung 11: Proteinexpression von Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor β und phospho-Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor β im rechten Ventrikel von gesunden Ratten und an pulmonaler Hypertonie erkrankten Ratten fünf Wochen nach Monocrotalin Injektion. Im Western Blot und nach densitometrischer Quantifizierung zeigte sich eine signifikant höhere Expression von PDGFR β und p-PDGFR β in den MCT Tieren gegenüber den Kontrollen. Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde zur Kontrolle der Proteinbeladung genutzt. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SD angegeben. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ MCT 5 Wk versus Kontrolle.

Kontrolle: Gesunde Kontrolltiere	n = 3
MCT 5Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 3

3.2.3 Verhältnis des rechten Ventrikel zum linken Ventrikel und Septum

Als Maß für die rechtsventrikuläre Hypertrophie wurde das Gewicht des rechten Ventrikels im Vergleich zum linken Ventrikel und dem Septum bestimmt und als Verhältnis angegeben. Gegenüber der Kontrollgruppe (0,26 (\pm 0,01)) war bei MCT Placebo das Verhältnis signifikant erhöht (0,58 (\pm 0,14)). Sowohl unter Sunitinib als auch unter Sorafenib verringerte sich das rechtsventrikuläre Gewicht gegenüber dem

des restlichen Herzens signifikant. Das Verhältnis verringerte sich bei Sorafenib auf 0,32 (\pm 0,05). Bei Sunitinib fiel das Verhältnis dosisabhängig auf 0,47 (\pm 0,16); 0,39 (\pm 0,11); bzw. 0,38 (\pm 0,10) (Abbildung 12).

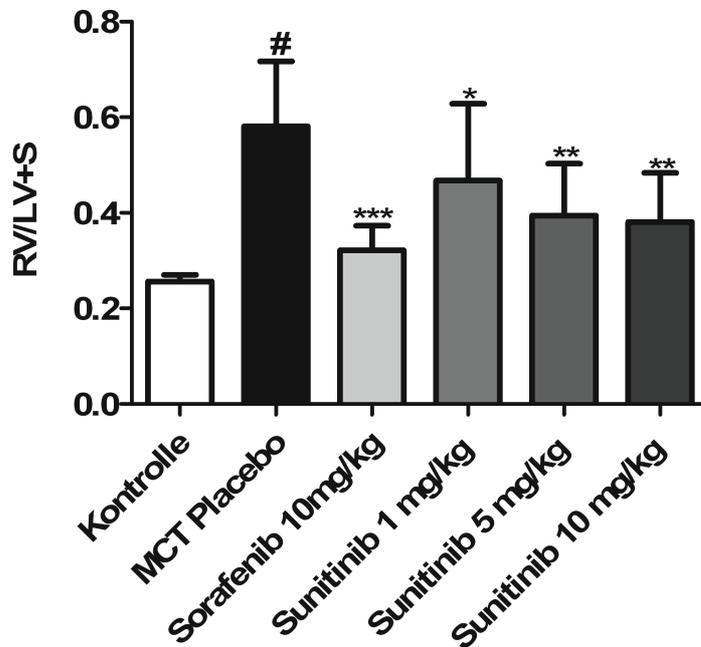


Abbildung 12: Verhältnis vom rechten Ventrikel zu linkem Ventrikel und Septum. Die Injektion von MCT führt nach fünf Wochen zu einer signifikanten Erhöhung der rechtventrikulären Hypertrophie. Diese ist unter Sunitinib und Sorafenib Gabe deutlich rückläufig. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ Gruppen versus MCT Placebo, # $p < 0.001$ – MCT Placebo versus Kontrolle.

Kontrolle: Gesunde Kontrolltiere	n = 8
MCT Placebo: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 12
Sorafenib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 7
Sunitinib 1mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 1 mg/kg/d Sunitinib	n = 8
Sunitinib 5 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 5 mg/kg/d Sunitinib	n = 9
Sunitinib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 9

3.2.4 Rechtsventrikulärer systolischer Druck

Über einen durch die rechte Vena jugularis eingebrachten Katheter wurde der systolische Druck im rechten Ventrikel gemessen. Dieser war in der Kontrollgruppe im Mittel bei 29,43 mmHg (\pm 6,27). In der MCT Placebo Gruppe stieg der Druck signifikant auf Werte an, die im Mittel bei 70,91 mmHg (\pm 15,15) lagen. Im Vergleich hierzu waren in der Sorafenib Gruppe die Werte signifikant niedriger (47,5 mmHg (\pm 6,06)). In den Sunitinib Gruppen fiel der Druck dosisabhängig ab (60,14 mmHg (\pm 12,59); 55 mmHg (\pm 14,18); 48,78 mmHg (\pm 9,24)) (Abbildung 13).

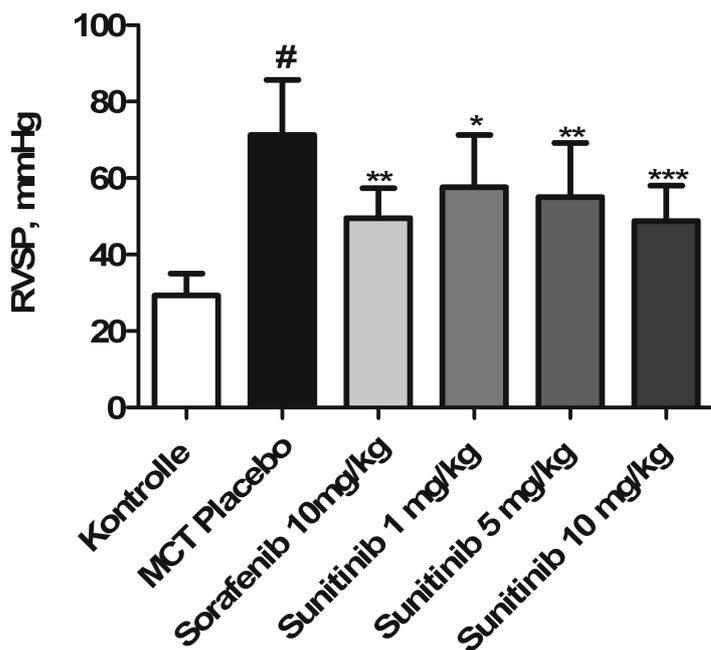


Abbildung 13: Veränderung des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP) durch Monocrotalin und die Senkung durch Sorafenib und Sunitinib. Der RVSP ist in der MCT Placebogruppe signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht und fällt bei der Gabe von Sunitinib und Sorafenib ab. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ Gruppen versus MCT Placebo, # $p < 0.001$ MCT Placebo versus Kontrolle.

Kontrolle: Gesunde Kontrolltiere	n = 8
MCT Placebo: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 12
Sorafenib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 7
Sunitinib 1mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 1 mg/kg/d Sunitinib	n = 8
Sunitinib 5 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 5 mg/kg/d Sunitinib	n = 9
Sunitinib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 9

3.2.5 Systemisch-arterieller Blutdruck

Die Messung des systemisch-arteriellen Blutdrucks erfolgte in der linken Arteria carotis. In der Gruppe, die mit Sorafenib behandelt wurde zeigte sich eine moderate, aber signifikante Erhöhung des Blutdrucks im Mittel auf 151,67 mmHg ($\pm 7,53$) gegenüber MCT Placebo. In den übrigen Gruppen fanden sich keine Abweichungen. Hier lag der SAP im Mittel bei 127,91 mmHg ($\pm 19,65$).

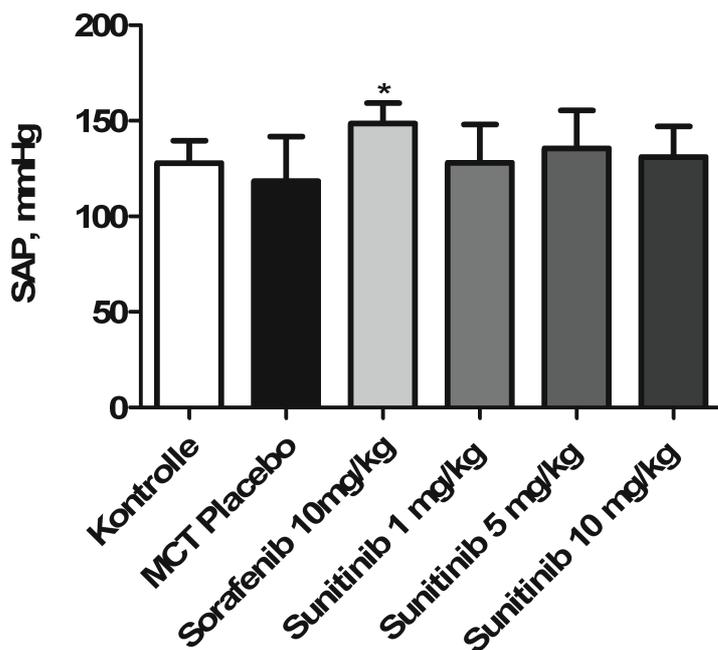


Abbildung 14: Der systemisch-arterielle Blutdruck im Monocrotalin Modell. In der Gruppe die mit Sorafenib behandelt wurde war der SAP gegenüber MCT Placebo erhöht. * $p < 0.05$ MCT Placebo versus Gruppen.

Kontrolle: Gesunde Kontrolltiere	n = 8
MCT Placebo: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 12
Sorafenib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 7
Sunitinib 1mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 1 mg/kg/d Sunitinib	n = 8
Sunitinib 5 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 5 mg/kg/d Sunitinib	n = 9
Sunitinib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 9

3.2.6 mRNA Expression von Hypertrophiemarkern im rechten Ventrikel

Als molekulare Marker für die rechtsventrikuläre Hypertrophie wurden zum einen die natriuretischen Peptide ANP und BNP bestimmt sowie die Veränderung der kardialen Strukturproteine α MHC und β MHC untersucht. Die Expression der mRNA wurde mit Hilfe von RTq-PCR geprüft. Sowohl die Werte für ANP als auch für BNP waren fünf Wochen nach MCT Injektion und Gabe eines Placebos deutlich erhöht. Sunitinib konnte ab einer Konzentration von 5 mg/kg die Expression von ANP und BNP signifikant senken. Unter der Gabe von 10 mg/kg Sorafenib sank die ANP-Expression signifikant, die von BNP nur in der Tendenz (Abbildung 15 und 16). Die Strukturproteine α MHC und β MHC verhielten sich bei der rechtsventrikulären Hypertrophie gegensinnig. Es kam zu einer verstärkten Expression von eigentlich fetaler β MHC gegenüber der im gesunden, reifen Herzmuskel vorkommenden α MHC (Abbildung 17 und 18). Dies konnte für die MCT 5 Wk Gruppe gezeigt werden. Gegenüber der als X-Achse normierten Kontrollgruppe war die Expression von β MHC in MCT 5 Wk deutlich

erhöht, die von α MHC hingegen gesenkt. Sunitinib und Sorafenib vermochten diese Tendenz umzukehren.

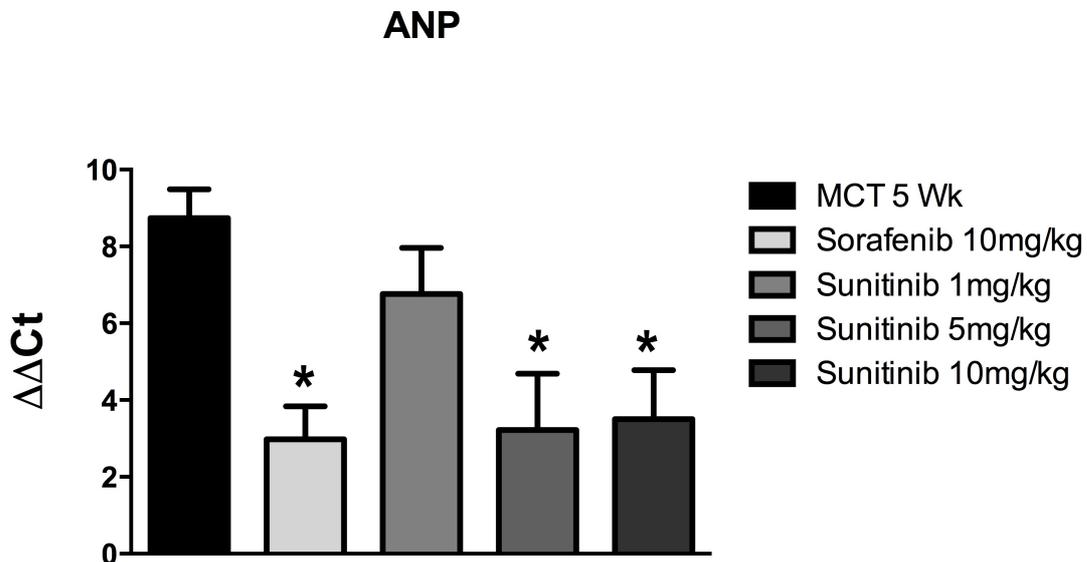


Abbildung 15: mRNA Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) im rechten Ventrikel. ANP ist gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Sowohl Sorafenib als auch Sunitinib senken die Expression signifikant. Für Sunitinib gilt dies ab 5 mg/kg. Alle Werte sind als $\Delta\Delta Ct$ angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase. * $p < 0.05$ MCT Placebo versus Gruppen.

MCT 5 Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 4
Sorafenib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 1mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 1 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 5 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 5 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 4

BNP

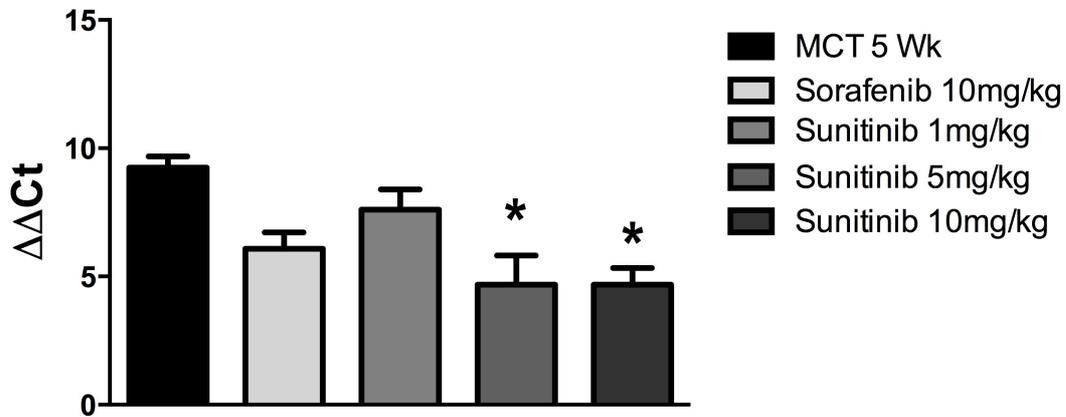


Abbildung 16: mRNA Expression von Brain Natriuretic Peptide (BNP) im rechten Ventrikel. BNP ist gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Sorafenib senkt die Expression in der Tendenz. Sunitinib senkt die Expression ab einer Konzentration von 5 mg/kg signifikant. Alle Werte sind als $\Delta\Delta Ct$ angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase. * $p < 0.05$ MCT Placebo versus Gruppen.

MCT 5 Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 4
Sorafenib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 1mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 1 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 5 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 5 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 4

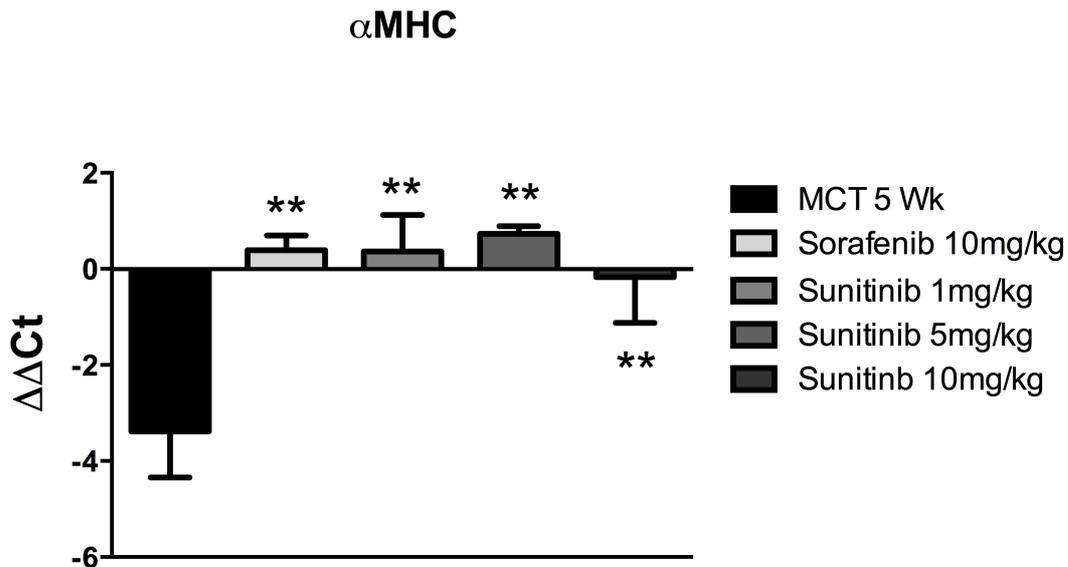


Abbildung 17: mRNA Expression von α-Myosin-Schwere-Kette (αMHC) im rechten Ventrikel. αMHC ist gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt. Sorafenib und Sunitinib heben die Expression signifikant auf das Niveau der Kontrollgruppe. Alle Werte sind als ΔΔCt angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase. ** p<0.01 MCT Placebo versus Gruppen.

MCT 5 Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 4
Sorafenib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 1mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 1 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 5 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 5 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 4

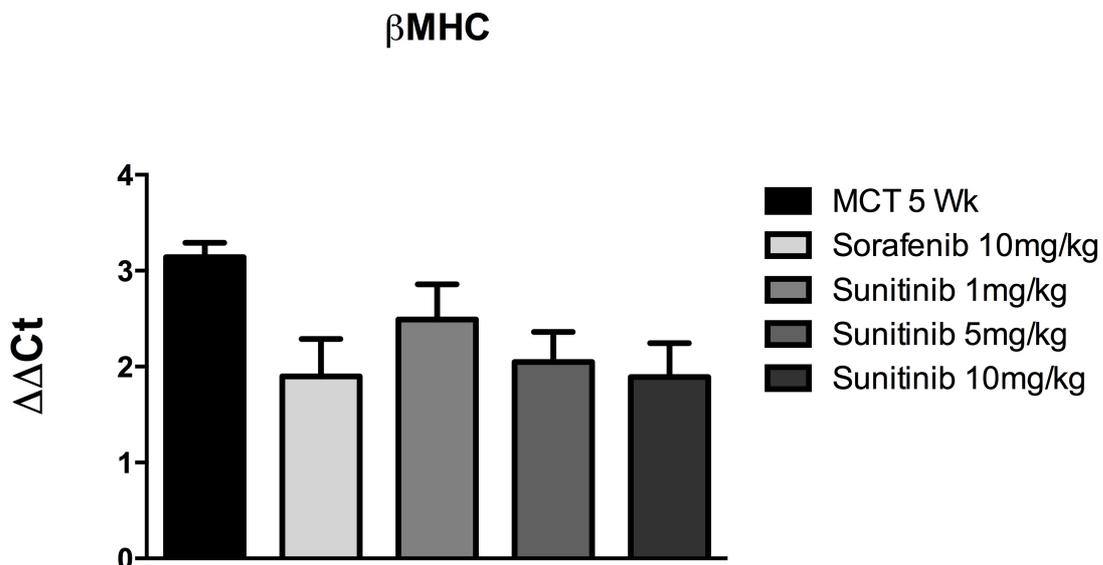


Abbildung 18: mRNA Expression von β-Myosin-Schwere-Kette (βMHC) im rechten Ventrikel. βMHC ist gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Sorafenib und Sunitinib senken die Expression in der Tendenz. Alle Werte sind als ΔΔCt angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase.

MCT 5 Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 4
Sorafenib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 1mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 1 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 5 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 5 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 4

3.2.7 mRNA-Expression von Fibrosemarkern im rechten Ventrikel

Neben der Hypertrophie des RV wurde die Expression von Fibrosemarkern auf der mRNA-Ebene durch RTq-PCR überprüft. Als Marker diente die mRNA von Kollagen 3a1 als ein häufiges Protein in der extrazellulären Matrix von fibrotischen Herzen sowie α -2-Aktin (α SMA) als Strukturprotein von Fibroblasten. Beide Marker waren in MCT 5 Wk deutlich höher exprimiert als in den Kontrollen (Abbildung 19 und 20). Kollagen 3a1 fiel sowohl ab einer Sunitinib Konzentration von 5 mg/kg, als auch bei der Gabe von 10 mg/kg Sorafenib signifikant ab. Bei α SMA konnte Sunitinib bereits ab 1 mg/kg eine deutliche Wirkung zeigen. Für Sorafenib lag ein noch stärkerer Einfluss vor.

Kollagen 3a1

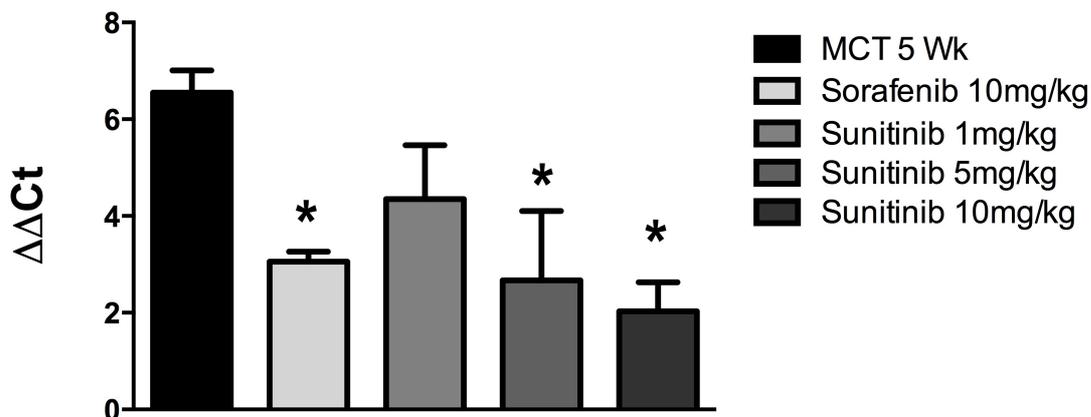


Abbildung 19: mRNA Expression von Kollagen 3a1 im rechten Ventrikel. Sorafenib senkt die Expression von Kollagen 3a1 signifikant, Sunitinib ebenfalls ab einer Dosis von 5 mg/kg. * $p < 0.05$ MCT Placebo versus Gruppen. Alle Werte sind als $\Delta\Delta Ct$ angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase.

MCT 5 Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 4
Sorafenib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 1mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 1 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 5 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 5 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 4

α SMA

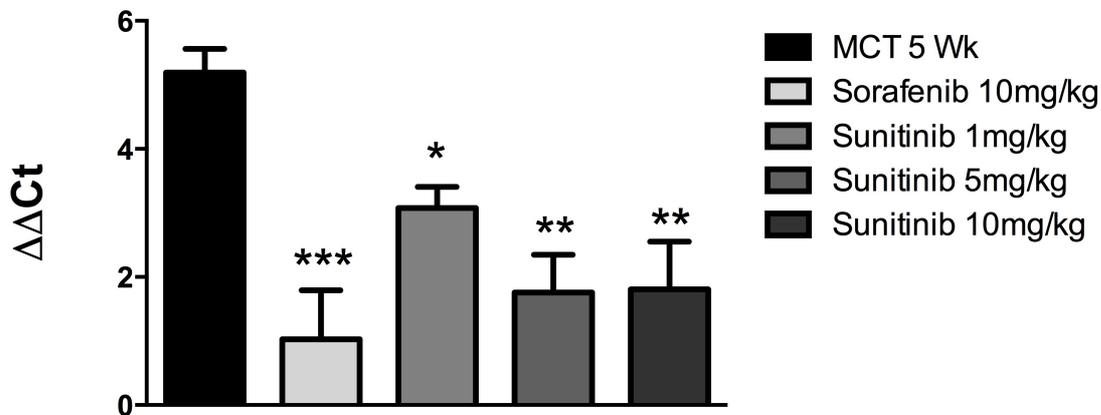


Abbildung 20: mRNA Expression von α -2-Aktin (α SMA) im rechten Ventrikel. Sorafenib senkt die Expression von α SMA signifikant, Sunitinib ebenfalls ab einer Dosis von 1 mg/kg. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ MCT Placebo versus Gruppen. Alle Werte sind als $\Delta\Delta Ct$ angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase.

MCT 5 Wk: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage Placebo	n = 4
Sorafenib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 1mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 1 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 5 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 5 mg/kg/d Sunitinib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: 21 Tage nach Injektion von 60 mg/kg MCT + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 4

3.3 PAB Modell

3.3.1 mRNA-Expressionsprofil der Sunitinib Zielstrukturen

Die mRNA-Expression der bekannten Sunitinib Zielstrukturen VEGFR 1-3, PDGFR α und β , KIT, CSF-1R, Flt3 und RET wurde im RV von scheinoperierten Ratten (Sham) sowie in Tieren mit verengter pulmonaler Ausflussbahn untersucht. Es wurden PAB Ratten verwendet, deren Pulmonalarterien für eine und drei Wochen geclippt waren. Ein deutlicher Anstieg in der Expression von PDGFR α und β war in der „Ein-Wochen-Gruppe“ zu beobachten. In der „Drei-Wochen-Gruppe“ normalisierte sich die Expression wieder auf das Niveau der Sham Gruppe. Beim CSF-1R war ein signifikanter Anstieg in Woche Eins und Drei gegenüber Sham zu beobachten (Abbildung 23). Bei der Expression von VEGFR 1-3 zeigten sich keine eindeutigen Tendenzen zwischen den Gruppen (Abbildung 21). Für RET, KIT sowie Flt-3 konnten keine Veränderungen zwischen der Sham Gruppe und den beiden PAB Gruppen beobachtet werden. (Abbildung 22).

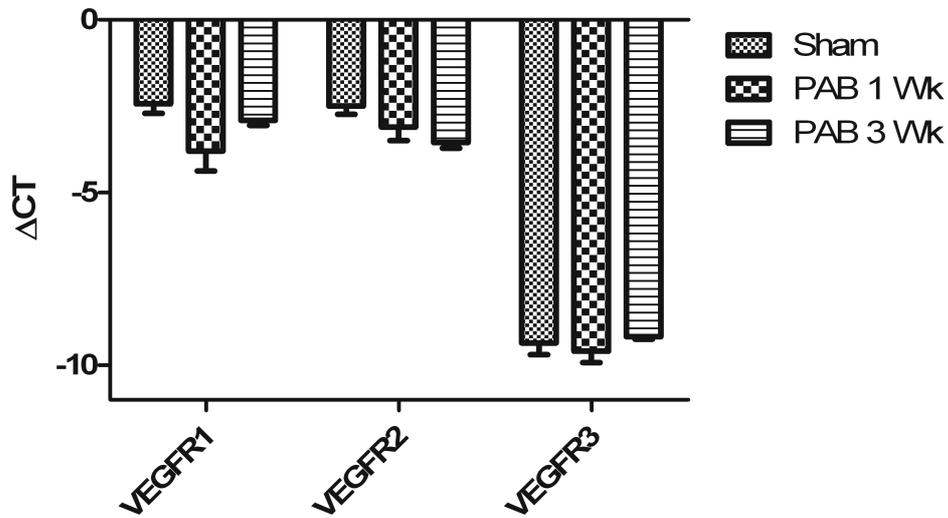


Abbildung 21: mRNA Expression von Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor 1-3 (VEGFR 1-3) im rechten Ventrikel von Ratten. Dargestellt ist das Niveau der mRNA von VEGFR 1-3 in RV von Shamtieren sowie Ratten eine und drei Wochen nach PAB. Angegeben als Δ CT Wert, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1.

Sham: Scheinoperierte Kontrolltiere	n = 5
PAB 1 Wk: PAB für 7 Tage	n = 5
PAB 3 Wk: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 5

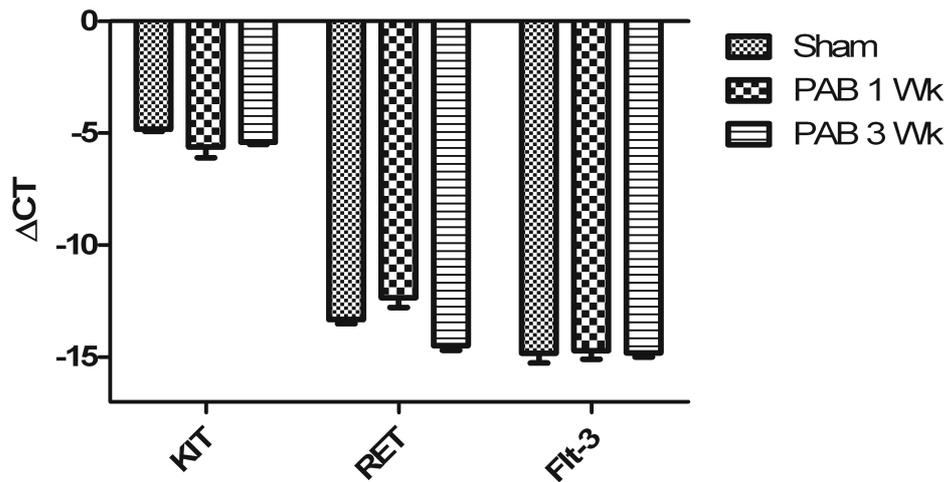


Abbildung 22: mRNA Expression von KIT, RET und Flt-3 im rechten Ventrikel von Ratten. Dargestellt ist das Niveau der mRNA von KIT, RET und Flt-3 in RV von Shamtieren sowie Ratten eine und drei Wochen nach PAB. Angegeben als Δ CT Wert, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1.

Sham: Scheinoperierte Kontrolltiere	n = 5
PAB 1 Wk: PAB für 7 Tage	n = 5
PAB 3 Wk: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 5

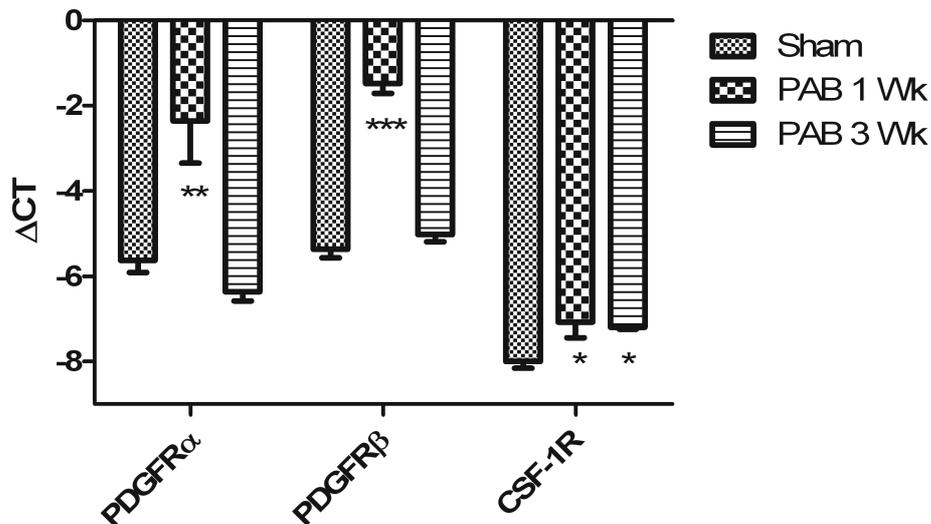


Abbildung 23: mRNA Expression von Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor (PDGFR α , PDGFR β) und CSF-1R im rechten Ventrikel von Ratten. Dargestellt ist das Niveau der mRNA von PDGFR α , PDGFR β und CSF-1R in RV von Shamtieren sowie Ratten eine und drei Wochen nach PAB. Angegeben als Δ CT Wert, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ PAB vs. Sham.

Sham: Scheinoperierte Kontrolltiere	n = 5
PAB 1 Wk: PAB für 7 Tage	n = 5
PAB 3 Wk: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 5

3.3.2 Proteinexpression von PDGFR β im rechten Ventrikel

Das Proteinexpressionsprofil des PDGFR β im RV wurde im Western Blot überprüft. Verglichen wurden scheinoperierte Ratten (Sham) und Tiere mit PAB, eine Woche und drei Wochen nach Einbringen des Hämoclips. Für die Normalisierung wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Es wurden ein regulärer PDGFR β Antikörper sowie ein phospho-Antikörper verwendet, um eine Aussage über die Rezeptoraktivität treffen zu können. In der densitometrischen Analyse fanden sich keine signifikanten Veränderungen, gleichwohl in der Tendenz eine höhere Expression von PDGFR β und p-PDGFR β in PAB 1Wk gegenüber Sham auszumachen war (Abbildung 24). Diese Entwicklung war bei PAB 3 Wk für beide Antikörper leicht rückläufig.

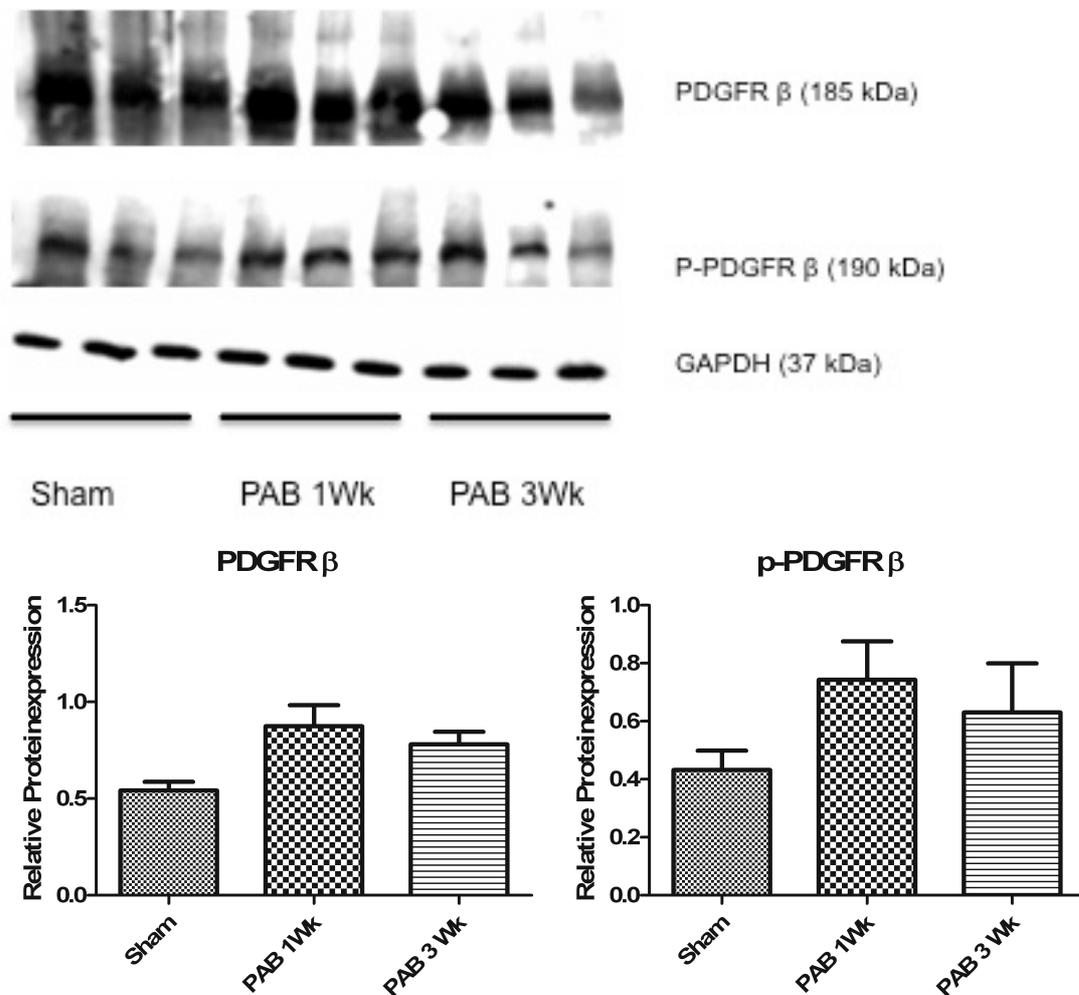


Abbildung 24: Proteinexpression von PDGFR β und p-PDGFR β in rechten Ventrikel von Shamtieren und PAB Tieren nach einer und drei Wochen. Im Western Blot und nach densitometrischer Quantifizierung zeigte sich eine tendenziell höhere Expression von PDGFR β und p-PDGFR β in der PAB 1 Wk Gruppe gegenüber Sham. In der PAB 3 Wk Gruppe war die Expression geringer und näherte sich leicht dem Niveau der Sham Gruppe an. GAPDH wurde zur Kontrolle der Proteinbeladung genutzt. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SD angegeben.

Sham: Scheinoperierte Kontrolltiere	n = 3
PAB 1 Wk: PAB für 7 Tage	n = 3
PAB 3 Wk: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 3

3.3.3 Verhältnis von rechten Ventrikel zum linken Ventrikel und Septum

Die Tiere mit einer Stenose in der pulmonalen Ausflussbahn entwickelten eine rechtsventrikuläre Hypertrophie. Das Verhältnis von RV zum LV und Septum erreichte bei PAB Placebo im Mittel 0,66 (\pm 0,09) gegenüber 0,30 (\pm 0,05) bei der Shamgruppe. Sowohl unter Sunitinib als auch unter Sorafenib Behandlung verringerte sich das RV Gewicht gegenüber dem des restlichen Herzens signifikant. Das Verhältnis verringerte sich bei Sunitinib auf 0,56 (\pm 0,05), bei Sorafenib auf 0,54 (\pm 0,08) (Abbildung 25).

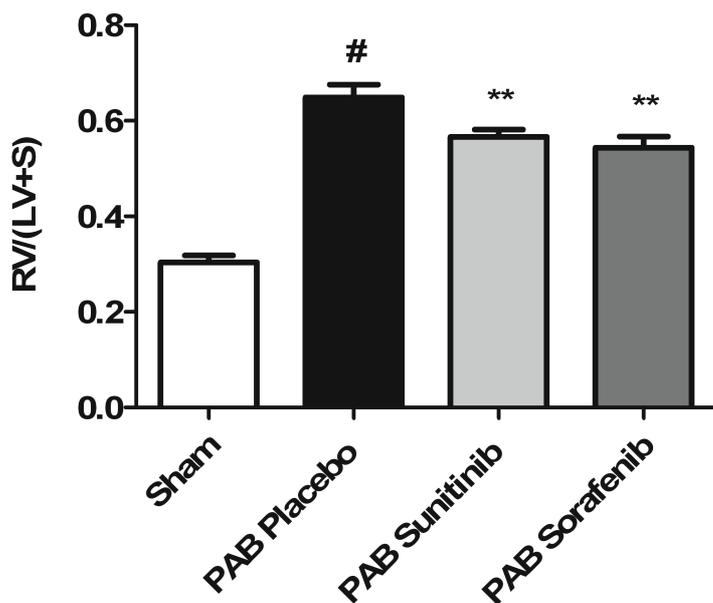


Abbildung 25: Verhältnis vom rechten Ventrikel zum linken Ventrikel und Septum. Die Einengung der pulmonalen Ausflussbahn führt nach drei Wochen zu einer signifikanten Erhöhung der RV Hypertrophie. Diese ist unter Sunitinib und Sorafenib Gabe deutlich rückläufig. ** $p < 0.01$ versus PAB Placebo, # $p < 0.001$ – PAB Placebo versus Sham.

Sham: Scheinoperierte Kontrolltiere	n = 9
PAB Placebo: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 11
PAB Sunitinib: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 11
PAB Sorafenib: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 11

3.3.4 Rechtsventrikulärer systolischer Druck

Nachdem durch den Hämoclip eine Stenose der pulmonalen Ausflussbahn erreicht wurde, konnten bei allen Tieren kompensatorisch hohe Drücke rechtsventrikulär systolisch bestimmt werden. Die Erhöhung des Drucks war sowohl für die PAB Placebogruppe wie auch für die behandelten Gruppen signifikant gegenüber Sham erhöht. Im Mittel betrug der RVSP für die PAB Gruppen 69,06 mmHg ($\pm 12,70$) gegenüber 32,13 mmHg ($\pm 5,36$) bei Sham. Die hämodynamischen Messungen wurden über einen Rechtsherzkatheter durchgeführt (Abbildung 26).

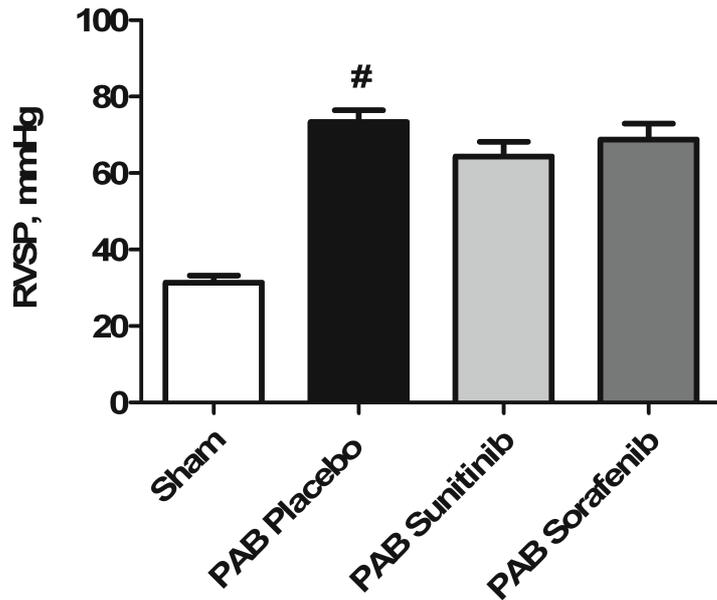


Abbildung 26: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP) im PAB Modell. Die mechanische Einengung der pulmonalen Ausflussbahn bewirkt die Erhöhung des RVSP. Der RVSP ist in den Gruppen mit einem PAB signifikant gegenüber Sham erhöht. # $p < 0.001$ PAB Placebo versus Sham.

Sham: Scheinoperierte Kontrolltiere	n = 9
PAB Placebo: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 11
PAB Sunitinib: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 11
PAB Sorafenib: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 11

3.3.5 Systemisch-arterieller Blutdruck

Die Messung des systemisch-arteriellen Blutdrucks in der linken Arteria carotis zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen Sham und den PAB Gruppen. Die Gabe von Sunitinib oder Sorafenib veränderte den SAP nicht. Im Mittel Betrag der SAP 152,54 mmHg ($\pm 25,64$) (Abbildung 27).

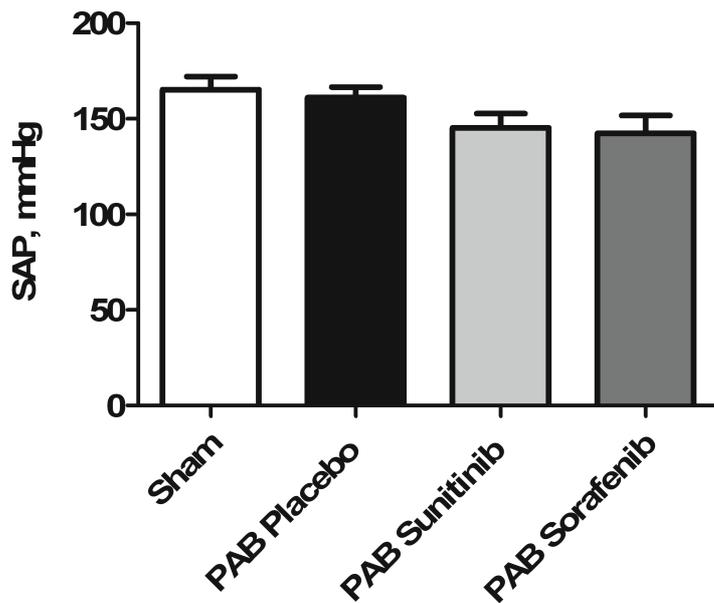


Abbildung 27: Der systemisch-arterielle Blutdruck (SAP) im PAB Modell

Sham: Scheinoperierte Kontrolltiere	n = 9
PAB Placebo: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 11
PAB Sunitinib: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 11
PAB Sorafenib: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 11

3.3.6 mRNA-Expression von Hypertrophiemarkern im rechten Ventrikel

Als molekulare Marker für die rechtsventrikuläre Hypertrophie wurden zum einen die natriuretischen Peptide ANP und BNP bestimmt sowie die Veränderung der kardialen Strukturproteine α MHC und β MHC untersucht. Die Expression der mRNA wurde mit Hilfe von RTq-PCR geprüft. Sowohl die Werte für ANP als auch BNP waren nach 21 Tagen nach PAB und Gabe eines Placebos deutlich erhöht. Sunitinib konnte die Expression von ANP und BNP signifikant senken. Unter der Gabe von Sorafenib sank die ANP und BNP Expression ebenfalls signifikant. Die Strukturproteine α MHC und β MHC verhielten sich bei der rechtsventrikulären Hypertrophie gegensinnig. Es kam zu einer verstärkten Expression von eigentlich fetaler β MHC gegenüber der im gesunden, reifen Herzmuskel vorkommenden α MHC. Dies konnte für die PAB 21 Tage Gruppe gezeigt werden. Gegenüber der als X-Achse normierten Kontrollgruppe war die Expression von β MHC in PAB 21d deutlich erhöht, die von α MHC hingegen gesenkt. Sunitinib und Sorafenib vermochten diese Tendenz umzukehren (Abbildung 28-31).

ANP

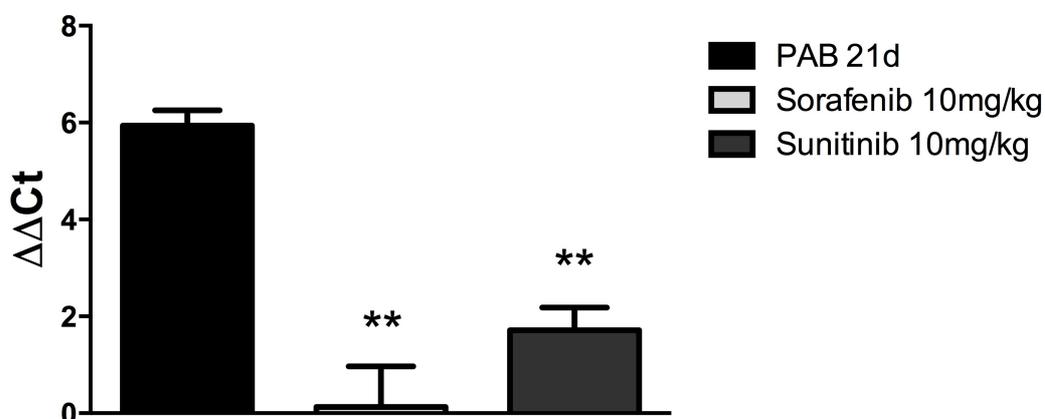


Abbildung 28: mRNA-Expression des atrialen natriurtischen Peptids (ANP) im rechten Ventrikel. ANP ist gegenüber Sham signifikant erhöht. Sowohl Sorafenib als auch Sunitinib senken die Expression signifikant. ** $p < 0.01$ PAB Placebo versus Gruppen. Alle Werte sind als $\Delta\Delta Ct$ angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase.

PAB 21d: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 5
Sorafenib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 5

BNP

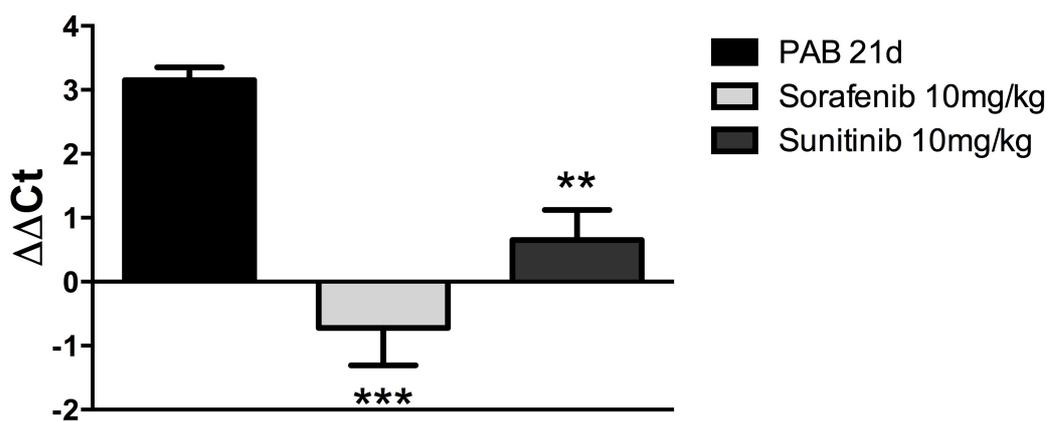


Abbildung 29: mRNA-Expression des Brain-Natriuretic-Peptide (BNP) im rechten Ventrikel. BNP ist gegenüber Sham signifikant erhöht. Sowohl Sorafenib als auch Sunitinib senken die Expression signifikant. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ PAB Placebo versus Gruppen. Alle Werte sind als $\Delta\Delta Ct$ angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase.

PAB 21d: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 5
Sorafenib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 5

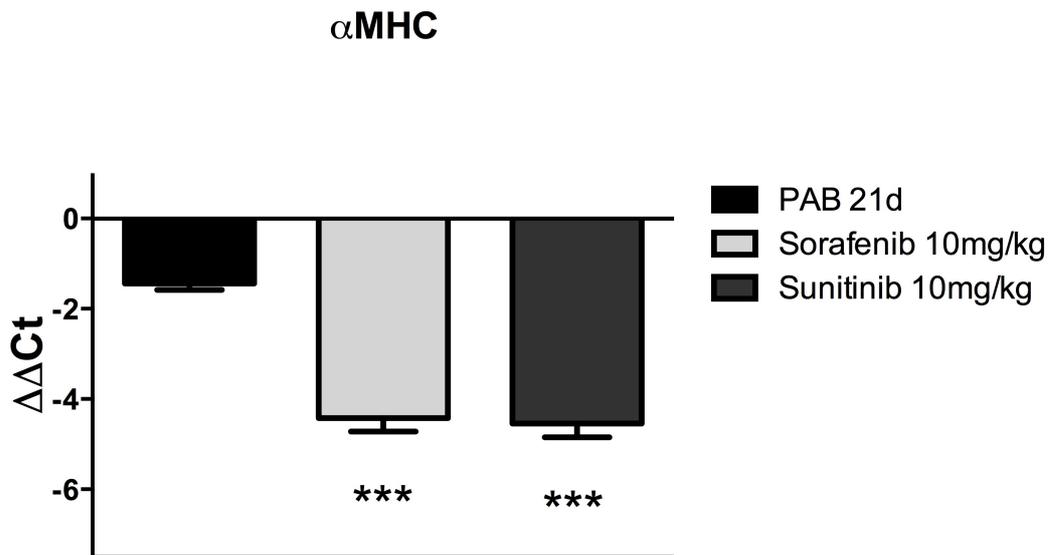


Abbildung 30: mRNA-Expression von α-Myosin-Schwere-Kette (αMHC) im rechten Ventrikel. αMHC ist gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt. Sorafenib und Sunitinib heben die Expression signifikant. *** p<0.001 PAB Placebo versus Gruppen. Alle Werte sind als ΔΔCT angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase.

PAB 21d: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 5
Sorafenib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 5

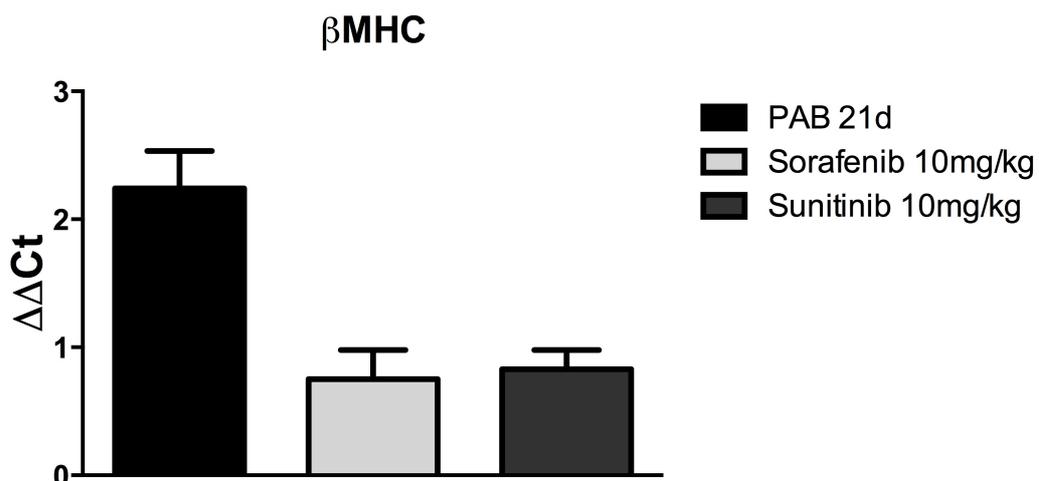


Abbildung 31: mRNA-Expression von β-Myosin-Schwere-Kette (βMHC) im rechten Ventrikel. βMHC ist gegenüber Sham signifikant erhöht. Sorafenib und Sunitinib senken die Expression in der Tendenz. Alle Werte sind als ΔΔCT angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase.

PAB 21d: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 5
Sorafenib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 5

3.3.7 mRNA-Expression von Fibrosemarkern im rechten Ventrikel

Neben der Hypertrophie wurde die Expression von Fibrosemarkern auf der mRNA Ebene durch RTq-PCR überprüft. Als Marker diente die mRNA von Kollagen 3a1, welches ein häufiges Protein in der extrazellulären Matrix von fibrotischen Herzen ist sowie α SMA als Strukturprotein von Fibroblasten. Beide Marker waren in PAB 21d deutlich höher expremiert als in den scheinoperierten Tieren. Kollagen 3a1 fiel unter Sunitinib Gabe signifikant ab sowie bei Gabe von Sorafenib. Bei α SMA konnten sowohl Sunitinib als auch Sorafenib ebenfalls eine deutliche Wirkung zeigen, wobei der Einfluss von Sunitinib stärker war (Abbildung 32 und 33).

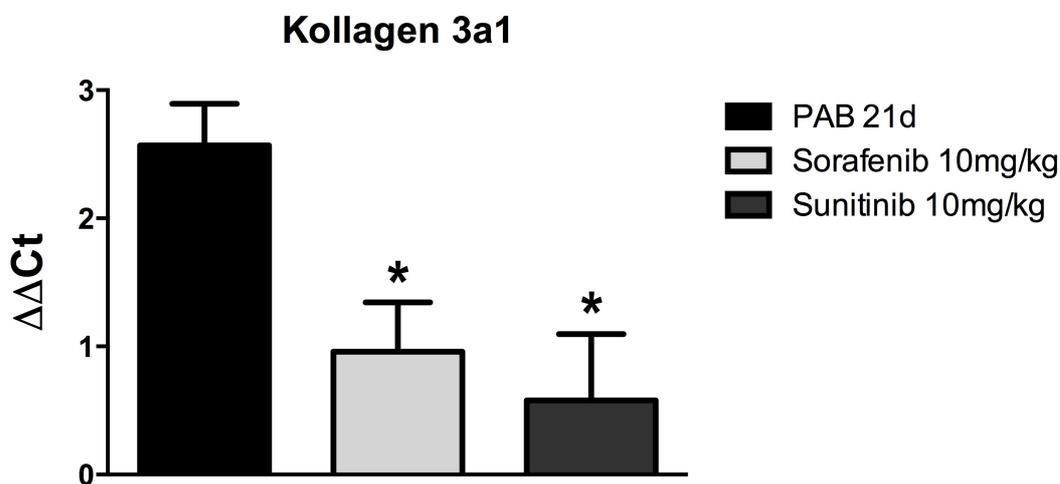


Abbildung 32: mRNA Expression von Kollagen 3a1 im RV. Kollagen 3a1 ist signifikant gegenüber Sham erhöht. Sorafenib und Sunitinib senken die Expression von Kollagen 3a1 signifikant. * $p < 0.05$ PAB Placebo versus Gruppen. Alle Werte sind als $\Delta\Delta Ct$ angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase.

PAB 21d: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 5
Sorafenib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 5

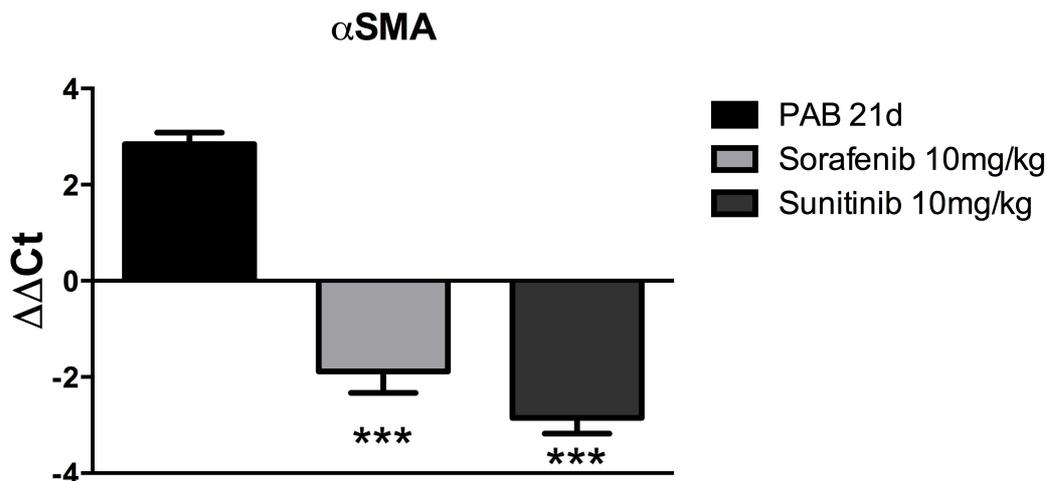


Abbildung 33: mRNA Expression von α -2-Aktin (α SMA) im rechten Ventrikel. α SMA ist in PAB 21d signifikant höher exprimiert als in Sham. Sorafenib senkt die Expression von α SMA signifikant, Sunitinib ebenfalls. *** $p < 0.001$ PAB Placebo versus Gruppen. Alle Werte sind als $\Delta\Delta Ct$ angegeben, ermittelt in RTq-PCR und normalisiert gegen die Porphobilinogen-Desaminase.

PAB 21d: PAB für 7 Tage + 14 Tage Placebo	n = 5
Sorafenib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sorafenib	n = 4
Sunitinib 10 mg/kg: PAB für 7 Tage + 14 Tage 10 mg/kg/d Sunitinib	n = 5

3.4 Antiproliferative Effekte von Sunitinib auf kardiale Fibroblasten

Es wurde der Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf die Proliferationsrate von kardialen Fibroblasten untersucht. Dieser Zelltyp ist im überwiegenden Maße für die Bildung von extrazellulärer Matrix im Herzen verantwortlich und vermittelt so die Fibrose als Teil der strukturellen Veränderungen im RV bei PH. Bei den verwendeten Wachstumsfaktoren handelte es sich um den basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), den Epidermal Growth Factor (EGF), sowie den Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB). Alle vermochten innerhalb von 24 Stunden eine signifikante Erhöhung der Proliferation über das Basalniveau hinaus zu induzieren (Abbildung 34-36). Durch Sunitinib war es möglich, eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation bis auf das Basalniveau zu erreichen. In den mit bFGF durchgeführten Experimenten war die Proliferation ab einer Konzentration von 30 nM im Basalmedium signifikant niedriger (Abbildung 34). Ähnlich verhielt es sich bei der Induktion durch EGF. Auch hier konnte ab einer Konzentration von 30 nM ein signifikanter Abfall in der Proliferation der Fibroblasten beobachtet werden (Abbildung 35). Für die PDGF-BB Versuchsreihen zeigte sich ein noch stärkerer Einfluss von Sunitinib, der bereits bei 10 nM signifikant war (Abbildung 36).

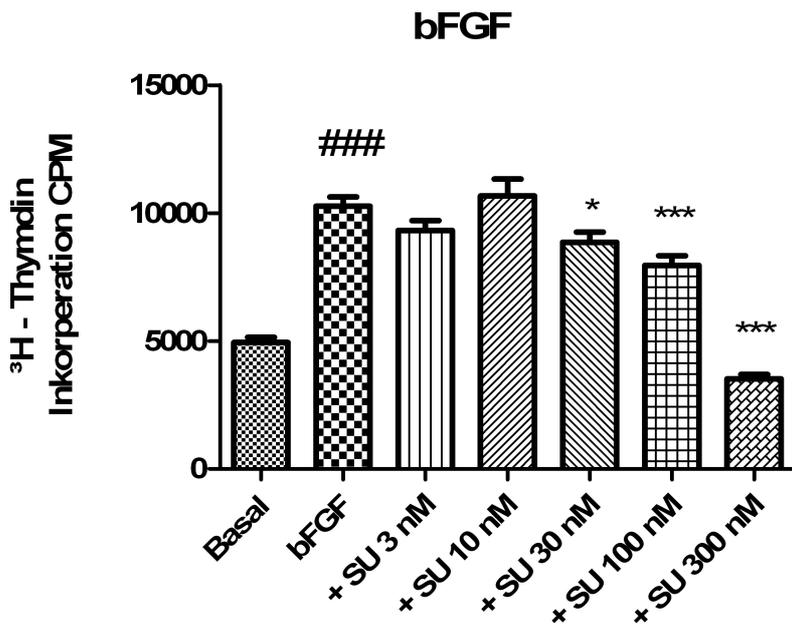


Abbildung 34: Einfluss von Sunitinib auf die bFGF-induzierte Proliferation von kardialen Fibroblasten. bFGF (50 ng/ml) induziert über 24 Stunden die Proliferation von Fibroblasten ### $p < 0,001$ vs. Basal. Diese wird durch Sunitinib dosisabhängig inhibiert. Jeweilige Gruppe vs. bFGF; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. N = 3; 5 Replikate. Alle Werte wurden gepoolt und als Mittelwert \pm SD angegeben

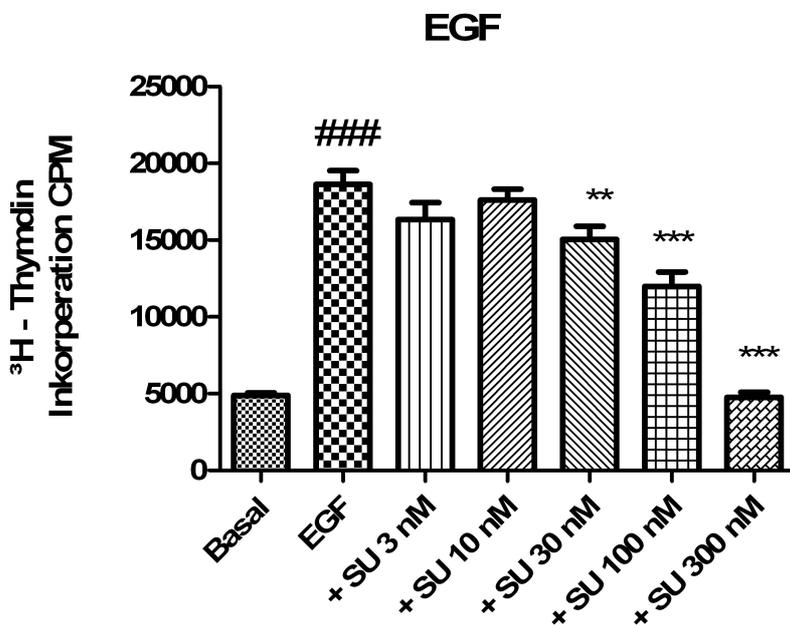


Abbildung 35: Einfluss von Sunitinib auf die EGF-induzierte Proliferation von kardialen Fibroblasten. EGF (50 ng/ml) induziert über 24 Stunden die Proliferation von Fibroblasten ### $p < 0,001$ vs. Basal. Diese wird durch Sunitinib dosisabhängig inhibiert. Jeweilige Gruppe vs. EGF; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. N = 3; 5 Replikate. Alle Werte wurden gepoolt und als Mittelwert \pm SD angegeben

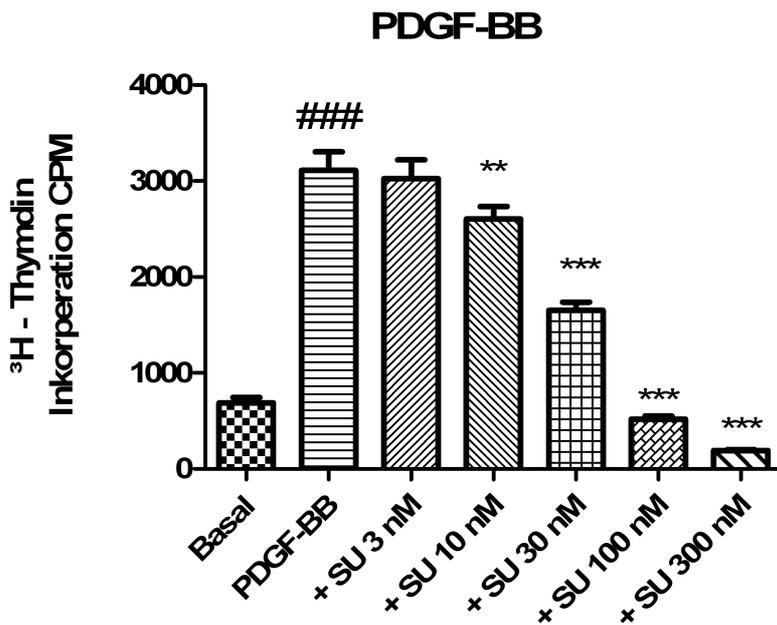


Abbildung 36: Einfluss von Sunitinib auf die PDGF-BB-induzierte Proliferation von kardialen Fibroblasten. PDGF-BB (30 ng/ml) induziert über 24 Stunden die Proliferation von Fibroblasten ### $p < 0,001$ vs. Basal. Diese wird durch Sunitinib dosisabhängig inhibiert. Jeweilige Gruppe vs. PDGF-BB; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. N = 3; 5 Replikate. Alle Werte wurden gepoolt und als Mittelwert \pm SD angegeben.

4 Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war, die Wirkung des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors Sunitinib auf die rechtsventrikuläre Hypertrophie, die bei der pulmonalen Hypertonie auftritt zu untersuchen. Hierfür wurden zwei Tiermodelle verwendet. Zum einen nutzten wir das MCT Modell in der Ratte. Bei diesem handelt es sich um ein inflammatorisches Modell der PH, bei dem die Belastung und Hypertrophie des RV eine Folge der Veränderungen in den Lungengefäßen sind. Zum anderen verwendeten wir – ebenfalls in Ratten - das PAB Modell, bei dem die direkte Reaktion des RV auf eine fixe Druckerhöhung in der rechtsventrikulären Ausflussbahn im Vordergrund steht. Der Kerngedanke hinter der experimentellen Planung war zwischen einer direkten kardialen und einer kombinierten kardialen und pulmonalvasculären Wirkung von Sunitinib unterscheiden zu können. Für den kombinierten Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinase Inhibitor Sorafenib konnte bereits gezeigt werden, dass er die myokardialen Umbauprozesse bei der PH positiv zu beeinflussen vermag, weswegen wir ihn als Referenzsubstanz verwendet haben (Klein et al. 2008; Moreno-Vinasco et al. 2008). Sunitinib und Sorafenib zeigen einige Übereinstimmungen bei den beeinflussten

Rezeptortyrosinkinasen. Bemerkenswert ist allerdings, dass Sunitinib für die diskutierten Zielstrukturen deutlich niedrigere mittlere inhibitorische Werte aufweist als Sorafenib (Mendel et al. 2003; Wilhelm et al. 2004; Kojonazarov et al. 2012).

4.1 Diskussion der Tiermodelle

Das MCT Modell in der Ratte zählt neben dem chronischen Hypoxiemodell zu den klassischen Modellen der PH. Es zeichnet sich durch eine einfache Durchführbarkeit aus. So genügt eine einmalige subkutane, bzw. intraperitoneale Gabe des Pyrrolizidin-Alkaloids Monocrotalin, um eine PH bei Ratten zu induzieren. Dieser initiale Stimulus stößt eine Entzündungsreaktion an, die nach einer bis zwei Wochen zu einer Erhöhung des pulmonalen arteriellen Druckes und zu Umbauprozessen in den Gefäßen führt (Meyrick et al. 1980). Die Substanz selbst wird innerhalb von etwa 24 Stunden über die Niere ausgeschieden, trotzdem findet eine progressive Verschlechterung des Krankheitszustandes statt (Hayashi und Lalich 1967). In der Literatur wurde mehrfach kritisiert, dass eine durch MCT ausgelöste PH in der Ratte durch eine Vielzahl von Stoffen reversibel sei, inklusive durch Agenzien, die eigentlich für die Auslösung einer PH bekannt sind (Stenmark et al. 2009). In diesem Zusammenhang ist allerdings der jeweilige experimentelle Versuchsaufbau zu betrachten. In unserem Fall erhielten die Tiere eine Injektion von 60 mg/kg Körpergewicht. Es ist bekannt, dass Unterschiede in der Ausprägung der PH abhängig von der Monocrotalindosis auftreten. Bei einer Dosis um 30 mg/kg Körpergewicht ist mit dem Auftreten einer kompensierten rechtsventrikulären Hypertrophie zu rechnen, bei einer Steigerung bis 80 mg/kg Körpergewicht mit einem Rechtsherzversagen (Buermans et al. 2005). Die von uns verwendete Dosis ist somit bewusst gewählt worden, um deutlich ausgeprägte Veränderungen im RV untersuchen zu können. Mit der therapeutischen Gabe des Pharmakons bzw. des Placebos wurde am Tag 21 nach der Injektion begonnen, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Tiere bereits eine schwere Form der PH entwickelt hatten. Diese Tatsache lässt sich aus dem klinischen Alltag ableiten, in dem die Therapie der PH ebenfalls erst nach Diagnosestellung in einem manifesten Krankheitsstadium stattfindet. Eine Übertragbarkeit vom Modell auf den Menschen ist allerdings nicht vollständig möglich. So treten einige Charakteristika der PH beim Menschen, wie plexiforme Läsionen in den Lungegefäßen, im MCT Modell nicht auf (Stenmark et al. 2009). Für die Untersuchung des rechten Ventrikels bei PH ist das MCT Modell nichtsdestotrotz sehr gut geeignet, weswegen es in diesem Fall auch eingesetzt wurde. In der Ratte treten rechtsventrikulär systolisch sehr hohe Drücke über 80 mmHg auf,

des Weiteren zeigen sich eine deutliche rechtsventrikuläre Hypertrophie und als Endpunkt in der Krankheitsentwicklung ein *Cor pulmonale* (Meyrick et al. 1980; Jasmin et al. 2001).

Für die Untersuchung des rechten Herzens haben die Tiermodelle, bei denen über Veränderungen in der Lungenstrombahn eine rechtsventrikuläre Hypertrophie induziert wird einen entscheidenden Nachteil. So kann nicht zwischen einem direkten kardialen Effekt und einem sekundären Effekt über eine Nachlastsenkung unterschieden werden. Ein Lösungsansatz ist das von uns verwendete PAB Modell, bei dem die rechtsventrikuläre Ausflussbahn in einem operativen Eingriff mit Hilfe eines Clips eingengt wird (Reid 1924; Tarnavski et al. 2004). Hierdurch wird eine Druckbelastung des RV mit einer daraus resultierenden Hypertrophie wie bei einer PH bewirkt, ohne dass strukturelle Veränderungen in der Lunge notwendig sind. Die rechtsventrikuläre Hypertrophie tritt dabei innerhalb von 96 Stunden auf (Dias et al. 2002). In der Literatur finden sich Quellen, laut derer eine Erhöhung der Nachlast per se nicht genügt um ein rechtsventrikuläres Versagen zu induzieren (Faber et al. 2006; Bogaard et al. 2009b). Bei Bogaard et al. zeigten sich weder echokardiographisch anhand des Herzindex und der RV Dilatation Zeichen einer Dekompensation, noch kam es zu einer Rarefizierung von Kapillaren und einer rechtsventrikulären Fibrose. Sie spekulierten auf eine Interaktion der pathologisch veränderten Lungengefäße über Mediatoren, welche die kardiale Dekompensation ausgehend von einer rechtsventrikulären Hypertrophie vermitteln (Faber et al. 2006; Bogaard et al. 2009b). Unsere Daten zeigen hingegen eine andere Tendenz. In der RTq-PCR fanden sich 21 Tage nach Verengung der Pulmonalarterie Zeichen einer kardialen Fibrose. Ergänzend durchgeführte Echokardiographien zeigten eine Verschlechterung des Herzindex und eine RV Dilatation. Weiterhin bestätigte sich in ergänzenden Daten histologisch die Fibrosierung des Herzgewebes und eine Rarefizierung der Kapillaren konnte nachgewiesen werden (Kojonazarov et al. 2012). Ähnliche Tendenzen zeigten sich ebenfalls bei Schäfer et al. sowie Piao et al. (Schäfer et al. 2009; Piao et al. 2010). Die Ursache für die widersprüchlichen Daten ist unklar, es lässt sich allerdings eine Erklärung über die Form und das Ausmaß der Konstriktion diskutieren. Sowohl Bogaard als auch Faber verwendeten eine 18 Gauge Kanüle (1,2 mm Durchmesser) als Führung, um eine standardisierte Einengung der Pulmonalarterie zu erreichen. Piao und Schäfer verwendeten hingegen eine 16 Gauge Kanüle (1,6 mm Durchmesser). Der von uns verwendete Hämoclip wies eine Weite von 0,9 mm auf und bewirkte somit im

Vergleich die stärkste Konstriktion. Eine Erklärung allein über das Maß der Einengung ist entsprechend der dargelegten technischen Daten aber wohl ungenügend. Eine abschließende Klärung des Sachverhalts kann an dieser Stelle nicht geleistet werden. Weitere Erfahrungswerte und Daten zu diesem - verglichen mit den klassischen Tiermodellen bei der PH – noch jungem Modell scheinen notwendig zu sein.

Im direkten Vergleich muss festgehalten werden, dass die Zeichen der rechtsventrikulären Dysfunktion bzw. des rechtsventrikulären Versagens im MCT Modell insgesamt deutlich ausgeprägter zu sein scheinen, trotz vergleichbarer Werte beim RVSP und rechtsventrikulärer Hypertrophie (Kojonazarov et al. 2012). Theoretisch ist hier neben einem sekundären Effekt über Mediatoren aus den pathologisch veränderten Lungengefäße auch eine direkte Schädigung des Herzmuskels in Form von Entzündung zu diskutieren (Campian et al. 2010).

4.2 Nachweis der Zielstrukturen von Sunitinib im rechten Ventrikel

Wir führten eine Analyse der bekannten Zielstrukturen von Sunitinib in hypertrophierten rechten Herzen durch (Roskoski 2007; Kim et al. 2009). Hierbei zeigten sich in den RTq-PCR Untersuchungen im MCT Modell signifikante Veränderungen für PDGFR α und β sowie den CSF-1R. Die gleichen Zielstrukturen wiesen auch im PAB Modell Veränderungen auf. Für PDGFR β konnte in einem Modell der linksventrikulären Hypertrophie eine hohe Expression nachgewiesen werden (Akiyama et al. 1999). Schermuly et al. postulierten 2005, dass durch PDGF Inhibition nicht nur das Remodeling in den Lungengefäßen, sondern auch das im RV umgekehrt werden kann (Schermuly et al. 2005). Dies veranlasste uns weiterführende Untersuchungen durchzuführen. Im Western Blot konnte bestätigt werden, dass im MCT Modell nach fünf Wochen eine Überexprimierung von PDGFR β gegenüber der Kontrolle vorlag. Weiterhin zeigte sich anhand der Phosphorylierung eine Aktivierung des Rezeptors zu diesem Zeitpunkt. Im PAB Modell konnten wir einen sehr interessanten zeitlichen Verlauf beobachten. So waren PDGFR α und β eine Woche nach PAB signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Nach drei Wochen PAB war hingegen eine Normalisierung des mRNA Niveaus festzustellen. Die ergänzende Analyse im Western Blot bestätigte den Anstieg von PDGFR β nach einer Woche, der gegenüber der „Drei-Wochen-Gruppe“ nahezu konstant blieb. Zwischen MCT und PAB zeigen sich bezüglich PDGFR β somit Unterschiede. Im MCT Modell äußert sich die progressive Verschlechterung des Krankheitszustand in einem konstanten Anstieg der

PDGFR β Expression auf dem mRNA- und Proteinlevel. Die konstante Druckerhöhung im PAB Modell manifestierte sich in einer akuten Steigerung von PDGFR β nach einer Woche. Diese blieb in der drei Wochen Gruppe auf dem Proteinniveau nahezu konstant. Auf dem mRNA Niveau normalisierte es sich hingegen auf das Level der Kontrollgruppe. Die unterschiedlichen Verläufe lassen sich an Hand der unterschiedlichen Druckbelastungsprofile in den beiden Modellen erklären. Interessanterweise konnte in einem Modell der linksventrikulären Hypertrophie in der Maus gezeigt werden, dass es nach Konstriktion der Aorta (TAC) zu einem progressiven Anstieg der PDGFR β Expression kommt. Weiterhin konnte anhand der Phosphorylierung von PDGFR β eine erhöhte Rezeptoraktivität gezeigt werden (Chintalgattu et al. 2010). Diese Abweichungen zwischen PAB und TAC Modell könnten den Unterschieden zwischen rechtem und linken Herzen geschuldet sein. Beachtung finden sollten ebenfalls die Veränderungen des CSF-1R in beiden Tiermodellen. Auch wenn wir den Schwerpunkt nicht auf die Untersuchung dieses Rezeptors gelegt haben, kann eine Wirkung von Sunitinib über ihn nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur finden sich Hinweise für eine Verflechtung von CSF-1R in das kardiale Remodeling (Jia et al. 2009; Szardien et al. 2012). Ebenfalls bemerkt werden sollte, dass sich keine Veränderungen in der Expression von VEGFR auf mRNA Ebene fanden. In den Lungengefäßen spielt das VEGFR System bei der PH eine wichtige Rolle und weist sowohl in den Gefäßen Veränderungen auf (VEGFR-1) wie auch in plexiformen Läsionen (VEGFR-2) (Humbert et al. 2004). Die Rolle des VEGF Systems bei rechtsventrikulären Hypertrophie ist aktuell nicht vollständig verstanden. Es gibt Hinweise darauf, dass es keine direkte Rolle spielen könnte (Dor et al. 2002). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, bei denen sich weder bei MCT noch bei PAB Tieren Veränderungen der VEGFR Expression auf mRNA Niveau zeigten.

4.3 Wirkung von Sunitinib auf die rechtsventrikuläre Hypertrophie

Die zuvor beschriebene deutliche Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Druckes durch den Hämoclip einerseits und die Veränderungen in der Lungenstrombahn durch das Monocrotalin andererseits führten zu einer Adaptation des rechten Herzens mit den entsprechenden, zuvor beschriebenen Veränderungen. Die Erfahrungen mit anderen Multikinaseinhibitoren wie Sorafenib (Klein et al. 2008) und der Nachweis von Sunitinib Zielstrukturen in den RV der Tiere untermauerten die Annahme, dass die rechtsventrikuläre Hypertrophie durch Sunitinib positiv zu beeinflussen sei. In der Tat zeigte sich, dass Sunitinib im MCT Modell die

rechtsventrikuläre Hypertrophie, bestimmt als Verhältnis von RV zu LV und dem Septum, dosisabhängig zu senken vermochte. Der Abfall in der RV Masse gegenüber dem restlichen Herzen ging mit einer Verbesserung der Hämodynamik einher. So konnte mit Sunitinib der rechtsventrikuläre systolische Druck dosisabhängig gesenkt werden. Ein Effekt auf den systemischen Blutdruck zeigte sich hierbei nicht. Im PAB Modell war die Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Druckes durch die mechanische Einengung konstant, ein sekundärer Effekt auf das Herz in Form einer Nachlastsenkung war somit nicht möglich. Die hämodynamischen Parameter blieben nach der Operation konstant, ein Effekt auf den systemischen Blutdruck konnte ausgeschlossen werden. Sunitinib konnte auch im PAB Modell das Verhältnis von RV zu LV und dem Septum signifikant senken, was somit als direkte Wirkung auf das rechte Herz gedeutet werden kann. Auf zellulärer Ebene fanden sich neben klassischen Hypertrophiemarkern im Herzen auch Zeichen der Fibrose, die Teil des Remodeling bei der pulmonalen Hypertonie sind. Auf dem mRNA Niveau zeigten sich Veränderungen bei den natriuretischen Peptiden ANP und BNP, welche in Folge der Herzbelastung hochreguliert waren und durch Sunitinib in beiden Tiermodellen gesenkt werden konnten. Die Expression von Myosin-Schwerer-Kette in Kardiomyozyten wechselte unter Druckbelastung von der α - zu der β -Isoform, was unter der Gabe Sunitinib in der Tendenz umgekehrt werden konnte. In der Dynamik sind diese Beobachtungen als Ausprägung einer Hypertrophie und die Umkehrung dergleichen zu deuten. Die Fibrose des rechten Ventrikels wurde durch die mRNA Expression von Kollagen 3a1 und α -2-Aktin detektiert. Diese war unter der Gabe von Sunitinib ebenfalls deutlich rückläufig. Die makroskopisch erhobenen Befunde bestätigten sich somit auf zellulärer Ebene. Weiterhin konnten wir anhand von Proliferationsassays, die auf dem Einbau [3 H]-Thymidin in die DNS basieren zeigen, dass Sunitinib einen hemmenden Effekt auf kardiale Fibroblasten hat. Die Zellen wurden durch bFGF, EGF und PDGF-BB stimuliert. Sunitinib konnte dosisabhängig die proliferative Aktivität senken. Über eine Hemmung von Rezeptortyrosinkinasen scheint somit eine Verbesserung der kardialen Fibrose erreicht werden zu können. Ergänzende Daten konnten einen Abfall des Kollagengehalts im RV anhand der interstitiellen und perivaskulären Fibrose bestätigen (Kojonazarov et al. 2012). Das experimentelle Setting ermöglichte somit zu zeigen, dass Sunitinib nicht nur einen positiven Einfluss auf die Hämodynamik bei der pulmonalen Hypertonie hat, wie bereits die aktuell eingesetzten Therapeutika, sondern auch darüber hinaus eine isolierte Wirkung auf den rechten Ventrikel aufweist. Gezeigt werden

konnte dies in zwei komplementären Tiermodellen. Die Hypertrophie und Fibrose waren in beiden Fällen deutlich rückläufig.

4.4 Vergleich von Sunitinib und Sorafenib

Klein et al. haben die positive Wirkung des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors Sorafenib auf die rechtsventrikuläre Hypertrophie im Tiermodell gezeigt (Klein et al. 2008). Wir verwendeten Sorafenib als Referenzsubstanz und hypothetisierten auf Basis der niedrigeren mittleren inhibitorischen Werte eine stärkere Wirkung von Sunitinib gegenüber Sorafenib (Mendel et al. 2003; Wilhelm et al. 2004). Tatsächlich zeigten sich eine ähnlich gute Wirksamkeit von Sunitinib und Sorafenib bei einer Konzentration von 10 mg/kg KG. Ergänzende Untersuchungen unterstreichen dieses Ergebnis zusätzlich (Kojonazarov et al. 2012). Ohne ein absolut eindeutiges Ergebnis zu zeigen ist dennoch deutlich, dass Sunitinib eine hohe Potenz im Tiermodell der rechtsventrikulären Hypertrophie besitzt. Interessant ist hierbei, dass Sunitinib diese Wirksamkeit auch ohne eine direkte Beeinflussung des Raf-1 Kinase Signalweg zeigt, der von Klein et. al als Schlüssel für die Beeinflussung des kardialen Remodeling bei Sorafenib gesehen wurde (Klein et al. 2008).

4.5 Potentielle Kardiotoxizität von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren

Es wurde vielfach diskutiert, ob Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren kardiotoxisch seien. Für Imatinib wurde im Tiermodell und in einigen Patienten ein negativer Effekt auf die Herzleistung gezeigt (Kerkelä et al. 2006). Es mag somit zunächst paradox erscheinen, Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren als Therapeutika in einem kardio-pulmonologischen Kontext einsetzen zu wollen. Bei näherer Betrachtung relativieren sich viele der negativen Beobachtungen allerdings. Die präklinischen Daten für Imatinib und die einzelnen Patientenbeobachtungen lassen sich in größeren Patientenkollektiven nicht reproduzieren und scheinen in der klinischen Realität somit keine Rolle zu spielen (Druker et al. 2006; Gambacorti-Passerini et al. 2007). Auch andere Kinaseinhibitoren sind im Gespräch einen negativen Einfluss auf die zelluläre Funktion des Herzens haben zu können, insbesondere auch Sorafenib und Sunitinib (Will et al. 2008; Telli et al. 2008; Khakoo et al. 2008). Weiterhin gibt es aber auch Kinaseinhibitoren bei denen es keinen Anhalt für negative Effekte auf das Herz gibt. Man kann somit nicht von einem, die gesamte Klasse betreffendem Phänomen ausgehen (Force et al. 2007). Wichtig ist sicherlich auch, dass der Großteil der Daten aus der onkologischen Therapie stammt und die pathologischen Veränderungen im rechten Herzen wie bei einer PH dabei eher

nicht vorzufinden sind. Betrachtet man unsere Daten in diesem Kontext, so fällt eine positive Entwicklung der kardialen Funktion unter der Gabe von Kinaseinhibitoren auf. Dies zeigte sich hämodynamisch, morphologisch und auf zellulärer Ebene. Weiterhin kam es nicht zu einer weiteren Rarefizierung der Kapillaren im rechten Ventrikel der PAB Ratten, was bei einem gleichzeitigen Rückgang der myokardialen Hypertrophie für eine verbesserte Durchblutungssituation spricht (Kojonazarov et al. 2012). Ein weiteres Argument, dass gegen eine akute kardiale Toxizität von Sunitinib beim Einsatz in PH Patienten spricht ist, dass die in unseren Tiermodellen bestimmten Sunitinib Plasmaspiegel deutlich niedriger waren als die in onkologischen Tiermodellen (Mendel et al. 2003; Kojonazarov et al. 2012). Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind dadurch weit weniger wahrscheinlich.

4.6 Fazit und klinischer Ausblick

In unserer Studie konnten wir die Expression der relevanten Sunitinib Zielstrukturen bei rechtsventrikulären Hypertrophie zeigen. In zwei komplementären Tiermodellen haben wir gezeigt, dass es unter der Gabe von Sunitinib zu einer Verbesserung der hämodynamischen Situation im Lungenkreislauf kommt, die Hypertrophie im RV sowohl makroskopisch als auch auf zellulärer Ebene rückläufig ist, sowie, dass es zu einer Umkehr der Umbauprozesse im Herzen kommt. Die dosisabhängige Hemmung der Proliferation von kardialen Fibroblasten durch Sunitinib konnten wir zusätzlich *in vitro* an Hand von Proliferationsassays nachweisen. Im Vergleich mit der von uns verwendeten Referenzsubstanz Sorafenib zeigte Sunitinib ähnlich gute Effekte. Die Nutzung der beiden komplementären Tiermodelle MCT und PAB ermöglichte den Nachweis einer direkten Wirkung von Sunitinib auf das rechte Herz. Unsere experimentellen Daten geben deutliche Hinweise auf einen möglichen therapeutischen Nutzen. Die aktuellen vasodilatativen Therapien bei der PH zielen auf eine Symptomverbesserung ab. Mit neuen antiproliferativen Therapien, zu denen auch der Einsatz von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren zählen könnte, besteht potentiell die Möglichkeit die Umbauprozesse in den Lungengefäßen und auch im rechten Herz umzukehren. Gerade dies könnte die Prognose der Patienten langfristig verbessern, da das Rechtsherzversagen bei der PH häufig der limitierende Faktor im Überleben ist. Ob sich die erhobenen Daten nach weiterer Forschung auf molekularer Ebene auch auf den klinischen Alltag übertragen lassen werden bleibt abzuwarten. Sorafenib und Imatinib befinden sich zurzeit bereits in klinischen Studien, Sunitinib aktuell hingegen noch

nicht. Es wird sich noch zeigen, ob Patienten zukünftig von den neuen Therapieansätzen bei der PH profitieren können.

5 Zusammenfassung

Bei der pulmonalen Hypertonie (PH) handelt es sich um eine ätiologisch heterogene Erkrankungsgruppe, die mit einer sehr hohen Mortalität einhergeht. Das Überleben der Patienten liegt unbehandelt bei nur 2,8 Jahren. Die vaskulären Veränderungen bei den meisten Formen der PH sind durch eine Vasokonstriktion gekennzeichnet sowie durch ein abnormes Remodeling, dass sich auf alle Wandschichten der Lungengefäße (Intima, Media und Adventitia) auswirkt. Die Folge hiervon ist eine Abnahme der Gesamtquerschnittsfläche der Lungenstrombahn mit einer konsekutiven Nachlasterrhöhung des rechten Ventrikels. Der limitierende Faktor beim Überleben der Patienten ist häufig das *Cor pulmonale* bzw. das rechtsventrikuläre Versagen. Aktuelle Therapien bewirken nur eine symptomatische Besserung. Vor einigen Jahren wurde ein Paradigmenwechsel angestoßen, der die Gemeinsamkeiten von Neoplasien und dem Remodeling bei der pulmonalen Hypertonie herausstellte. Dieses Erkenntnis ermöglichte es zahlreiche molekulare Signalwege aufzudecken und neue Therapieansätze wie beispielsweise den Einsatz von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren zu entwickeln. Wir haben den Einfluss des Inhibitors Sunitinib, einem etablierten Therapeutikum aus der Onkologie, auf die Umbauprozesse im rechten Herzen untersucht. Sunitinib hemmt die Rezeptoren VEGFR1-VEGFR3, PDGFR α und PDGFR β , KIT, Flt-3 sowie CSF-1R und RET. Als Referenzsubstanz verwendeten wir Sorafenib, für welches bereits eine gute experimentelle Wirksamkeit gezeigt werden konnten. Um eine direkte Wirkung auf das Herz nachweisen zu können, verwendeten wir neben dem klassischen MCT Modell in Ratten das PAB Modell, ebenfalls in Ratten, bei dem die Pulmonalarterie mechanisch mit einem Hämoclip eingeeengt wird. Wir konnten eine Erhöhung der Expression der Sunitinib Zielstrukturen PDGFR α , PDGFR β und CSF-1R auf mRNA Niveau in den rechten Ventrikeln von erkrankten Tieren nachweisen. Eine erhöhte PDGFR β Expression und Aktivität konnte auf der Proteinebene im Western Blot bestätigt werden. Sunitinib konnte *in vivo* einen deutlichen hämodynamischen Effekt zeigen und senkte den RVSP im MCT Modell dosisabhängig. Die rechtsventrikuläre Hypertrophie, ausgedrückt als Verhältnis von rechtem ventrikel zum linken Ventrikel und Septum fiel ebenfalls dosisabhängig bei MCT und bei PAB im Vergleich zu den jeweiligen Placebogruppen. In RTq-PCR Untersuchungen konnten wir zeigen, dass sich unter der Gabe von Sunitinib sowohl Marker der rechtsventrikulären Hypertrophie als auch Marker für die kardiale Fibrose signifikant besserten. Wir konnten dies anhand von

Proliferationsassays weiter verifizieren, in denen Sunitinib dosisabhängig die durch PDGF-BB, EGF und bFGF induzierte Proliferation von kardialen Fibroblasten der Ratte hemmen konnte. Rezeptortyrosinkinasen und Sunitinib im Speziellen könnten ein wichtiges neues Mittel in der Therapie der pulmonalen Hypertonie werden, die trotz vieler neuer Ansätze noch immer eine fatale Erkrankung mit progressivem Verlauf ist. Diesen positiven Ergebnissen folgend werden noch weitere präklinische und klinische Daten notwendig sein um den tatsächlichen Nutzen dieser neuen Medikamente realistisch einschätzen zu können.

6 Summary

Pulmonary hypertension (PH) is a progressive disease of multifactorial etiology, which has a poor prognosis and results in right heart dysfunction. The overall survival of patients without treatment is 2.8 years. The vascular pathology observed in PH is characterized by pulmonary vasoconstriction, but in particular by abnormal vascular remodeling, affecting all vessel layers (intima, media and adventitia). These processes result in severe loss of cross sectional area and a rise of the right ventricular afterload. Survival is often limited by *cor pulmonale* and right heart failure. Few years ago, a cancer paradigm of severe PH was proposed. We investigated the effects of the tyrosine kinase inhibitor Sunitinib on remodeling of the right heart. Sunitinib is an inhibitor of VEGFR1-VEGFR3, PDGFR α and PDGFR β , KIT, Flt-3, as well as CSF-1R and RET. As a positive control we used Sorafenib, as there is already experimental data showing promising effects of this TKI in PH and right heart remodeling. To distinguish between a direct effect on the heart and a secondary effect caused by a reduction of pulmonary vascular resistance, we used two different animal models. In addition to the classical MCT model of PH we also used the PAB model. We demonstrated that PDGFR α , PDGFR β and CSF-1R were higher expressed in the right hearts of placebo treated and sham animals. We could also show an overexpression, as well as an activation of PDGFR β by using Western Blot. Sunitinib showed a dose depending effect on haemodynamics and reduction of the RVSP in the MCT model. The right ventricular hypertrophy, showed as ratio between RV and LV + Septum decreased as compared to MCT- and PAB- placebo treated rats. In both animal models Sunitinib significantly attenuated markers of right heart hypertrophy and cardiac fibrosis. By performing proliferation assays we could further demonstrate that Sunitinib apart from inhibiting fibrosis, dose dependently inhibited rat cardiac fibroblast proliferation induced by PDGF-BB, as well as EGF and bFGF. In summary there is evidence, that TKIs as Sunitinib could be a novel therapeutic for the treatment of pulmonary hypertension. Nevertheless more experimental and clinical data is needed to validate the benefit that these new possible therapies could provide.

7 Abkürzungsverzeichnis

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APAH	Assoziierte pulmonal-arterielle Hypertonie
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCR-ABL	Breakpointclusterregion-Abelson
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNS
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CPM	Counts per minute
CSF-1R	Colony stimulating factor 1 Receptor
CT	cycle threshold
CTEPH	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
d	Tag
DEPC Wasser	Diethyldicarbonat Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler-Wachstums-Faktor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Erk	Extracellular-signal regulated kinasen
ET-1	Endothelin-1
ET-A	Endothelin Rezeptor Typ A
ET-B	Endothelin Rezeptor Typ B
EvG-Färbung	Elastica-van-Gieson Färbung
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fetales Kälberserum

FPAH	Familiäre pulmonal-arterielle Hypertonie
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRP	Meerrettichperoxidase
i.p.	Intraperitoneal
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1
IgG	Immunglobulin G
IPAH	Idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie
KG	Körpergewicht
KIT	Stammzellfaktorrezeptor
LV	Linker Ventrikel
M	Molar
MCT	Monocrotalin
MCTP	Monocrotalinpyrrol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Stichprobenumfang
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PAB	Pulmonary artery banding
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PCH	Pulmonalkapilläre Hämangiomatose

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE-5	Phosphodiesterase-5
PDGF A	Platelet-Derived-Growth-Factor A
PDGF BB	Platelet-Derived-Growth-Factor BB
PDGFR α	Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor α
PDGFR β	Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor β
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PH	Pulmonale Hypertonie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POVD	Peripheral occlusive vascular disease
PVR	Pulmonalvaskulärer Widerstand
RCF	Rat cardiac fibroblasts
RIPA Lysis Puffer	Radioimmunoprecipitationassay Lysis Puffer
ROX	Referenzfarbstoff
RPM	Revolutions per minute
RTq-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
RV	Rechter Ventrikel
RVH	Rechtsventrikuläre Hypertrophie
RVSP	Rechtsventrikulär systolischer Druck
SAP	Systemisch-arterieller Druck
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SU	Sunitinib
SYBR Green	Cyanin Farbstoff
TAC	Transverse aortic constriction
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming growth factor- β
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor

TXA ₂	Thromboxane A ₂
VEGF	Vascular-Endothelial-Growth-Factor
VEGFR1	Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor 1
VEGFR2	Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor 2
VEGFR3	Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor 3
Wk	Woche
αMHC	α-Myosin-Schwere-Kette
αSMA	α-2-Aktin
βMHC	β-Myosin-Schwere-Kette
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pulmonalvaskuläres Remodeling	5
Abbildung 2: Plexiforme Läsion	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Konformationsänderung des rechten Ventrikels	7
Abbildung 4: Molekulare Faktoren bei der PH	8
Abbildung 5: Mechanismus der Wirkung von Rezeptortyrosinkinasen	10
Abbildung 6: Struktur von Sorafenib	15
Abbildung 7: Struktur von Sunitinib	15
Abbildung 8: mRNA Expression von Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor 1-3 (VEGFR 1-3) im rechten Ventrikel von Ratten	33
Abbildung 9: mRNA Expression von KIT, RET und Flt-3 im rechten Ventrikel von Ratten	33
Abbildung 10: mRNA Expression von PDGFR α , PDGFR β und CSF-1R im rechten Ventrikel von Ratten	34
Abbildung 11: Proteinexpression von PDGFR β und p-PDGFR β im rechten Ventrikel	35
Abbildung 12: Verhältnis vom rechten Ventrikel zum linken Ventrikel und Septum	36
Abbildung 13: Veränderung des RVSP durch MCT und die Senkung durch Sorafenib und Sunitinib	37
Abbildung 14: Der systemisch-arterielle Blutdruck im MCT Modell	38
Abbildung 15: mRNA Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) im rechten Ventrikel	39
Abbildung 16: mRNA Expression des Brain-Natriuretic-Peptide (BNP) im rechten Ventrikel	40
Abbildung 17: mRNA Expression von α -Myosin-Schwere-Kette (α MHC) im rechten Ventrikel	41
Abbildung 18: mRNA Expression von β -Myosin-Schwere-Kette (β MHC) im rechten Ventrikel	41
Abbildung 19: mRNA Expression von Kollagen 3a1 im rechten Ventrikel	42
Abbildung 20: mRNA Expression von α -2-Aktin (α SMA) im rechten Ventrikel	43
Abbildung 21: mRNA Expression von Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor 1-3 (VEGFR 1-3) im rechten Ventrikel	44
Abbildung 22: mRNA Expression von KIT, RET und Flt-3 im rechten Ventrikel	44
Abbildung 23: mRNA Expression von PDGFR α , PDGFR β und CSF-1R im rechten Ventrikel	45
Abbildung 24: Proteinexpression von PDGFR β und p-PDGFR β im rechten Ventrikel	46
Abbildung 25: Verhältnis vom rechten Ventrikel zum linken Ventrikel und Septum	47
Abbildung 26: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP) im PAB Modell	48
Abbildung 27: Der systemisch-arterielle Blutdruck im PAB Modell	49
Abbildung 28: mRNA Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) im rechten Ventrikel	50
Abbildung 29: mRNA Expression des Brain-Natriuretic-Peptide (BNP) im rechten Ventrikel	50
Abbildung 30: mRNA Expression von α -Myosin-Schwere-Kette (α MHC) im rechten Ventrikel	51
Abbildung 31: mRNA Expression von β -Myosin-Schwere-Kette (β MHC) im rechten Ventrikel	51
Abbildung 32: mRNA Expression von Kollagen 3a1 im rechten Ventrikel	52
Abbildung 33: mRNA Expression von α -2-Aktin (α SMA) im rechten Ventrikel	53
Abbildung 34: Einfluss von Sunitinib auf die bFGF induzierte Proliferation von kardialen Fibroblasten	54
Abbildung 35: Einfluss von Sunitinib auf die EGF induzierte Proliferation von kardialen Fibroblasten	54
Abbildung 36: Einfluss von Sunitinib auf die PDGF-BB induzierte Proliferation von kardialen Fibroblasten	55

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktionelle Schweregradeinteilung	2
Tabelle 2: Dana Point Klassifikation der PH (2008)	3
Tabelle 3: Übersicht MCT Gruppe	23
Tabelle 4: Übersicht PAB Gruppe	23
Tabelle 5: Ansatz für die cDNA-Synthese	25
Tabelle 6: RTq-PCR Reaktionsansatz	26
Tabelle 7: Ablauf der RT-qPCR Zyklen	26
Tabelle 8: Zusammensetzung des Laufpuffers	27
Tabelle 9: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	28
Tabelle 10: Wachstumsfaktoren	29
Tabelle 11: Inhibitor	30
Tabelle 12: Experimentanordnung Proliferationsassay	30

10 Literaturverzeichnis

- Akiyama, Y.; Ashizawa, N.; Seto, S.; Ohtsuru, A.; Kuroda, H.; Ito, M. et al. (1999): Involvement of receptor-type tyrosine kinase gene families in cardiac hypertrophy. In: *J. Hypertens.* 17 (9), S. 1329–1337.
- Badesch, David B.; McLaughlin, Vallerie V.; Delcroix, Marion; Vizza, Carmine Dario; Olschewski, Horst; Sitbon, Olivier; Barst, Robyn J. (2004): Prostanoid therapy for pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol* 43 (12 Suppl S), S. 56S-61S.
- Barer, G. R.; Cook, C.; Clegg, E. J.; Shaw, J. W. (1970): Pulmonary vascular and cardiac changes in rats and mice exposed to chronic hypoxia. In: *J. Pathol* 101 (4), S. Pi-ii.
- Barst, Robyn J. (2005): PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. In: *J. Clin. Invest* 115 (10), S. 2691–2694.
- Barst, Robyn J.; Gibbs, J. Simon R.; Ghofrani, Hossein A.; Hoeper, Marius M.; McLaughlin, Vallerie V.; Rubin, Lewis J. et al. (2009): Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol* 54 (1 Suppl), S. S78-84.
- Barst, Robyn J.; Langleben, David; Badesch, David; Frost, Adaani; Lawrence, E. Clinton; Shapiro, Shelley et al. (2006): Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-A receptor antagonist sitaxsentan. In: *J. Am. Coll. Cardiol* 47 (10), S. 2049–2056.
- Baudino, Troy A.; Carver, Wayne; Giles, Wayne; Borg, Thomas K. (2006): Cardiac fibroblasts: friend or foe? In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 291 (3), S. H1015-26.
- Bendayan, Daniele; Shitrit, David; Kramer, Mordechai R. (2008): Combination therapy with prostacyclin and tadalafil for severe pulmonary arterial hypertension: a pilot study. In: *Respirology* 13 (6) S. 916–918
- Benza, Raymond L.; Barst, Robyn J.; Galie, Nazzareno; Frost, Adaani; Girgis, Reda E.; Highland, Kristin B. et al. (2008): Sitaxsentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a 1-year, prospective, open-label observation of outcome and survival. In: *Chest* 134 (4), S. 775–782.

Bogaard, Harm J.; Abe, Kohtaro; Vonk Noordegraaf, Anton; Voelkel, Norbert F. (2009a): The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. In: *Chest* 135 (3), S. 794–804.

Bogaard, Harm J.; Natarajan, Ramesh; Henderson, Scott C.; Long, Carlin S.; Kraskauskas, Donatas; Smithson, Lisa et al. (2009b): Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. In: *Circulation* 120 (20), S. 1951–1960.

Budev, Marie M.; Arroliga, Alejandro C.; Wiedemann, Herbert P.; Matthay, Richard A. (2003): Cor pulmonale: an overview. In: *Semin Respir Crit Care Med* 24 (3), S. 233–244.

Buermans, Henk P. J.; Redout, Everaldo M.; Schiel, Anja E.; Musters, René J. P.; Zuidwijk, Marian; Eijk, Paul P. et al. (2005): Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure. In: *Physiol. Genomics* 21 (3), S. 314–323.

Maria E. Campian, Maxim Hardziyenka, , Berthe L.F. van Eck-Smit, Jacques M.T. de Bakker, Hein J. Verberne and Hanno L. Tan: Early inflammatory response during the development of right ventricular heart failure in a rat model. In *Eur J Heart Fail* 12 (7), S. 653-658

Carroll, S. M.; Nimmo, L. E.; Knoepfler, P. S.; White, F. C.; Bloor, C. M. (1995): Gene expression in a swine model of right ventricular hypertrophy: intercellular adhesion molecule, vascular endothelial growth factor and plasminogen activators are upregulated during pressure overload. In: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27 (7), S. 1427–1441.

Cecconi, Maurizio; Johnston, Edward; Rhodes, Andrew (2006): What role does the right side of the heart play in circulation? In: *Crit Care* 10 Suppl 3, S. S5.

Channick, R. N.; Simonneau, G.; Sitbon, O.; Robbins, I. M.; Frost, A.; Tapson, V. F. et al. (2001): Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. In: *Lancet* 358 (9288), S. 1119–1123.

Chazova, I.; Loyd, J. E.; Zhdanov, V. S.; Newman, J. H.; Belenkov, Y.; Meyrick, B. (1995): Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. In: *Am. J. Pathol.* 146 (2), S. 389–397.

Chin, Kelly M.; Kim, Nick H. S.; Rubin, Lewis J. (2005): The right ventricle in pulmonary hypertension. In: *Coron. Artery Dis* 16 (1), S. 13–18.

Chintalgattu, Vishnu; Di Ai; Langley, Robert R.; Zhang, Jianhu; Bankson, James A.; Shih, Tiffany L. et al. (2010): Cardiomyocyte PDGFR-beta signaling is an essential component of the mouse cardiac response to load-induced stress. In: *J. Clin. Invest.* 120 (2), S. 472–484.

Cournand, Ranges (1941): Catheterization of the Right Auricle in Man. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 1941, S. 462–466.

D'Alonzo, G. E.; Barst, R. J.; Ayres, S. M.; Bergofsky, E. H.; Brundage, B. H.; Detre, K. M. et al. (1991): Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. In: *Ann. Intern. Med* 115 (5), S. 343–349.

Dias, Carlos A.; Assad, Renato S.; Caneo, Luiz F.; Abduch, Maria Cristina D.; Aiello, Vera D.; Dias, Altamiro R. et al. (2002): Reversible pulmonary trunk banding. II. An experimental model for rapid pulmonary ventricular hypertrophy. In: *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 124 (5), S. 999–1006.

Dor, Yuval; Djonov, Valentin; Abramovitch, Rinat; Itin, Ahuva; Fishman, Glenn I.; Carmeliet, Peter et al. (2002): Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. In: *EMBO J* 21 (8), S. 1939–1947.

Dorfmüller, P.; Humbert, M.; Capron, F. (2006): Vaskulopathien bei pulmonal-arterieller Hypertonie Update zur pathomorphologischen Beurteilung. In: *Pathologe* 27 (2), S. 140–146.

Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G. M.; Fanning, S. et al. (1996): Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. In: *Nat. Med* 2 (5), S. 561–566.

Druker, Brian J.; Guilhot, François; O'Brien, Stephen G.; Gathmann, Insa; Kantarjian, Hagop; Gattermann, Norbert et al. (2006): Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. In: *N. Engl. J. Med.* 355 (23), S. 2408–2417.

Euler, Liljestrand (1946): Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat. In: *Acta Physiologica Scandinavica* (12), S. 301–320.

Faber, Matthijs J.; Dalinghaus, Michiel; Lankhuizen, Inge M.; Steendijk, Paul; Hop, Wim C.; Schoemaker, Regien G. et al. (2006): Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 291 (4), S. H1580-6.

Fishman, Alfred P. (2004): Primary pulmonary arterial hypertension: a look back. In: *J. Am. Coll. Cardiol* 43 (12 Suppl S), S. 2S-4S.

Force, Thomas; Krause, Daniela S.; van Etten, Richard A. (2007): Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. In: *Nat. Rev. Cancer* 7 (5), S. 332–344.

Fox, Benjamin D.; Shimony, Avi; Langleben, David (2011): Meta-analysis of monotherapy versus combination therapy for pulmonary arterial hypertension. In: *Am. J. Cardiol* 108 (8), S. 1177–1182.

Frey, N.; Olson, E. N. (2003): Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. In: *Annu. Rev. Physiol* 65, S. 45–79.

Galiè, N.; Rubin, Lj; Hoeper, Mm; Jansa, P.; Al-Hiti, H.; Meyer, Gmb et al. (2008a): Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. In: *Lancet* 371 (9630), S. 2093–2100.

Galiè, Nazzareno; Badesch, David; Oudiz, Ronald; Simonneau, Gérald; McGoon, Michael D.; Keogh, Anne M. et al. (2005): Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol* 46 (3), S. 529–535.

Galiè, Nazzareno; Ghofrani, Hossein A.; Torbicki, Adam; Barst, Robyn J.; Rubin, Lewis J.; Badesch, David et al. (2005): Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. In: *N. Engl. J. Med* 353 (20), S. 2148–2157.

Galiè, Nazzareno; Hoeper, Marius M.; Humbert, Marc; Torbicki, Adam; Vachiery, Jean-Luc; Barbera, Joan Albert et al. (2009a): Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). In: *Eur. Heart J* 30 (20), S. 2493–2537.

Galiè, Nazzareno; Manes, Alessandra; Branzi, Angelo (2004): The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. In: *Cardiovasc. Res* 61 (2), S. 227–237.

Galiè, Nazzareno; Manes, Alessandra; Branzi, Angelo (2003): Prostanoids for pulmonary arterial hypertension. In: *Am J Respir Med* 2 (2), S. 123–137.

Galiè, Nazzareno; Manes, Alessandra; Negro, Luca; Palazzini, Massimiliano; Bacchi-Reggiani, Maria Letizia; Branzi, Angelo (2009b): A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. In: *Eur. Heart J* 30 (4), S. 394–403.

Galiè, Nazzareno; Olschewski, Horst; Oudiz, Ronald J.; Torres, Fernando; Frost, Adaani; Ghofrani, Hossein A. et al. (2008b): Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. In: *Circulation* 117 (23), S. 3010–3019.

Gambacorti-Passerini, Carlo; Gambacorti, Carlo; Tornaghi, Lucia; Franceschino, Anna; Piazza, Rocco; Corneo, Gianmarco; Pogliani, Enrico (2007): In reply to 'Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate'. In: *Nat. Med.* 13 (1), S. 13-4; author reply 15-6.

Ghofrani, Hossein A.; Morrell, Nicholas W.; Hoeper, Marius M.; Olschewski, Horst; Peacock, Andrew J.; Barst, Robyn J. et al. (2010): Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 182 (9), S. 1171–1177.

Ghofrani, Hossein A.; Seeger, Werner; Grimminger, Friedrich (2005): Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. In: *N. Engl. J. Med* 353 (13), S. 1412–1413.

Giaid, A.; Saleh, D. (1995): Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. In: *N. Engl. J. Med* 333 (4), S. 214–221.

Giaid, A.; Yanagisawa, M.; Langleben, D.; Michel, R. P.; Levy, R.; Shennib, H. et al. (1993): Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. In: *N. Engl. J. Med* 328 (24), S. 1732–1739.

Goldstein, I.; Lue, T. F.; Padma-Nathan, H.; Rosen, R. C.; Steers, W. D.; Wicker, P. A. (1998): Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. In: *N. Engl. J. Med* 338 (20), S. 1397–1404.

Gomez-Arroyo, Jose G.; Farkas, Laszlo; Alhussaini, Aysar A.; Farkas, Daniela; Kraskauskas, Donatas; Voelkel, Norbert F.; Bogaard, Harm Jan (2011): The Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension In Perspective. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*

Graham, T. P. (1991): Ventricular performance in congenital heart disease. In: *Circulation* 84 (6), S. 2259–2274.

Grimminger, Friedrich; Schermuly, Ralph T.; Ghofrani, Hossein A. (2010): Targeting non-malignant disorders with tyrosine kinase inhibitors. In: *Nat Rev Drug Discov* 9 (12), S. 956–970.

Harris, Ian S.; Zhang, Shaosong; Treskov, Ilya; Kovacs, Attila; Weinheimer, Carla; Muslin, Anthony J. (2004): Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. In: *Circulation* 110 (6), S. 718–723.

Hatano, Strasser (1975): Primary Pulmonary Hypertension: Report on a WHO Meeting, Geneva 15–17 October 1973. In: *Geneva World Health Organization*.

Hayashi, Y.; Lalich, J. J. (1967): Renal and pulmonary alterations induced in rats by a single injection of monocrotaline. In: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124 (2), S. 392–396.

Hayes, C. J.; Gersony, W. M.; Driscoll, D. J.; Keane, J. F.; Kidd, L.; O'Fallon, W. M. et al. (1993): Second natural history study of congenital heart defects. Results of treatment of patients with pulmonary valvar stenosis. In: *Circulation* 87 (2 Suppl), S. I28-37.

Hessel, Marleen H. M.; Steendijk, Paul; den Adel, Brigit; Schutte, Cindy I.; van der Laarse, Arnoud (2006): Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 291 (5), S. H2424-30.

Hoepfer, M. M.; Leuchte, H.; Halank, M.; Wilkens, H.; Meyer, F. J.; Seyfarth, H. J.; Wensel, R.; Ripken, F.; Bremer, H.; Kluge, S.; Hoeffken, G.; Behr, J. (2006): Combining inhaled iloprost with bosentan in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. In: *Eur. Respir. J* 28 (4) S. 691–694

Humbert, M.; Monti, G.; Fartoukh, M.; Magnan, A.; Brenot, F.; Rain, B. et al. (1998): Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. In: *Eur. Respir. J.* 11 (3), S. 554–559.

Humbert, Marc; Morrell, Nicholas W.; Archer, Stephen L.; Stenmark, Kurt R.; MacLean, Margaret R.; Lang, Irene M. et al. (2004): Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (12 Suppl S), S. 13S-24S.

Humbert, M.; Barst, R. J.; Robbins, I. M.; Channick, R. N.; Galiè, N.; Boonstra, A.; Rubin, L. J.; Horn, E. M.; Manes, A.; Simonneau, G. (2004b): Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: BREATHE-2. In: *Eur. Respir. J* 24 (3) S. 353–359

Iemitsu, M.; Miyauchi, T.; Maeda, S.; Sakai, S.; Kobayashi, T.; Fujii, N. et al. (2001): Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 281 (6), S. R2029-36.

Izumiya, Yasuhiro; Shiojima, Ichiro; Sato, Kaori; Sawyer, Douglas B.; Colucci, Wilson S.; Walsh, Kenneth (2006): Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload. In: *Hypertension* 47 (5), S. 887–893.

Izumo, S.; Nadal-Ginard, B.; Mahdavi, V. (1988): Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (2), S. 339–343.

Jasmin, J. F.; Lucas, M.; Cernacek, P.; Dupuis, J. (2001): Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. In: *Circulation* 103 (2), S. 314–318.

Jia, Nan; Dong, Peixin; Huang, Qiuping; Jin, Wei; Zhang, Jianjun; Dai, Qiuyan; Liu, Shaowen (2009): Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in angiotensin II-induced cardiac remodelling. In: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36 (3), S. 262–266.

Kagiyama, Shuntaro; Qian, Keping; Kagiyama, Tomoko; Phillips, M. Ian (2003): Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy. In: *Hypertension* 41 (3 Pt 2), S. 824–829.

Kaiser, Robert A.; Bueno, Orlando F.; Lips, Daniel J.; Doevendans, Pieter A.; Jones, Fred; Kimball, Thomas F.; Molkentin, Jeffery D. (2004): Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. In: *J. Biol. Chem.* 279 (15), S. 15524–15530.

Kay, J. M.; Harris, P.; Heath, D. (1967): Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. In: *Thorax* 22 (2), S. 176–179.

Kerkelä, Risto; Grazette, Luanda; Yacobi, Rinat; Iliescu, Cezar; Patten, Richard; Beahm, Cara et al. (2006): Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. In: *Nat. Med.* 12 (8), S. 908–916.

Khakoo, Aarif Y.; Kassiotis, Christos M.; Tannir, Nizar; Plana, Juan Carlos; Halushka, Marc; Bickford, Courtney et al. (2008): Heart failure associated with sunitinib malate: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor. In: *Cancer* 112 (11), S. 2500–2508.

Kim, AeRang; Balis, Frank M.; Widemann, Brigitte C. (2009): Sorafenib and sunitinib. In: *Oncologist* 14 (8), S. 800–805.

Klein, Martina; Schermuly, Ralph T.; Ellinghaus, Peter; Milting, Hendrik; Riedl, Bernd; Nikolova, Sevdalina et al. (2008): Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial Remodelling. In: *Circulation* 118 (20), S. 2081–2090.

Kojonazarov, Baktybek; Sydykov, Akylbek; Pullamsetti, Soni Savai; Luitel, Himall; Dahal, Bhola K.; Kosanovic, Djuro et al. (2012): Effects of multikinase inhibitors on pressure overload-induced right ventricular Remodelling. In: *Int. J. Cardiol.*

Lee, S. D.; Shroyer, K. R.; Markham, N. E.; Cool, C. D.; Voelkel, N. F.; Tuder, R. M. (1998): Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. In: *J. Clin. Invest* 101 (5), S. 927–934.

Leschke, M.; Wädlich, A. (2007): Rechtsherzinsuffizienz und Cor pulmonale. In: *Internist (Berl)* 48 (9), S. 948–960.

Levick, Scott P.; McLarty, Jennifer L.; Murray, David B.; Freeman, Rebecca M.; Carver, Wayne E.; Brower, Gregory L. (2009): Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart. In: *Hypertension* 53 (6), S. 1041–1047.

Liao, Chien-hui; Akazawa, Hiroshi; Tamagawa, Masaji; Ito, Kaoru; Yasuda, Noritaka; Kudo, Yoko et al. (2010): Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. In: *J. Clin. Invest* 120 (1), S. 242–253.

Manabe, Ichiro; Shindo, Takayuki; Nagai, Ryoza (2002): Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. In: *Circ. Res* 91 (12), S. 1103–1113.

Marin, Talita M.; Clemente, Carolina F. M. Z.; Santos, Aline M.; Picardi, Paty K.; Pascoal, Vinícius D. B.; Lopes-Cendes, Iscia et al. (2008): Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. In: *Circ. Res.* 103 (8), S. 813–824.

Mathai, S. C.; Girgis, R. E.; Fisher, M. R.; Champion, H. C.; Houston-Harris, T.; Zaiman, A.; Hassoun, P. M. (2007): Addition of sildenafil to bosentan monotherapy in pulmonary arterial hypertension. In: *Eur. Respir. J* 29 (3) S. 469–475

McLaughlin, Vallerie V.; Archer, Stephen L.; Badesch, David B.; Barst, Robyn J.; Farber, Harrison W.; Lindner, Jonathan R. et al. (2009): ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest

Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. In: *J. Am. Coll. Cardiol* 53 (17), S. 1573–1619.

Medugorac, I. (1980): Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium. In: *Cardiovasc. Res* 14 (9), S. 551–554.

Mendel, Dirk B.; Laird, A. Douglas; Xin, Xiaohua; Louie, Sharienne G.; Christensen, James G.; Li, Guangmin et al. (2003): In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. In: *Clin. Cancer Res.* 9 (1), S. 327–337.

Meyrick, B.; Clarke, S. W.; Symons, C.; Woodgate, D. J.; Reid, L. (1974): Primary pulmonary hypertension: a case report including electronmicroscopic study. In: *Br J Dis Chest* 68 (1), S. 11–20.

Meyrick, B.; Gamble, W.; Reid, L. (1980): Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. In: *Am. J. Physiol* 239 (5), S. H692-702.

Moncada, S.; Higgs, A. (1993): The L-arginine-nitric oxide pathway. In: *N. Engl. J. Med* 329 (27), S. 2002–2012.

Moreno-Vinasco, Liliana; Gomberg-Maitland, Mardi; Maitland, Michael L.; Desai, AnKIT A.; Singleton, Patrick A.; Sammani, Saad et al. (2008): Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. In: *Physiol. Genomics* 33 (2), S. 278–291.

Pan, L. C.; Lamé, M. W.; Morin, D.; Wilson, D. W.; Segall, H. J. (1991): Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110 (2), S. 336–346.

Paul, Manash K.; Mukhopadhyay, Anup K. (2004): Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer. In: *Int J Med Sci* 1 (2), S. 101–115.

Pawson, T. (1995): Protein modules and signalling networks. In: *Nature* 373 (6515), S. 573–580.

- Pelouch, V.; Dixon, I. M.; Golfman, L.; Beamish, R. E.; Dhalla, N. S. (1993): Role of extracellular matrix proteins in heart function. In: *Mol. Cell. Biochem.* 129 (2), S. 101–120.
- Perros, Frédéric; Montani, David; Dorfmüller, Peter; Durand-Gasselín, Ingrid; Tcherakian, Colas; Le Pavec, Jérôme et al. (2008): Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 178 (1), S. 81–88.
- Piao, Lin; Fang, Yong-Hu; Cadete, Virgilio J. J.; Wietholt, Christian; Urboniene, Dalia; Toth, Peter T. et al. (2010): The inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves impaired cardiac function and electrical Remodelling in two models of right ventricular hypertrophy: resuscitating the hibernating right ventricle. In: *J. Mol. Med* 88 (1), S. 47–60.
- Rabinovitch, Marlene (2008): Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. In: *J. Clin. Invest* 118 (7), S. 2372–2379.
- Reid, M. R. (1924): Partial occlusion of the pulmonary aorta and inferior vena cava with metallic band. Observations on changes in the vessel wall and in the heart. In: *J. Exp. Med* 40 (3), S. 289–291.
- Rich, S.; Kaufmann, E.; Levy, P. S. (1992): The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. In: *N. Engl. J. Med* 327 (2), S. 76–81.
- Robinson, D. R.; Wu, Y. M.; Lin, S. F. (2000): The protein tyrosine kinase family of the human genome. In: *Oncogene* 19 (49), S. 5548–5557.
- Rosenberg, H. C.; Rabinovitch, M. (1988): Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. In: *Am. J. Physiol* 255 (6 Pt 2), S. H1484-91.
- Rosenkranz, S.; Erdmann, E. (2008): Weltkonferenz 2008 in Dana Point: Wichtige Neuerungen auf dem Gebiet der pulmonalen Hypertonie. In: *Dtsch. Med. Wochenschr* 133 Suppl 6, S. S165-6.
- Roskoski, Robert (2007): Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 356 (2), S. 323–328.

Rubin, L. J. (1997): Primary pulmonary hypertension. In: *N. Engl. J. Med.* 336 (2), S. 111–117.

Sandoval, J.; Bauerle, O.; Palomar, A.; Gómez, A.; Martínez-Guerra, M. L.; Beltrán, M.; Guerrero, M. L. (1994): Survival in primary pulmonary hypertension. Validation of a prognostic equation. In: *Circulation* 89 (4), S. 1733–1744.

Schäfer, Stefan; Ellinghaus, Peter; Janssen, Wiebke; Kramer, Frank; Lustig, Klemens; Milting, Hendrik et al. (2009): Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodelling. In: *Cardiovasc. Res* 82 (1), S. 30–39.

Schermlay, Ralph T.; Ghofrani, Hossein A.; Wilkins, Martin R.; Grimminger, Friedrich (2011): Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. In: *Nat Rev Cardiol* 8 (8), S. 443–455.

Schermlay, Ralph T.; Kreisselmeier, Klaus P.; Ghofrani, Hossein A.; Yilmaz, Hüseyin; Butrous, Ghazwan; Ermert, Leander et al. (2004): Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 169 (1), S. 39–45.

Schermlay, Ralph Theo; Dony, Eva; Ghofrani, Hossein Ardeschir; Pullamsetti, Soni; Savai, Rajkumar; Roth, Markus et al. (2005): Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. In: *J. Clin. Invest* 115 (10), S. 2811–2821.

Simonneau, Gérald; Rubin, Lewis J.; Galiè, Nazzareno; Barst, Robyn J.; Fleming, Thomas R.; Frost, Adaani E.; Engel, Peter J.; Kramer, Mordechai R.; Burgess, Gary; Collings, Lorraine; Cossons, Nandini; Sitbon, Olivier; Badesch, David B (2008) Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized trial. In: *Ann. Intern. Med* 149 (8) S. 521–530

Smith, P.; Heath, D.; Yacoub, M.; Madden, B.; Caslin, A.; Gosney, J. (1990): The ultrastructure of plexogenic pulmonary arteriopathy. In: *J. Pathol.* 160 (2), S. 111–121.

Stenmark, Kurt R.; Meyrick, Barbara; Galie, Nazzareno; Mooi, Wolter J.; McMurtry, Ivan F. (2009): Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for

etiologial discovery and pharmacological cure. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 297 (6), S. L1013-32.

Swynghedauw, B. (1999): Molecular mechanisms of myocardial Remodelling. In: *Physiol. Rev* 79 (1), S. 215–262.

Szardien, Sebastian; Nef, Holger M.; Voss, Sandra; Troidl, Christian; Liebetrau, Christoph; Hoffmann, Jędrzej et al. (2012): Regression of cardiac hypertrophy by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated interleukin-1 β synthesis. In: *Eur. Heart J.* 33 (5), S. 595–605.

Tarnavski, Oleg; McMullen, Julie R.; Schinke, Martina; Nie, Qing; Kong, Sekwon; Izumo, Seigo (2004): Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. In: *Physiol. Genomics* 16 (3), S. 349–360.

Telli, M. L.; Witteles, R. M.; Fisher, G. A.; Srinivas, S. (2008): Cardiotoxicity associated with the cancer therapeutic agent sunitinib malate. In: *Ann. Oncol.* 19 (9), S. 1613–1618.

Tomasek, James J.; Gabbiani, Giulio; Hinz, Boris; Chaponnier, Christine; Brown, Robert A. (2002): Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 3 (5), S. 349–363.

Ullrich, A.; Schlessinger, J. (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. In: *Cell* 61 (2), S. 203–212.

Voelkel, Norbert F.; Quaife, Robert A.; Leinwand, Leslie A.; Barst, Robyn J.; McGoon, Michael D.; Meldrum, Daniel R. et al. (2006a): Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. In: *Circulation* 114 (17), S. 1883–1891.

Voelkel, Norbert F.; Vandivier, R. William; Tuder, Rubin M. (2006b): Vascular endothelial growth factor in the lung. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290 (2), S. L209-21.

Voelkel, N. F.; Cool, C.; Lee, S. D.; Wright, L.; Geraci, M. W.; Tuder, R. M. (1998): Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. In: *Chest* 114 (3) S. 225S-230S.

Wilhelm, Scott M.; Carter, Christopher; Tang, Liya; Wilkie, Dean; McNabola, Angela; Rong, Hong et al. (2004): BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. In: *Cancer Res.* 64 (19), S. 7099–7109.

Will, Yvonne; Dykens, James A.; Nadanaciva, Sashi; Hirakawa, Brad; Jamieson, Joseph; Marroquin, Lisa D. et al. (2008): Effect of the multitargeted tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, sunitinib, and sorafenib on mitochondrial function in isolated rat heart mitochondria and H9c2 cells. In: *Toxicol. Sci* 106 (1), S. 153–161.

Wilson, D. W.; Segall, H. J.; Pan, L. C.; Dunston, S. K. (1989): Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. In: *Microvasc. Res* 38 (1), S. 57–80.

11 Publikationsverzeichnis

Reverse-Remodelling Eigenschaften des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors Sunitinib bei der experimentellen pulmonalen Hypertonie

M. Majewski, B. Kojonazarov, S. Pullamsetti, A. Sydykov, H. Luitel, D. Kosanovic, X. Tian, C. Baumann, S. Evans, D. Fairman, I. Kilty, P. Philips, M. Yeadon, C. Cassino, F. Grimminger, N. Weissmann, W. Seeger, A. Ghofrani, R. Schermuly

(Posterpräsentation Kongress der DGIM, Wiesbaden 2011; Posterpreisträger im Bereich Pneumologie)

Der Einfluss von Tyrosinkinaseinhibitoren auf den Umbau des rechten Herzens im tierexperimentellen Modell

M. Majewski, B. Kojonazarov, S. Pullamsetti, A. Sydykov, H. Luitel, D. Kosanovic, X. Tian, C. Baumann, S. Evans, D. Fairman, I. Kilty, P. Philips, M. Yeadon, C. Cassino, F. Grimminger, N. Weissmann, W. Seeger, A. Ghofrani, R. Schermuly

Clin Res Cardiol 100, Suppl 1, April 2011 (Posterpräsentation 77. Jahrestagung der DGK, Mannheim 2011)

Effects of multikinase inhibitors on pressure overload-induced right ventricular Remodelling

B. Kojonazarov, A. Sydykov, S. Pullamsetti, H.Luitel, B.Dahal, D. Kosanovic, X. Tian, M. Majewski, C. Baumann, S. Evans, P. Phillips, D. Fairman, N. Davie, C. Wayman, I. Kilty, N. Weissmann, F. Grimminger, W. Seeger, A. Ghofrani, R. Schermuly

Int. J. Cardiol. 30 Juli 2012

12 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

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an Prof. Dr. Ralph T. Schermuly für die Überlassung dieses Dissertationsthemas aussprechen. Durch seine freundliche und unkomplizierte Art hat er mir stets das Gefühl gegeben ansprechbar und für Fragen in Griffweite zu sein. Ich habe es sehr genossen meine Arbeit in einem professionellen und gleichzeitig auf persönlicher Ebene so angenehmen Umfeld wie dem „Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System“ anfertigen zu dürfen.

An meine direkte Betreuerin Dr. Soni Savai Pullamsetti geht mein Dank dafür, dass sie trotz schwieriger Umstände kontinuierlich für mich da war und immer Verständnis dafür hatte, wenn meine Experimente um meinen Studienalltag herum geplant werden mussten.

Mein herzlicher Dank geht selbstverständlich auch an die gesamte Arbeitsgruppe, die mir stets zur Seite gestanden hat, mich quasi von Null an eingearbeitet und in die wundervolle Welt der Molekularbiologie eingeführt hat.

Das ein oder andere exotische Mittagessen hat sicherlich auch dazu beigetragen die Moral hoch zu halten. Vielen Dank an Damian, Hamza, Joachim, Kathi, Pavan, Piotr, Xia und alle die ich nicht namentlich erwähnt habe!

Dr. Baktybek Kojonazarov möchte ich dafür danken, dass er mich bei der Erstellung meiner Posterpräsentationen mit Rat und Tat unterstützt hat.

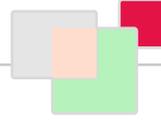
Vielen Dank an Alex und Gilbert für das Korrekturlesen, das bei meiner Grammatik und Orthographie sicher alles andere als ein Hochgenuss war.

An meine Freundin Vanessa meinen herzlichsten Dank. Ihr durfte ich nicht nur die Ohren wegen meiner Dissertation volljammern, sondern generell und immer und auch zu jeder Tages- und Nachtzeit. Ich bin sehr froh dich an meiner Seite zu haben!

Meine Eltern haben mich zu der Person gemacht die ich jetzt bin, ich danke euch für eure permanente Unterstützung. Ich könnte mir keine besseren Eltern als euch wünschen!

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6092-3



9 783835 960923