

Aus dem
Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim
am Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig Universität Gießen

**Zirkulierende Fibrozyten in der Pathogenese und Therapie
von Pulmonaler Hypertonie-Rolle von
Rezeptortyrosinkinasen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig Universität

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Kirsten Szelepusa

aus
Lutherstadt Wittenberg

Gießen 2010

Erstzunehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.

Thorstein Bunde Veblen, (1857 - 1929), US-amerikanischer Volkswirtschaftler und Soziologe

Dekan: Prof. Dr. Volkmar Wolters

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Clauss
Institut für Tierphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Werner Seeger
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Bedeutung der pulmonalen Hypertonie (PH)	5
1.2	Einführung in die Systematik der pulmonalen Hypertonie.....	7
1.3	Therapeutische Ansätze für die Behandlung von Patienten mit PAH	8
1.3.1	Vasodilatoren in der Behandlung der PAH	8
1.3.2	Antiproliferative Therapieansätze bei der PAH	10
1.4	Tiermodelle für die Untersuchung von pulmonaler Hypertonie	12
1.5	Rezeptortyrosinkinasen in der pulmonalen Hypertonie und die Bedeutung von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren	14
1.6	Kurzüberblick über die Eigenschaften zirkulierender Fibrozyten (ZFs)	16
1.7	Funktion von zirkulierenden Fibrozyten bei Wundheilung und anderen Erkrankungen	18
1.8	Beteiligung von zirkulierenden Fibrozyten am pulmonalen Remodeling.....	20
2	Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
3	Material und Methoden.....	24
3.1	Material	24
3.1.1	Chemikalien	24
3.1.2	Seren, Antibiotika und Medien für Zellkultur	25
3.1.3	Substanzen für die histologische Färbung	25
3.1.4	PCR-Reagenzien.....	26
3.1.5	Sonstige Substanzen und Puffer.....	26
3.1.6	Material für Tierexperimente	27
3.1.7	Kits.....	27
3.1.8	Geräte und spezielle Materialien	27
3.1.9	Sonstige Materialien	29
3.2	Methoden.....	29
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	29
3.2.1.1	Aufreinigung von Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellen	29
3.2.1.2	Aufreinigung von RNA aus Lungengewebe.....	29
3.2.1.3	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	30

3.2.1.4	PCR	30
3.2.1.5	Real-time-PCR (quantitative PCR).....	31
3.2.1.6	Gelelektrophorese	32
3.2.2	Zellkultur.....	32
3.2.2.1	Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC).....	32
3.2.2.2	Isolation zirkulierender Fibrozyten durch magnetische Aufreinigung	33
3.2.2.3	Kultivierung pulmonal-arterieller glatter Muskelzellen (PASMC)	35
3.2.2.4	Kultivierung von Fibroblasten	36
3.2.2.5	Herstellung von konditioniertem Medium	36
3.2.2.6	³ [H]Thymidin-Proliferationsassay	36
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	37
3.2.3.1	Probenherstellung und quantitative Proteinkonzentrations-bestimmung	37
	Proteinaufreinigung aus Zellen	37
	Proteinaufreinigung aus Gewebe.....	37
	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry.....	37
3.2.3.2	SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)...	38
3.2.3.3	Proteintransfer und Antikörper-Inkubation	38
3.2.3.4	Quantifizierung des Proteingehalts	38
3.2.3.5	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	39
3.2.4	Immunfluoreszenzfärbung.....	39
3.2.4.1	Färbung von Zellen.....	39
3.2.4.2	Vorbereitung des Lungengewebes für Immunhistochemische bzw. Immunfluoreszenzfärbungen	40
3.2.4.3	Färbung von Lungengewebe.....	40
3.2.4.4	Quantifizierung von Prokollagen 1a1 / GFP (Green fluorescent Protein)-positiven Zellen (zirkulierende Fibrozyten) im Lungengewebe	41
3.2.5	Stereologische Aufbereitung des Mauslungengewebes.....	41
3.2.5.1	Histologische Färbung.....	42
3.2.6	Stereologische Vermessung des Muskularisierungsgrades in Mauslungen	44
3.2.7	Mikroskopie.....	44
3.2.8	Tierversuchsmodell	45
3.2.8.1	Versuchstiere und Tierhaltung.....	45

3.2.8.2	Knochenmarktransplantation bei der Maus.....	46
3.2.8.3	Hypoxie-Modell.....	47
3.2.8.4	Hämodynamische Messung.....	48
3.2.8.5	Lungen- / Herzentnahme und Probenvorbereitung für histologische Färbung	49
3.2.8.6	Bestimmung des Verhältnisses zwischen dem rechten Ventrikel und linkem Ventrikel + Septum (RV/LV+S) als Maßstab für die Rechtsherzhypertrophie	50
3.2.8.7	Statistik.....	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Immunologische Charakterisierung von zirkulierenden Fibrozyten von Mensch ...	51
4.2	Molekulare Charakterisierung humaner zirkulierender Fibrozyten	54
4.3	Stereologische Quantifizierung der Gefäßmuskularisierung bei hypoxischen Mäusen.....	58
4.4	Identifizierung und Lokalisierung von zirkulierenden Fibrozyten in vivo	60
4.5	Hämodynamische Messung in präventiv behandelten Hypoxietieren.....	62
4.6	Quantifizierung von PH-relevanten Rezeptoren in vivo	64
5	Diskussion.....	69
5.1	Zirkulierende Fibrozyten – mesenchymale und hämatopoetische Vorläuferzellen	69
5.1.1	Fortführende Charakterisierung von humanen zirkulierenden Fibrozyten	72
5.2	Diskussion des Tiermodells	74
5.3	Effekte von Imatinib auf die Gefäßmuskularisierung und Rechtsherzhypertrophie im Hypoxie-induzierten PH Modell in Mäusen	75
5.4	Einfluss des Rezeptortyrosinkinaseinhibitors Imatinib auf die Rekrutierung von zirkulierenden Fibrozyten im Hypoxie-Modell.....	78
5.5	Sekretiertes PDGF von Fibrozyten als Stimulus für das Remodeling.....	79
5.6	Ausblick.....	81
	Zusammenfassung.....	83
	Summary	85
	Abkürzungsverzeichnis.....	86
	Abbildungsverzeichnis.....	90
	Tabellenverzeichnis.....	92
	Literaturverzeichnis.....	93

Danksagung	103
Erklärung	105

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der pulmonalen Hypertonie (PH)

Die pulmonale Hypertonie definiert sich über den zunehmenden Anstieg des Gefäßwiderstandes und den damit verbundenen Blutdruckanstieg im Lungenkreislauf. Resultierend aus dem Krankheitsverlauf entwickelt sich eine Rechtsherzinsuffizienz, d.h. eine Funktionsstörung des Herzens, welche auf den ansteigenden Druck im Lungenkreislauf zurückzuführen ist. Die rechte Herzkammer ist durch den erhöhten Druck in der Lunge einem erhöhten Widerstand ausgesetzt. Gegen diesen Widerstand pumpt es das Blut in die Lunge. Infolgedessen kommt es zu einer Verdickung der Herzwand und einem Rückstau des Blutes in den Körper. Bei progredienter Rechtsherzinsuffizienz kommt es zu Ödembildungen im Körper, wie z. B. Aszites, Pleuraerguß oder peripheren Ödemen. Die Patienten sind in ihrer körperlichen Leistungsfähigkeit stark eingeschränkt. Begleiterscheinungen sind Kreislaufstörungen und Müdigkeit. Zudem führt die PH zu einer stark verringerten mittleren Lebenserwartung, welche ohne spezifische Therapie ab Diagnosezeitpunkt ca. 2 Jahre betrug. Erstmals wurde die PH 1891 durch Ernst von Romberg beschrieben. Die pulmonale Hypertonie ist definiert durch einen mittleren pulmonalarteriellen Druck (mPAP) von > 25 mmHg in Ruhe (Sastry 2006; Galie, Hoeper et al. 2009).

Das Gefäßsystem der Lunge ist ein Niederdrucksystem und unterscheidet sich somit vom systemischen Kreislaufsystem des Körpers (W. Seeger und Schäfers 2001). Zur Regulation des Vasotonus ist ein Zusammenspiel von vasodilatativen und -konstriktiven Mediatoren notwendig. Zu den endogenen Vasodilatoren zählen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI_2), diese diffundieren durch das Endothel in die angrenzenden Muskelzellen der Gefäßwände und sorgen somit für die Aktivierung von Guanylat- bzw. Adenylatzyklen. Durch die gebildeten „second messenger“ zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) kommt es zu einer Relaxation der Gefäße (Abbildung 1). Im Gegensatz hierzu führt eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels zur Myozytenkontraktion. Kalzium kann aufgrund einer Membrandepolarisierung aus dem extrazellulären Raum in die Zellen strömen oder intrazellulär durch das endoplasmatische Retikulum freigesetzt werden. Vasokonstriktive Mediatoren stellen hierbei Thromboxan A_2 , Angiotensin II oder Endothelin 1 dar.

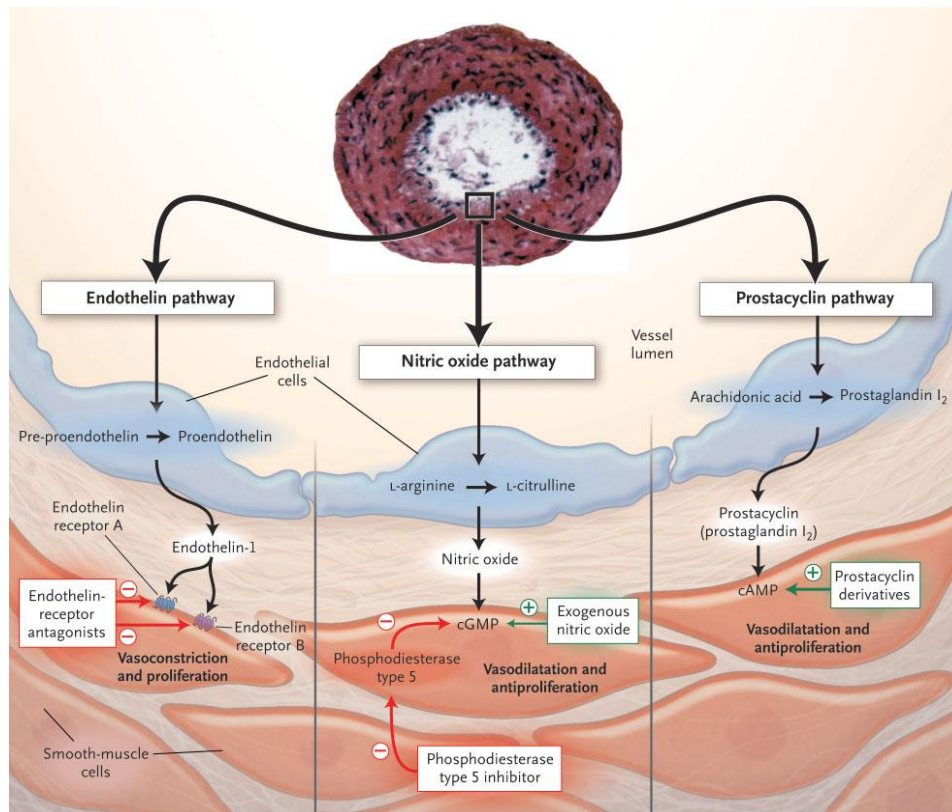


Abbildung 1: Molekulare Mechanismen der Pathogenese der pulmonal-arteriellen Hypertonie und daraus abgeleitete therapeutische Angriffspunkte (Humbert, Sitbon et al. 2004).

Während der PH kommt es zu pathomorphologischen Veränderungen der Gefäße, dem sogenannten vaskulären Remodeling (W. Seeger und Schäfers 2001). Bei der chronischen pulmonalen Hypertonie werden die zentralen größeren Gefäße durch den hohen Druck auf geweitet. Im Gegensatz hierzu kommt es zu Umbauprozessen der kleineren Gefäße, die zu einer Gefäßverengung und Lumenreduzierung führen. Dieses Remodeling ist vor allem durch drei wesentliche Vorgänge charakterisiert, die Fibrosierung der Intima, die Hypertrophie und Fibrose der Adventitia und die Hypertrophie der Media bzw. de-novo-Muskularisierung, welche zur Muskularisierung von nur teilweise bzw. nicht-muskularisierten Gefäßen (Abbildung 2) führt (W. Seeger und Schäfers 2001; Rabinovitch 2008). Innerhalb der Endothelschicht finden biochemische Veränderungen der Glykokalyxschicht, Endothelzellproliferation und Formation von plexiformen Läsionen statt. Außerdem kommt es zur Proliferation von glatten Muskelzellen in der Media sowie der Fibroblasten in der Adventitia. Dieser Prozess ist mit einer erhöhten Kollagenproduktion (vor allem Kollagen I und III) verbunden. In der Media wandern Myozyten nach distal sowie in die Intima ein, dies wird durch die zum Teil fragmentierte Lamina elastica interna ermöglicht. Innerhalb der Intima kommt es außerdem zur Proliferation von Fibroblasten.

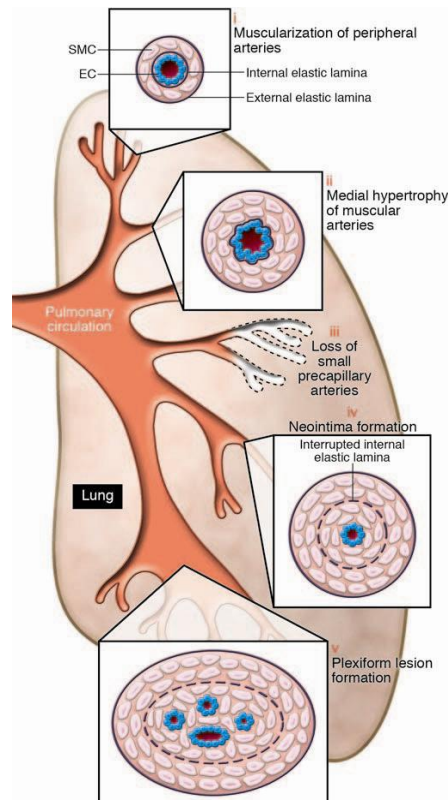


Abbildung 2: Pathobiologie der pulmonalen Hypertonie.

(i) Abnormale Muskularisierung der präkapillären Arterien, (ii) Mediahypertrophie der großen muskularisierten Pulmonalarterien, (iii) Verlust der präkapillären Arterien, (iv) Formierung einer Neointima und die Entstehung plexiformer Läsionen (Rabinovitch 2008).

1.2 Einführung in die Systematik der pulmonalen Hypertonie

Die Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (PH) wurde im Jahr 2008 auf der vierten Weltkonferenz für PH in Dana Point aktualisiert, wobei die Gruppe der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) weiterhin von 4 weiteren Gruppen der PH abgegrenzt wurde (Simonneau, Robbins et al. 2009).

I. Pulmonal-arterielle Hypertonie:

- Idiopathische PAH (IPAH)
- Familiäre PAH
- Medikamenten- bzw. Giftstoff-induziert
- Assoziiert mit (APAH) verschiedenen anderen Erkrankungen (Kollagenosen, Vaskulitiden, Infektionen (HIV, Hepatitis, Schistosomiasis), Schilddrüsenerkrankungen, Glykogenspeicherkrankheiten))
- Assoziiert mit angeborenen Herzfehlern
- Persistierende PH der Neugeborenen

- II. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankung (pulmonalvenöse Hypertonie)
- III. Pulmonale Hypertonie assoziiert mit Hypoxie (COPD, Interstitielle Lungenkrankheit, Schlafapnoesyndrom, Höhenbewohner und Pulmonale Entwicklungsstörungen)
- IV. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer thrombotischer und/oder embolischer Erkrankungen (Thromboembolie der proximalen Lungenarterien, Obstruktion der distalen Lungenarterien, Lungenembolie)
- V. Sonstige (Sarkoidose, Histiozytosis X, Lymphangioliomyomatose, Gefäßkompression von außen durch z. B. Lymphknoten, Tumor, fibrosierende Mediastinitis)

1.3 Therapeutische Ansätze für die Behandlung von Patienten mit PAH

Die mittlere Lebenserwartung für Patienten mit PAH lag bei 2,8 Jahren, bevor effektive Therapien entwickelt wurden (D'Alonzo, Barst et al. 1991). Während der letzten 20 Jahre gab es zahlreiche Fortschritte in der Entwicklung von neuen Therapiemöglichkeiten, die es erlauben, das Krankheitsbild und die Beschwerden von PAH-Patienten erheblich zu verbessern. Das wichtigste Ziel der Therapie ist die Vermeidung einer Rechtsherzinsuffizienz, da diese zu einer signifikanten Senkung der Lebenserwartung führt. Bei der Behandlung von PAH-Patienten können zwei Therapiezweige unterscheiden werden.

Der erste Behandlungszweig ist die vasoaktive Therapie mit Vasodilatoren, hierbei sind potentiell reversible Komponenten der Gefäßobstruktion ein Zielpunkt (W. Seeger und Schäfers 2001). Der zweite Behandlungszweig stellt die antiproliferative Therapie dar, die das vaskuläre Remodeling beeinflusst und somit kausal die strukturellen Gefäßveränderungen adressiert. Durch die Gabe von Vasodilatoren bzw. anti-inflammatorischen und anti-proliferativen Medikamenten kann der erhöhte Vasotonus gesenkt und das vaskuläre Remodeling beeinflusst werden.

1.3.1 Vasodilatoren in der Behandlung der PAH

Ein Therapieansatz für die Behandlung des erhöhten Vasotonus stellen die Kalziumantagonisten dar. Diese Gruppe von Medikamenten senkt den intrazellulären Kalziumspiegel in Myozyten des pulmonalvaskulären Systems (W. Seeger und Schäfers 2001). Die pulmonale Vasokonstriktion nimmt somit ab und führt in Langzeittherapien zur Erhöhung der Lebenserwartung in 5-10 % der Patienten (Rich, Kaufmann et al. 1992; Sitbon, Humbert et al. 1998). Die Auswahl der geeigneten Patienten erfolgt durch eine akute Vasoreagibilitätstestung während einer Rechtsherzkatheteruntersuchung. Ein Abfall des pulmonal-arteriellen Mitteldruckes um mindestens 10 mmHg auf unter 40 mmHg bei

normalisiertem Herzzeitvolumen ist das Kriterium für eine hochdosierte Kalziumantagonisten Therapie. Bei ungeeigneten Patienten kann es aufgrund der negativ inotropen und chronotropen Wirkungen während der Behandlung mit Kalziumantagonisten zu einer lebensbedrohlichen hämodynamischen Gefährdung der Patienten kommen, daher dürfen diese Medikamente nicht ohne vorhergehende Vasoreagibilitätstestung eingesetzt werden (Sitbon, Humbert et al. 1998). Falls diese Therapie nicht geeignet ist, werden andere Vasodilatoren wie Prostazyklinderivate, Endothelinrezeptor-Antagonisten oder Phosphodiesterase-5 Inhibitoren eingesetzt (Humbert, Sitbon et al. 2004).

Prostazykline induzieren durch die Stimulation der Produktion von cAMP in glatten Muskelzellen Relaxation. Außerdem führen sie zur Wachstumsinhibition von Muskelzellen (Clapp, Finney et al. 2002). Für die Therapie sind Prostaglandin I₂ (Epoprostenol) sowie die stabileren Derivate Iloprost und Treprostinil zugelassen. Diese aktivieren membranständige EP und IP Prostanoidrezeptoren der Zelle und erhöhen konsekutiv die intrazelluläre cAMP Konzentration (Sastry 2006).

Die inhalative Behandlung mit Stickstoffmonoxid (NO) stellt ebenso einen therapeutischen Ansatz dar. Bei PAH-Patienten liegt ein Defekt in der NO-Produktion vor (Humbert, Sitbon et al. 2004). NO wird hauptsächlich im Endothel gebildet und gilt ebenso wie Prostazykline als potenter Vasodilator. Es führt zur direkten Relaxation der glatten Muskelzellen, indem es zur Stimulation der löslichen Guanylatzyklase und Anstieg von intrazellulären cGMP führt (Humbert, Sitbon et al. 2004). Ebenso hemmt es *in vitro* die Proliferation glatter Muskelzellen und die Aggregation von Thrombozyten (W. Seeger und Schäfers 2001). NO Inhalation ist jedoch der Akut-/Intensivmedizin vorbehalten, da die ambulante Versorgung mit NO Gas aus technischen Gründen derzeit nicht möglich ist.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, selektiv die pulmonale Vasokonstriktion mittels Endothelin-Rezeptorantagonisten zu inhibieren. Zu ihnen gehört der duale Endothelin A (ET_A) und Endothelin B (ET_B) Rezeptorantagonist Bosentan, welcher die Leistungsfähigkeit und Prognose der PAH-Patienten verbessert (Channick, Simonneau et al. 2001; Rubin, Badesch et al. 2002; Iqbal, Sanghia et al. 2005). Die Expression von Endothelin 1 ist in PAH-Lungen erhöht (Giaid, Yanagisawa et al. 1993), verursacht Entzündungsantwort, Vasokonstriktion, Proliferation sowie Hypertrophie (Clozel und Gray 1995; Rubin und Roux 2002). Bosentan zeigt *in vitro* ebenfalls gewisse antiproliferative Effekte. Die selektiven ET_A

Antagonisten Sitaxentan und Ambrisentan zeigten vergleichbar gute klinische Wirksamkeit und sind zur Behandlung der PAH zugelassen.

Ein weiterer Aspekt der vasoaktiven Behandlung von PAH ergibt sich durch den Einsatz von Phosphodiesterase-5 Inhibitoren wie Sildenafil und Tadalafil. Die Phosphodiesterase-5 ist unter pathophysiologischen Bedingungen bei der PAH in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien erhöht exprimiert und greift aufgrund ihrer cGMP-hydrolysierenden Eigenschaften negativ (vasokonstringierend) in den Gefäßtonus ein (Janssen, Ghofrani et al. 2009).

Sildenafil ist zur Therapie der PAH zugelassen und zeigt gute therapeutische Effekte bei PAH-Patienten (Galie, Ghofrani et al. 2005). Des Weiteren konnte auch im Monocrotalin-induzierten PH-Modell an der Ratte der positive Effekt von Sildenafil auf die Rechtsherzhypertrophie und das pulmonale vaskuläre Remodeling gezeigt werden (Itoh, Nagaya et al. 2004; Schermuly, Kreisselmeier et al. 2004).

1.3.2 Antiproliferative Therapieansätze bei der PAH

Substanzen, welche gezielt die in pulmonalvaskuläre Proliferationsprozesse eingreifen können und somit das vaskuläre Remodeling als Ziel haben, leiteten kürzlich einen Paradigmenwechsel in der Therapie der PAH ein. Zu ihnen zählen unter anderem Sorafenib und Imatinib.

Sorafenib ist ein Multikinase-Inhibitor, welcher Serin/Threonin- und Tyrosinkinase inaktiviert und zur Behandlung von Nierenzellkarzinomen zugelassen ist (Wilhelm, Adnane et al. 2008; Blaukovitsch, Zabel et al. 2009). Zu seinen Zielmolekülen gehören der Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGFR), der Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR), der Stammzellfaktor-Rezeptor (c-kit) sowie vor allem die intrazelluläre pro-proliferative Kinase Raf-1. Raf-1 wird *downstream* der Rezeptortyrosinkinasen aktiviert und sorgt für die weitere Signaltransduktion innerhalb der Zelle, welche zur Proliferation, zum Überleben der Zelle und zur Neovaskularisierung führt (Wilhelm, Carter et al. 2006; Klein, Schermuly et al. 2010).

Der pulmonalvaskuläre Widerstand konnte durch die Gabe von Tyrosinkinase-Inhibitoren im experimentellen Tiermodell für PH reduziert werden (Blaukovitsch, Zabel et al. 2009). Sorafenib hat einen antiproliferativen Effekt auf glatte Muskelzellen, da es auch auf den PDGF-Rezeptor und Raf-1 wirkt. Im PH-Modell konnten Verbesserungen im Remodeling,

Hämodynamik und Rechtsherzhypertrophie festgestellt werden, jedoch ist nicht vollständig geklärt, welches Zielmolekül hierbei die wichtigste Rolle für die Blockierung von Sorafenib ist (Klein, Schermuly et al. 2008; Moreno-Vinasco, Gomberg-Maitland et al. 2008). Bis heute gibt es noch keine zureichenden klinischen Studien zur Wirksamkeit von Sorafenib.

Imatinib (Abbildung 4) wurde ursprünglich in den 80er Jahren für die Krebsbehandlung entwickelt (Capdeville, Buchdunger et al. 2002). Seit 2001 ist es zur Therapie der chronischen myeloischen Leukämie (CML) und seit 2002 zur Behandlung nicht mehr resezierbarer und/oder metastasierender maligner gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) zugelassen. Hinsichtlich der Verwendung des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors Imatinib liegen bereits einige tierexperimentelle Studien vor, welche die Rückführung bereits etablierter struktureller Gefäßveränderungen sowie der Rechtsherzhypertrophie demonstrieren konnten (Schermuly, Dony et al. 2005). Imatinib inaktiviert PDGFR, c-kit und Breakpoint Cluster Region-Abelson (BCR-ABL). In Einzelfällen konnte auch die Wirksamkeit von Imatinib in PAH-Patienten dargestellt werden (Ghofrani, Seeger et al. 2005; Souza, Sitbon et al. 2006; ten Freyhaus, Dumitrescu et al. 2009). Eine klinische randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Phase II Studie mit Imatinib wurde abgeschlossen und zeigte positive Wirkung bei schwer kranken Patienten. Eine weltweite Phase III Studie zur Behandlung der PAH befindet sich derzeit in der Rekrutierungsphase.

Die Verwendung einer kombinierten Therapie basierend auf Medikamenten mit verschiedenen Wirkmechanismen, stellt einen weiteren Gesichtspunkt für die klinische Verbesserung der PAH in Patienten dar. Die kombinierte Gabe von Sildenafil, einem Phosphodiesterase 5- Inhibitor, bzw. Bosentan und Prostazyklin Analoga zeigte in einigen Patienten gute Wirkung (Ghofrani, Rose et al. 2003; Hoeper, Taha et al. 2003). Im Gegensatz hierzu hatte die Langzeitgabe von Sildenafil in Kombination mit Vasodilatoren in 13 Patienten nur einen geringen Effekt auf die Rechtsherzfunktion (Bhatia, Frantz et al. 2003). Zwei große randomisierte Placebo-Studien konnten bereits die Überlegenheit von Kombinationstherapien gegenüber Monotherapien belegen. In der TRIUMPH-I-Studie (TReprostiniil Sodium Inhalation Used in the Management of Pulmonary Arterial Hypertension) konnte gezeigt werden, dass im Rahmen einer bestehenden Therapie mit Sildenafil bzw. Bosentan die zusätzliche Gabe von inhaliertem Treprostiniil zur signifikanten

Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit in PAH-Patienten führte (McLaughlin, Benza et al. 2010). Diese Daten konnten in einer zweiten großen randomisierten, doppelblinden PACES-Studie (Pulmonary Hypertension Combination study of Epoprostenol and Sildenafil) bestätigt werden. Die gleichzeitige Gabe von Sildanefil zu einer stabilen intravenösen Epoprostenol-Behandlung führte zur signifikanten Verbesserung der Hämodynamik (Simonneau, Rubin et al. 2008).

1.4 Tiermodelle für die Untersuchung von pulmonaler Hypertonie

Für die Wissenschaft ist im Hinblick auf die Erforschung der pulmonalen Hypertonie die Entwicklung von geeigneten Tiermodellen von großer Bedeutung, da die Pathogenese noch immer nicht vollständig geklärt werden konnte. Ebenso ermöglichen geeignete Tiermodelle die Untersuchung neuer pharmakologischer Substanzen und ihre therapeutische Wirkung. Die zwei wichtigsten Tiermodelle sind derzeit die Monocrotalin (MCT) induzierte pulmonale Hypertonie bei der Ratte und das chronische Hypoxie-Modell an verschiedenen Spezies (Maus, Ratte, Kalb). Beide Modelle gehen mit Veränderungen der Pulmonalgefäße im Sinne eines pulmonalvaskulären Remodelings einher.

Bei Monocrotalin handelt es sich um ein Pyrrolizidinalkaloid aus *Crotalaria spectabilis* (Familie *Leguminosae*), welches in Ratten eine letal endende, schwere PH auslöst (Lalich und Merkow 1961). Dieses Phytotoxin wird über das Cytochrom P450 Monooxygenase-System in der Leber zu reaktiven alkylierenden Verbindungen (pyrrolische Dehydro-Alkaloide) umgesetzt. Bei Monocrotalin handelt es sich um eine selektiv toxisch wirkende Substanz. Das sehr kurzlebige, toxische MCT-Pyrrol erreicht nach der Leber zuerst das Gefäßbett der Lunge. Somit wirkt MCT überwiegend auf die pulmonalen Gefäße toxisch und hat keinen signifikanten Effekt auf das systemische Gefäßbett (Marsboom und Janssens 2004). Es kommt zu einer Schädigung des Endothels, erhöhter Permeabilität der Kapillaren, Ödembildung und Akkumulation von Makrophagen in der Strombahn der Lunge (Monnet und Chachques 2005). Des Weiteren kommt es zur Endotheldegeneration bzw. Hyperplasie, die glatten Muskelzellen der Media hypertrophieren, und es entwickelt sich eine Hyperplasie der Adventitia. Durch diese Veränderungen erhöht sich der Gefäßwiderstand. Die Druckbelastung des rechten Ventrikels steigt, und es entwickelt sich eine Rechtsherzhypertrophie und schließlich Rechtsherzinsuffizienz und -versagen.

Im zweiten Tiermodell, dem der chronischen Hypoxie, kommt es durch Reduktion des alveolären Sauerstoffpartialdruckes auf unter 70 mmHg zu einer globalen Vasokonstriktion der Pulmonalarterien. Diese hypoxische pulmonale Vasokonstriktion, die im Normalfall zu einer Optimierung der Ventilations-Perfusionsverteilung der Lunge führt, wird auch als Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnet. Bei globaler alveolärer Hypoxie jedoch führt sie zu einer pulmonalen Hypertonie, initial gekennzeichnet durch reine Vasokonstriktion, welche nach kurzer Zeit jedoch schon in ein reversibles pulmonalvaskuläres Remodeling übergeht. Die Mechanismen, welche zu Vasokonstriktion und Gefäßumbau durch den Effekt der Hypoxie führen, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass Sauerstoffsensoren während der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) beteiligt sind. Diese gelten als initiales Glied in der Signalkette der HPV. Hierbei muss es sich um Sauerstoff-konsumierende bzw. bindende Proteine oder Organellen handeln, welche mit den Effektorzellen (glatte Muskelzellen) kommunizieren können. Diese Sensoren sind wahrscheinlich auf den glatten Muskelzellen lokalisiert, da diese auf Hypoxie mit Kontraktion und Steigerung der intrazellulären Kalziumfreisetzung reagieren (Sommer, Dietrich et al. 2008). Hierbei spielen die Mitochondrien, als Hauptverbraucher von Sauerstoff für die Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP) in der Atmungskette, eine wichtige Rolle. Als weiterer Sensor werden die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen diskutiert. Während dieses Prozesses sind als Effektoren ebenfalls Kalziumkanäle, nichtspezifische Kationenkanäle und Spannungs-abhängige Kaliumkanäle beteiligt.

Eine mögliche Hypothese ist der verringerte Kaliumstrom durch spannungsgesteuerte Kaliumkanäle in den glatten Muskelzellen. Auf diese Weise wird das Membranpotential herabgesetzt und die intrazelluläre Kalziumkonzentration und die Phosphorylierung von Myosin-Ketten erhöht. Daraus folgt eine Vasokonstriktion (Weissmann, Grimminger et al. 2001).

Vom vaskulären Remodeling sind hauptsächlich die distalen, pulmonalarteriellen Widerstandsgefäße (Arteriolen) betroffen. Dieses ist mit der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und der Fibroblasten in der Adventitia unter Hypoxie verbunden. Jedoch tritt keine signifikante Endothelzellproliferation auf (Voelkel und Tudor 2000). Durch die Hypoxie erzeugte Vasokonstriktion in den pulmonalen Widerstandsgefäßen erhöht sich der Scherstress, welcher zur Hypertrophie und Proliferation der glatten Muskelzellen führen kann (Voelkel und Tudor 2000). Ebenso werden Substanzen im hypoxischen Lungengewebe

freigesetzt, welche die Konstriktion der Gefäße begünstigen. Hierzu gehören Endothelin 1 und Serotonin. Sie wirken gleichzeitig auch als Wachstumsfaktoren für die glatten Muskelzellen (Voelkel und Tudor 2000). Das chronische Hypoxie-Modell führt in den Tieren zu erhöhter Muskularisierung der Widerstandsgefäße und zur Rechtsherzinsuffizienz. Dies sind zwei Pathomechanismen, welche mit denen in PAH-Patienten übereinstimmen (Marsboom und Janssens 2004).

1.5 Rezeptortyrosinkinasen in der pulmonalen Hypertonie und die Bedeutung von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren

Eine Vielzahl an zellularen Prozessen wird über Phosphorylierungen gesteuert, dazu gehören die Zellteilung, metabolische Prozesse, Überleben und Apoptose der Zelle. Eine Störung der regulierten Phosphorylierung von spezifischen Substraten kann zu Veränderungen der Zellfunktionen und damit verbunden zu Erkrankungen bis hin zur Tumorentstehung führen. Die strenge Regulation wird über Proteinkinasen gesteuert; diese übertragen gezielt Phosphatgruppen auf das Zielprotein (Shchemelinin, Sefc et al. 2006). Die Phosphorylierung von Zielproteinen führt zum Anschalten von Signalkaskaden (z. B. MAPK/ ERK Signalweg), die bei vielen zellulären Prozessen wichtig sind. Auf diese Weise wird eine Signaltransduktion von extrazellulär nach intrazellulär gewährleistet, die für Prozesse in der einzelnen Zelle entscheidend sind. Proteinkinasen werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt, wobei die Tyrosinkinasen und die Seronin/Threonin-Kinasen die zwei häufigsten Kinasegruppen darstellen. Beide besitzen einen katalytischen Kern mit einer ATP-Bindungstasche und einem streng konservierten Aspartat (Knighton, Zheng et al. 1991). Zu den Rezeptortyrosinkinasen gehören unter anderem PDGFR, VEGFR, c-kit und BCR-ABL. Viele dieser Rezeptoren werden durch respektive Wachstumsfaktor-Liganden (z. B. PDGF oder VEGF) stimuliert. Hierbei bindet der Ligand spezifisch an den membranständigen Rezeptor und führt zu dessen Aktivierung. Diese Wachstumsfaktoren sind bei der Angiogenese, Embryogenese und der Wundheilung beteiligt und werden häufig mit kanzerogenen Prozessen in Verbindung gebracht. Hierbei führen sie zu übermäßiger Proliferation bzw. Tumorangiogenese.

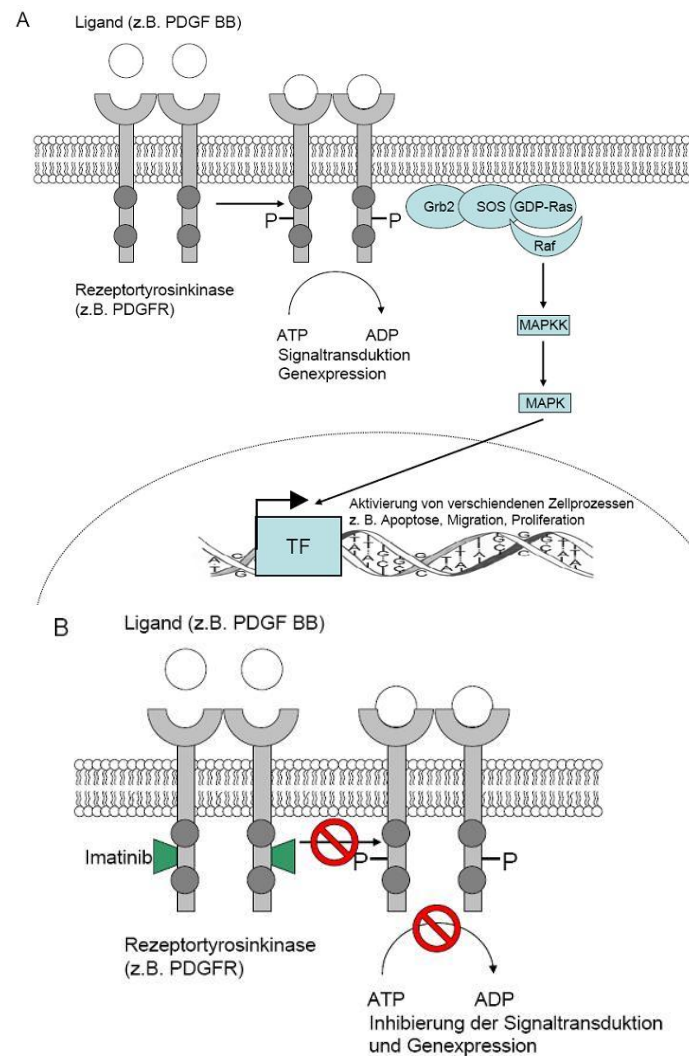


Abbildung 3: Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen am Beispiel der PDGF Rezeptoren und ihre Inhibition durch Imatinib.

A) Nach Bindung des Liganden kommt es zur Dimerisierung und intrazellulären Autophosphorylierung der Rezeptoren, wobei ATP umgesetzt wird. Anschließend wird eine weitere Signalkaskade über den Ras/Raf/MAPK Weg angeschaltet und durch die Transkription verschiedener Gene werden weitere zelluläre Aufgaben eingeleitet. B) Imatinib bindet und blockiert die ATP Bindungstasche der Rezeptortyrosinkinase und verhindert somit die Phosphorylierung und Aktivierung der *downstream* Signalwege.

Verschiedene Studien konnten bereits die Beteiligung von Wachstumsfaktoren, wie z. B. PDGF, welcher an den PDGF-Rezeptor bindet, bei der Pathogenese von PAH bestätigen (Dumitrescu, Ghofrani et al. 2009). PDGF stimuliert sowohl die Proliferation als auch die Migration glatter Muskelzellen, die bei den vaskulären Remodelingprozessen eine entscheidende Rolle einnehmen (Rosenkranz 2008). Es aktiviert den PDGF-Rezeptor, welches zum Anschalten weiterer nachfolgender Signalkaskaden in der Zelle und letztendlich zu Proliferation und Migration führt (Abbildung 3). Des Weiteren ist bekannt, dass es unter hypoxischen Bedingungen zu einer verstärkten Aktivierung dieser Rezeptortyrosinkinasen

kommt (Dumitrescu, Ghofrani et al. 2009). Da besonders PDGF und die zugehörigen Rezeptoren in IPAH-Patienten stark hochreguliert vorliegen, erscheint ein therapeutischer Ansatz zur Hemmung dieser Rezeptoren vielversprechend (Perros, Montani et al. 2008). Hierfür eignet sich unter anderem der Inhibitor Imatinib (Abbildung 4).

Der Wirkmechanismus von Imatinib basiert auf der Bindung des Wirkstoffs in der ATP-Bindungstasche der Rezeptortyrosinkinase, an der normalerweise das Substrat (Grb2) bindet und zu einer Aktivierung des weiteren Signalweges führt. Die Phosphatgruppe des ATPs kann nicht mehr auf das eigentliche Substrat übertragen werden. Ohne Inhibierung dimerisiert der Rezeptor nach Ligandenbindung und es folgt die Autophosphorylierung des Rezeptors an Tyrosinresten. Darauf folgend wird eine nachfolgende Signalkaskade aktiviert, welche verschiedene Zellprozesse steuert. Hierzu gehören die Inaktivierung der Apoptose und die Aktivierung von Migrations- und Proliferationsmechanismen (Abbildung 3).

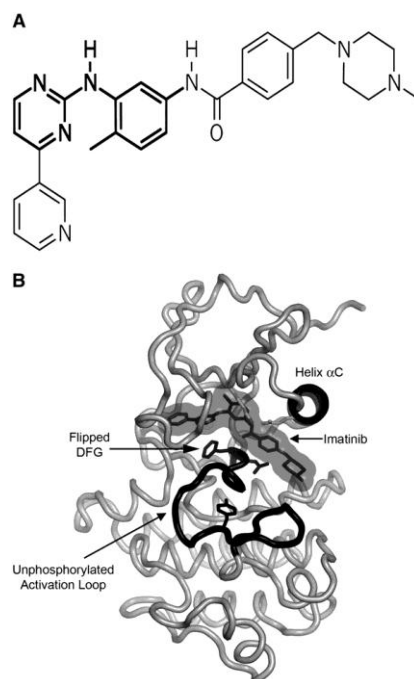


Abbildung 4: A) Strukturformel von Imatinib. B) Kristallstruktur der Tyrosinkinase c-ABL im Komplex mit Imatinib (Nagar 2007).

1.6 Kurzübersicht über die Eigenschaften zirkulierender Fibrozyten (ZFs)

Der Begriff zirkulierender Fibrozyt wurde bereits 1994 von Richard Bucala geprägt. Er beschreibt, dass diese Zellen aus der Blutzirkulation stammen und dass sie sowohl Eigenschaften von Leukozyten als auch von Fibroblasten besitzen. Es handelt sich um eine einzigartige Zellpopulation, die einen Beitrag zu verschiedenen Krankheitsverläufen leistet

und ihren Ursprung im Knochenmark hat. Dies zeigt sich u.a. durch die Expression von CD34, einem Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen.

Zunächst wurde ihre Rolle bei Wundheilungsprozessen beschrieben (Bucala, Spiegel et al. 1994). Hierbei konnte die Beobachtung gemacht werden, dass dieser Zelltyp sowohl bei der normalen als auch bei der fibrotischen Wundheilung eine Rolle spielt. Zirkulierende Fibrozyten zeichnen sich durch die gleichzeitige Expression hämatopoetischer und mesenchymaler Marker aus (Tabelle 1). Typische Marker, welche zur Identifizierung von zirkulierenden Fibrozyten in der Literatur Verwendung finden, sind Vimentin, Kollagen I und III, Prokollagen, Prolyl-4-hydroxylase sowie CD45, CD11b, CXCR4 und α -Smooth Muscle Actin. Vimentin, (Pro)-Kollagen und die Prolyl-4-hydroxylase beschreiben hierbei die mesenchymalen Eigenschaften dieses Zelltyps. Vimentin ist spezifisch für mesenchymales Gewebe und Fibroblasten. Prolyl-4-hydroxylase gehört zu den Schlüsselenzymen der Kollagenbiosynthese, die Expression dieses Enzyms in Fibrozyten weist auf die Produktion von Kollagen hin. CD45 und CD11b zeigen den hämatopoetischen Ursprung von Fibrozyten. CD45 ist eine transmembran-Proteintyrosinphosphatase und wird als Oberflächenprotein, außer auf Erythrozyten, auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert. CD11b ist ein auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten anzutreffendes Oberflächenmolekül. Es vermittelt die Adhärenz der Zellen. Teilweise exprimieren Fibrozyten spontan bzw. nach Stimulation mit dem Transforming Growth Factor (TGF- β) und Endothelin, α -Smooth muscle Actin (Gomperts und Strieter 2007). Hierbei handelt es sich um einen typischen Marker für glatte Muskelzellen.

Fibrozyten sind in der Lage unterschiedliche Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren zu produzieren und zu sekretieren (Tabelle 1). Hierzu gehören der Transforming Growth Factor α (TGF- α) und β 1. TGF- α verstärkt die Expression und Deposition von extrazellulären Matrix-Komponenten und ist ebenso in Makrophagen und Fibroblasten zu finden. Außerdem werden unterschiedliche Interleukine (1-alpha, 6 und 8) ausgeschüttet, welche eine Rolle während der Immunantwort einnehmen und für die Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen bzw. als Chemoattraktant für leukozytäre Zellen fungieren.

Die Sekretion von PDGF lässt auf Eigenschaften zurückschließen, welche zu Zellproliferation, Migration und Inhibition von apoptotischen Prozessen in unterschiedlichen Zelltypen führen.

Tabelle 1: Überblick der bekannten Marker und sekretierten Faktoren von Fibrozyten (Metz 2003).

Table 1. Fibrocyte-associated surface markers.		Table 2. Fibrocytes secrete chemokines, cytokines and growth factors implicated in wound repair.		
Marker type	Reference	Factor	Comments	Ref.
ECM markers				
Collagen I	(2–8)]			
Collagen III	[2]			
Fibronectin	[2]			
Vimentin	[2]			
CD markers				
CD11a (LFA-1)	[2–3]			
CD11b (Mac 1)	[2]			
CD13 (pan myeloid antigen)	[2]			
CD34 (hemopoetic stem cell antigen)	[2]			
CD45 (leukocyte common antigen)	[2]			
CD54 (ICAM)	[2]			
CD58 (LFA-3)	[2]			
CD80 (B7-1)	[3]			
CD86 (B7-2)	[2–3]			
MHC-related markers				
MHC class II	[2–3]			
HLA-DP	[3]			
HLA-DQ	[3]			
HLA-DR	[3]			
Chemokine receptors (ligands)				
CCR3 (MCP-3, MCP-5, RANTES, MIP1 α , HCC-1)	[4]			
CCR5 (MIP1 α , MIP1 β , RANTES)	[4]			
CCR7 (ELC, SLC)	[4]			
CXCR4, fusin (SDF-1)	[4]			
α chemokines				
MIP1 α		constitutive; \uparrow with TGF- β 1 or IL-1 β		[8]
MIP1 β		constitutive; \uparrow with TGF- β 1 or IL-1 β		[8]
MCP-1		constitutive; \uparrow with TGF- β 1 or IL-1 β		[8]
β chemokines				
IL-8		constitutive; \uparrow with TGF- β 1 or IL-1 β		[8, 31]
GRO α		constitutive; \uparrow with TGF- β 1 or IL-1 β		[8]
Cytokines				
TNF- α		with IL-1 β stimulation		[8]
IL-6		with IL-1 β or TNF stimulation		[8]
IL-10		with IL-1 β or TNF stimulation		[8]
Growth Factors				
Angiogenin		constitutive		[31]
CTGF		constitutive		[31]
IGF-1		constitutive		[31]
M-CSF		constitutive		[8, 31]
PDGF		constitutive		[31]
TGF β		constitutive		[8]
Other				
MMP-9		Constitutive, active and latent		[31]
α SMA		\uparrow with TGF- β 1		[4]

1.7 Funktion von zirkulierenden Fibrozyten bei Wundheilung und anderen Erkrankungen

Fibrozyten zeigen wesentliche Eigenschaften, die bei Wundheilungsprozessen wichtig sind. Ebenso haben sie Anteil an fibrosierenden Erkrankungen wie der pulmonalen Fibrose, Asthma bronchiale und Sklerodermie (Bucala, Spiegel et al. 1994; Gomperts und Strieter 2007). Sie können zu Myofibroblasten transdifferenzieren; hierbei verlieren sie ihren Vorläuferzellen-Marker CD34, exprimieren aber stattdessen glattes Muskelaktin (Abe, Donnelly et al. 2001; Chauhan, Abraham et al. 2003; Schmidt, Sun et al. 2003; Phillips, Burdick et al. 2004; Quan, Cowper et al. 2004). Sie sekretieren proinflammatorische Zytokine, hierzu gehören der Tumor Nekrose Faktor (TNF), Interleukine, TGF- α und β und Metalloproteasen (Chesney, Metz et al. 1998). Außerdem sekretieren sie proangiogenetische Faktoren wie VEGF und PDGF und zeigen die Expression von Chemokinrezeptoren, welche vor allem für die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und zirkulierenden Fibrozyten notwendig sind (Herzog und Bucala 2010). Fibrozyten sind bei Wundheilungsprozessen der Haut beteiligt; dies konnte bereits in Studien von Yang, Scott et al. gezeigt werden, wobei diese Zellen in hypertrophiertem Narbengewebe von Brandwunden vermehrt gefunden wurden (Yang, Scott et al. 2005). Im *in vivo* Wundkammer-Modell in Mäusen konnte gleichfalls eine Rekrutierung von CD34, Vimentin,

Kollagen 1-positiven Fibrozyten während der inflammatorischen Phase festgestellt werden (Bucala, Spiegel et al. 1994). In Patienten mit Verbrennungen konnte eine erhöhte Anzahl an Fibrozyten im Vergleich zu Gesunden festgestellt werden, wobei die Möglichkeit besteht, dass diese Zellen die Aktivität der umliegenden Fibroblasten über TGF β 1 regulieren (Yang, Scott et al. 2005; Wang, Jiao et al. 2007). Des Weiteren wurden Fibrozyten auch in Patienten mit Sklerodermie gefunden. Hierbei handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung des Bindegewebes, die sowohl die Haut als auch die inneren Organe betreffen kann (Herzog und Bucala 2010). In der Haut von Sklerodermie-Patienten befinden sich im Vergleich zu gesunden Patienten mehr Bindegewebszellen (Cowper, Bucala et al. 2005). Blutserum von Patienten mit Sklerodermie begünstigt das Wachstum von Fibrozyten *in vitro*, dies scheint mit einer reduzierten Serum Amyloid P (SAP) Konzentration im Zusammenhang zu stehen (Pilling, Buckley et al. 2003). SAP gehört zur Pentraxin Proteinfamilie und bindet an verschiedene Moleküle, wie apoptotische Zellen, Plasmaproteine und mikrobielle Polysaccharide (Steel und Whitehead 1994; Gewurz, Zhang et al. 1995; Hutchinson, Hohenester et al. 2000). Es inhibiert die Differenzierung von Fibrozyten *in vitro* (Pilling, Buckley et al. 2003).

Während der Rekrutierung sind verschiedene Chemokin-Rezeptoren und ihre Liganden beteiligt (Luster, Alon et al. 2005). Humane Fibrozyten exprimieren CCR3, CCR5, CCR7 und CXCR4 (Abe, Donnelly et al. 2001; Quan, Cowper et al. 2004). CXCR4 spielt für die Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen eine Schlüsselrolle (Murdoch 2000).

Aufgrund ihrer mesenchymalen Eigenschaften und der Fähigkeit, extrazelluläre Matrix-Komponenten zu exponieren, werden ihnen fibroproliferative und Reparaturprozesse in Geweben zugeschrieben (Chesney, Metz et al. 1998; Metz 2003). Vor allem im Bleomycin-induzierten Maus-Fibrose-Modell konnten Strieter et. al. die Beteiligung dieser Zellen im Krankheitsverlauf der pulmonalen Fibrose zeigen (Gomperts und Strieter 2007). In diesem Modell wurde bereits detailliert die Migration von Fibrozyten untersucht. Eine wichtige chemotaktische Achse stellt dabei CXCL12/ CXCR4 dar (Phillips, Burdick et al. 2004). In Tieren mit Bleomycin-induzierter Fibrose konnte eine erhöhte CXCL12-Expression in der Lunge sowie eine vermehrte Fibrozytenanzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Durch die mit Bleomycin erzeugte Inflammation in der Lunge kommt es zum Anstieg von CXCL12 und zu einer verstärkten Rekrutierung von Fibrozyten (CXCR4+) (Phillips, Burdick et al. 2004). Die Blockierung der CXCR4 / CXCL12-Achse mit Hilfe von CXCL12-spezifischen

Antikörpern führte zu einer verminderten Rekrutierung von Fibrozyten-(CD45+, Col1+, CXCR4+) im Vergleich zu Kontrolltieren, welche mit einem unspezifischen Antikörper behandelt worden waren (Phillips, Burdick et al. 2004). Außerdem wurde eine reduzierte Kollagendeposition und eine Reduzierung von α -Smooth muscle Actin-positiven Zellen (Myofibroblasten) in den Lungen festgestellt, in denen die Blockierung der CXCL12 / CXCR4 Achse stattfand (Gomperts und Strieter 2007). Dies führt zu der Annahme, dass eine Verbesserung des fibrotischen Zustandes unter Blockierung der Rekrutierungsachse von Fibrozyten stattfindet. Des Weiteren wird auch in diesem Modell die Fähigkeit der Transdifferenzierung von Fibrozyten zu Myofibroblasten bestätigt, welche durch die Expression von α -Smooth muscle Actin gekennzeichnet ist und durch die blockierte Fibrozyten-Rekrutierung aufgehoben werden kann.

In Fibrose-Patienten wurde ein erhöhter CXCL12-Gehalt sowohl in den Lungen als auch im Blutplasma sowie erhöhte Fibrozytenzahlen beschrieben (Mehrad, Burdick et al. 2007).

1.8 Beteiligung von zirkulierenden Fibrozyten am pulmonalen Remodeling

Der Beteiligung von Fibrozyten am pulmonalen Remodeling bzw. an Reparaturprozessen von Luftwegen konnte im asthmatischen Krankheitsbild dargestellt werden (Schmidt, Sun et al. 2003). Pathologische Veränderungen während asthmatischer Erkrankungen sind durch chronische Entzündungsprozesse der Bronchien und Remodeling gekennzeichnet. Zu den Remodeling-Prozessen zählen unter anderem die Hypertrophie und Hyperplasie von glatten Muskelzellen der Atemwege, welche im Verlauf der Erkrankung zunehmen (Benayoun, Druilhe et al. 2003; Woodruff, Dolganov et al. 2004). Der Grund für die Hyperplasie der glatten Muskelzellen ist weitgehend unbekannt. *In vitro* Experimente zeigten jedoch, dass dieser Vorgang mit proliferativen Prozessen der Muskelzellen begründet werden kann (Johnson, Roth et al. 2001; Trian, Benard et al. 2007). Eine alternative Erklärung sind Vorläuferzellen aus dem umliegenden Gewebe bzw. aus dem peripheren Blut, die in Myofibroblasten differenzieren können (Abe, Donnelly et al. 2001; Saunders, Siddiqui et al. 2009). Im allergischen Asthma-Maus-Modell wurde die Rekrutierung von Fibrozyten in das Bronchialgewebe und die Differenzierung dieser Zellen in Myofibroblasten gezeigt (Schmidt, Sun et al. 2003). In allergischen Asthma-Patienten wurde die Akkumulation von fibrozytenartigen Zellen in der Bronchialschleimhaut dargestellt.

Der Möglichkeit des Einflusses von Entzündungsprozessen und Akkumulation von zirkulierenden Zellen bei den pathologischen vaskulären Umbauprozessen bei PH wurde zunächst kaum Beachtung geschenkt. Jedoch wird seit einigen Jahren angenommen, dass die Rekrutierung neuer Zellen sowohl von Fibroblasten aus dem umliegenden Gewebe als auch von mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Blut, welche zu dem Prozess des Remodelings beitragen, eine Rolle spielt (Abbildung 5) (Frid, Brunetti et al. 2006). Seit 2006 gibt es erste Studien an chronisch hypoxischen Kälbern und Ratten, welche die Beteiligung von zirkulierenden Fibrozyten an der Entstehung chronischer pulmonaler Hypertonie nahe legten. Stenmark et. al. zeigten in diesem Tiermodell die perivaskuläre Akkumulation von CD45, Kollagen-1 positiven Zellen (Fibrozyten) und Monozyten / Makrophagen (Frid, Brunetti et al. 2006). Des Weiteren findet durch diese Zellen eine vermehrte Deposition von extrazellulärer Matrix wie Kollagen statt (Stenmark, Davie et al. 2005). Durch eine *in vivo* Depletion zirkulierender monozytärer Zellen in chronisch hypoxischen Ratten konnte die Akkumulation von Fibrozyten in der pulmonalarteriellen Adventitia sichtbar reduziert werden (Frid, Brunetti et al. 2006).

Diese und weitere Studien (Varcoe, Mikhail et al. 2006) weisen auf eine verstärkte Expression von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie eine Anreicherung von Leukozyten in der Lunge und deren Gefäßen bei akuter und chronischer Hypoxie hin. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung von Nikam et. al. konnte die Präsenz von zirkulierenden Fibrozyten in Pulmonalarterien von idiopathischen PAH Patienten gezeigt werden. Außerdem zeigten sie im Hypoxie-induzierten PH Modell in der Maus eine verstärkte Rekrutierung von Fibrozyten in die pulmonalen Widerstandsgefäße, welche durch die Gabe von Treprostinil, einem Prostazyklin-Analog, rückgängig gemacht werden konnte (Nikam, Schermuly et al. 2010).

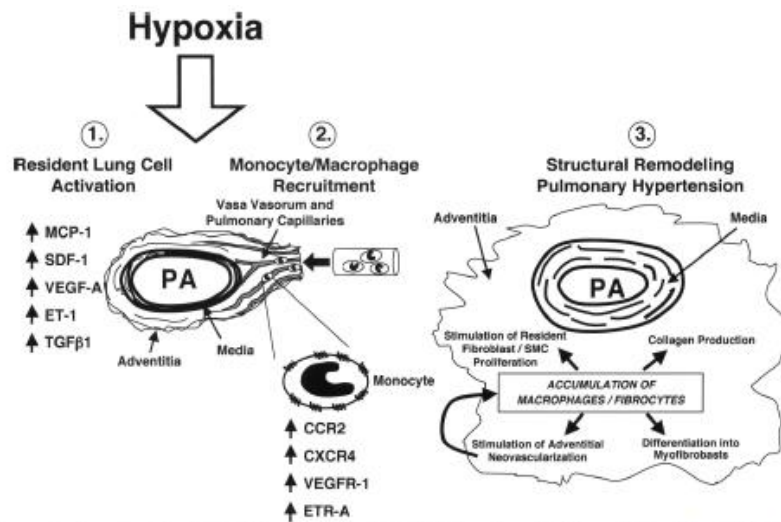


Fig. 1. MCP, monocyte chemoattractant protein; SDF, stromal cell-derived factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; ET, endothelin; TGF, transforming growth factor; PA, pulmonary artery; SMC, smooth muscle cell; ETR, ET receptor; VEGFR, VEGF receptor; ETR, ET receptor.

Abbildung 5: Pathomechanismen des vaskulären Remodelings in der Lunge unter Hypoxie und Beteiligung von Monozyten bzw. Fibrozyten (Stenmark, Davie et al. 2005).

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist eine lebensbedrohliche Erkrankung. Sie ist charakterisiert durch eine Erhöhung des pulmonal-vaskulären Widerstandes aufgrund Vasokonstriktion und Gefäßwandumbau sowie der konsekutiven Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz. Untersuchungen der pathophysiologischen und molekularen Prozesse des Gefäßwandumbaus identifizierten Proliferation residenter Zellen sowie die Rekrutierung zirkulierender Zellen (Fibrozyten) aus dem Blutstrom. Als neuartiger therapeutischer Ansatz bewährten sich kürzlich anti-proliferative Substanzen, welche Rezeptortyrosinkinasen wie den Platelet derived growth factor receptor (PDGFR) blockieren. Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollte die Beteiligung von zirkulierenden Fibrozyten an den vaskulären Umbauprozessen in der durch chronische Hypoxie induzierten PH der Maus untersucht werden. In diesem Tiermodell sollte die Wirkung des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors Imatinib auf den chronisch hypoxischen pulmonalen Gefäßwandumbau anhand klinischer, hämodynamischer und histologischer Parameter analysiert werden. Insbesondere sollte der Einfluss von Imatinib auf die *in vivo* Rekrutierung von zirkulierenden Fibrozyten in die pulmonalen Widerstandsgefäße untersucht werden. *In vitro* sollte diese Zellpopulation auf die Expression PH-relevanter Rezeptortyrosinkinasen (PDGFR, c-kit, VEGFR) bzw. relevanter Chemokinrezeptoren (CXCR4) hin untersucht werden. Des Weiteren sollten parakrine Effekte zirkulierender Fibrozyten auf am Remodeling beteiligte Zelltypen (glatte Muskelzellen und Fibroblasten) untersucht werden.

Für die Bestimmung des Gefäßwandumbaus unter Hypoxie sollte eine neue Methodik, die Design-basierte Stereologie, angewendet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

3[H] Thymidin	Perkin Elmer NET027Z
Aceton	Roth
Acrylamid	Roth
Agarose (low melt)	USB Corporation
Ammominumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich
Chloroform /Trichlormethan	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Analytical
Glycerin 99,5 % p.A.	Roth
Glycin 99 % p.A.	Roth
Igepal CA-630	Sigma Aldrich
Imatinib Mesylat	Novartis
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Methanol	Roth
Mowiol	Sigma
Natrium(meta)vanadat 98 % p.A.	Fluka Analytical
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Paraformaldehyd	Roth
Sodium dodecylsulfate (SDS) Pellets/ Natriumdodecylsulfat Pellets	Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
Tris	Roth
Triton X 100	Roth
Tween 20	Sigma Aldrich

3.1.2 Seren, Antibiotika und Medien für Zellkultur

Bovines Kälberserum	PAA laboratories GmbH
Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline	PAA laboratories GmbH
Dulbecco's modified eagle's medium, ohne Glukose	PAA laboratories GmbH
EDTA/ Trypsin 0,5 %	Gibco
Endothelialer Wachstumsfaktor (EGF)	Upstate
Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF)	Upstate
Ficoll Zuckergradienten Lösung	AG Biochrome, Germany
Fötales Bovines Serum	PAA laboratories GmbH
L-Glutamin (200mM)	PAA laboratories GmbH
Medium für glatte pulmonalarteriellen Muskelzellen	Lonza
Penicillin/ Streptomycin	PAA laboratories GmbH
Platelet derived growth factor B (PDGF B)	Peprtech
SmGM®-2 Single Quots (Zusätze und Wachstumsfaktoren, hEGF, Insulin, hFGF-B, FBS und Gentamycin/ Amphotericin-B)	Lonza
Ziegenserum	Sigma

3.1.3 Substanzen für die histologische Färbung

DAB Peroxidase Substrat Kit	Vector/ Linaris
Eindeckmedium Xylol-löslich (Entellan)	Merck
Ethanol	Roth
Impress Reagenz Kit Peroxidase	Vector/ Linaris
Isopropanol	Roth
Methanol	Roth
Methylgrün Counterstain	Vector/ Linaris
R.T.U. Horseradish Peroxidase Streptavidin	Vector/ Linaris
Roti-Histol	Roth
Streptavidin/ Biotin Blocking Kit	Vector/ Linaris
Trypsin	Zymed laboratories Inc.
Vectastain Elite ABC Kits	Vector/ Linaris
Vector Mouse on mouse (M.O.M) Immunodetektions Kit	Vector/ Linaris
Vector NovaRed Substrat Kit	Vector/ Linaris

Vector VIP Substrat Kit	Vector/ Linaris
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck
Xylol	Roth

3.1.4 PCR-Reagenzien

10 x Puffer II	Applied Biosystems
100 bp Marker	Fermentas
dNTPs (10 mM)	Applied Biosystems
Ethidiumbromid	Roth
Ladepuffer	Fermentas
Mastermix (SYBRgreen)	Biorad
MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems
MuLV Reverse Transkriptase	Applied Biosystems
Random Hexamers bzw. Oligo d(T) ₁₆	Applied Biosystems
RNase Inhibitor	Applied Biosystems
TAE Puffer	Tris EDTA Acetat

3.1.5 Sonstige Substanzen und Puffer

1 x Transferpuffer (WB)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % v/v Methanol
10 x PBS	Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid
Complete	Roche
DualMarker	Biorad
ECL Lösung	Amershaw
FACS-Puffer	0,3 % BSA/PBS steril filtriert
Laufpuffer (WB)	Tris, Glycin, 10 % SDS, Wasser, pH 8,3
Meerrettichperoxidase-konjugierter Marker	Cell signalling
Ponceau S	SERVA electrophoresis GmbH
Protease- und Phosphatse inhibitionscocktail	Thermo Scientific
RIPA	Thermo Scientific
RLT Puffer	Qiagen

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity	Thermo Scientific
Substrate	
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung/ 0,1 % Tween
TriFast	Peqlab
β -Mercaptoethanol	Sigma

3.1.6 Material für Tierexperimente

Baytril®	Bayer Health Care
EDTA Röhrchen	Sarstedt
Glivec® 400 mg Tabletten (Imatinib)	Novartis
Heparin -Natrium-25000	Ratiopharm
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH
isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	Fresenius Kabi

3.1.7 Kits

Dynalbeads, CELlection Pan Maus IgG Kit	Invitrogen
Rneasy Aufreinigungs Kit	Qiagen
Quantikine PDGF BB Elisa Kit	R and D Systems
Quantikine SDF 1 alpha Elisa Kit	R and D Systems

3.1.8 Geräte und spezielle Materialien

Durchlichtmikroskop DMIL	Leica
Einbettkassetten	Roth
ELISA Reader, Nanoquant	Tecan
Entwässerungsmaschine	Leica
Feinwaage	Denver instruments
feuchte Kammer	Werkstatt MPI Bad Nauheim
Heizblock	HLC
Heizschrank	Heraeus
High End Fluoreszenz Mikroskop Imager Z.1	Zeiss
Hypoxiekammer	COY laboratory products, Michigan, USA
Konfokalmikroskop	Leica
Kryotom	Leica

Kühlplatte	Leica
Kühlzentrifuge	Thermo Scientific
Mikrotom	Microm
Mikrowelle	Sharp
Millar Katheter	FMI Föhr Medical Instruments GmbH
Multi-Purpose Scintillation Counter	Beckman Coulter
Nanodrop	Peqlab
Neubauerzählkammer	Marienfeld
Nitrozellulosemembran (BioTrace NT)	Pall Corporation
Pap Pen	Dako
PCR Maschine	Biometra
Photometer (SmartSpec Plus)	Bio-rad
Pinsel	Roth
PowerLab System	AD Instruments GmbH
Precellys 24 Homogenisator	Peqlab
Precellys-Keramik-Kit	Peqlab
Protein A/G PLUS	Santa Cruz
Real time PCR Maschine	Bio-rad
Röntgenfilme	Kodak/ Amershaw
RUS-1321-RA	FMI Föhr Medical Instruments GmbH
Schlundsonde	Acufirm
Sezierbesteck	F. S. T. Fine Science Tools
Spektrophotometer	Bio-rad
Sterilbank	Nuaire
Vakuumpumpe	KNF Lab
VersaDoc Imaging System	Bio-rad
Vinylhypoxiekammer	Coy labs
Waage	AND
Wasserbad	Microm
Western Blot Apparatur Mini Proean tetra cell	Bio-rad
Z1 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Zellkulturinkubatoren	Nuaire

Zellschaber	Greiner bio-one
-------------	-----------------

3.1.9 Sonstige Materialien

1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
12 well Platten	Greiner bio-one
15 ml Röhrchen	Greiner bio-one
24 well Platten	Greiner bio-one
50 ml Röhrchen	Greiner bio-one
6 well Platten	Greiner bio-one
Deckgläser	Roth
FACSRöhrchen	Greiner bio-one
Objekträger	Roth
T75 Zellkulturflaschen	Greiner bio-one

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Aufreinigung von Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellen

Für die Aufreinigung von RNA aus Zellen wurden diese zunächst 2-3-mal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und in RLT-Puffer (1 ml RLT-Puffer + 10 µl β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen nach dem QIAGEN RNeasy Kit Protokoll und den zugehörigen Säulen, Puffern und Protokoll aufgereinigt. Es folgte z. T. ein DNase I Verdau nach Anleitung des Herstellers. Nach der Aufreinigung wurde die gesamte RNA in ddH₂O eluiert, der RNA-Gehalt gemessen (NanoDrop) und bei -80 °C gelagert.

3.2.1.2 Aufreinigung von RNA aus Lungengewebe

Zunächst wurde das gefrorene Gewebe mit Hilfe eines Kryotoms zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe in 1 ml TriFast (PEQLAB) aufgenommen und mit einer Spritze und Kanüle homogenisiert, für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und gevortext. Zu den Proben wurden je 200 µl/ml Chloroform gegeben, diese geschüttelt und bei RT inkubiert (7 min). Die Proben wurden für 15 min zentrifugiert (4 °C, 13000 rpm), die obere Phase (RNA) vorsichtig abgenommen und mit der gleichen Menge 70 % igem Ethanol versetzt. Nach Mischen der

Phasen wurden diese auf die RNeasy-Säulen geladen und bei 8000 g für 15 s zentrifugiert. Die Säulen wurden einmal mit RM1 Puffer (8000 g, 15 s, RT) und zweimal mit RPE Puffer gewaschen (8000 g, 2 min). Anschließend wurden die Säulen getrocknet (1 min, 13000 rpm) und die gesamte RNA mit ddH₂O eluiert (8000 g, 1 min). Es wurde die Konzentration der Gesamt-RNA photometrisch bestimmt (NanoDrop). Nach der Aufreinigung wurde die gesamte RNA in ddH₂O eluiert und bei -80 °C gelagert. Alle Schritte, wenn nicht anders beschrieben, erfolgten bei RT.

3.2.1.3 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Für die Umschreibung von RNA zu cDNA (komplementären DNA) Strang wird die Methodik der reversen Transkriptase verwendet. Durch diese Methode sind der Nachweis und die Quantifizierung von kleinsten RNA-Mengen möglich. Es wurden zwischen 500- 1000 ng RNA in cDNA pro Ansatz umgeschrieben. Hierfür wurden die Proben für 10 min bei 70 °C denaturiert, 5 min gekühlt und zentrifugiert (13000 rpm, RT). Anschließend wurden die Proben mit folgendem Mastermix versetzt:

10 x Puffer II	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Random Hexamers bzw. Oligo d(T) ₁₆	1 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
MuLV Reverse Transkriptase	1 µl
Aqua bidest	0,5 µl

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte nach folgendem Schema:

10 min 20 °C → 75 min 43 °C → 5 min 99 °C → 4 °C und Lagerung bei -20 °C.

3.2.1.4 PCR

Die PCR erfolgte über folgende Schritte:

Schritt	Zeit
Denaturierung 95 °C	10 min
Denaturierung 95 °C	30 s
Primeranlagerung (58-59 °C)	30 s
Elongation 72 °C	1 min 2 (Zyklusanzahl)

Finale Elongation 72 °C 10 min
 Pause 4 °C

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese (3.2.1.6).

Tabelle 2: Real time Primer für die Quantifizierung von humaner cDNA.

Genname	Gen Bank Nummer	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Produkt-Länge (bp)
PDGFR b	NM_002609	ACGGAGACCTGGTGGACTAC	GACTCGTCCTTGCTCATGTC	187
PDGF b	NM_033016	TGTCCAGGTGAGAAAGATCG	GAATGGTCACCCGAGTTTG	182
PDGFR a	NM_006206	ATGTGTGGGACATTCATTGC	TTCAGCTGCACAACCTTTTC	178
PDGF a	NM_002607	CAGTCAGATCCACAGCATCC	CCTCGATGCTTCTCTTCCTC	204
KDR	NM_002253	GATGACAACCAGACGGACAG	TGTCTGGTTTGAGCCTTCAG	147
c-kit	NM_001093772	CTCATGGTCCGATCACAAAG	AAATCCCATAGGACCAGACG	171
KIT Ligand	NM_000899	GTTTCGTGCAATATGCTGGAG	TGCAGATCCCTTCAGTTTTG	117
ABL 1	NM_007313	ACACTGCTTCTGATGGCAAG	GATAATGGAGCGTGGTGATG	120

3.2.1.5 Real-time-PCR (quantitative PCR)

Über die Real Time PCR wird eine genaue Quantifizierung des Ausgangsmoleküls ermöglicht. Somit können Aussagen zur Genregulation unter bestimmten Bedingungen oder in unterschiedlichen Zelltypen getroffen werden. Für die quantitative PCR wurden je 100 ng cDNA (siehe RT-PCR) pro Ansatz eingesetzt. Ein Ansatz erhielt folgende Komponenten:

Mastermix (SYBRgreen)	12,5 µl
Vorwärts-Primer	0,5 µl
Rückwärts-Primer	0,5 µl
Aqua dest.	9,5 µl
cDNA	2 µl

Die PCR erfolgte am C1000TM Thermal Cycler (Biorad) mit folgendem Programm:

Schritt	Zeit
Denaturierung 95 °C	10 min
Denaturierung 95 °C	15 s
Primeranlagerung 59 °C	15 s
Elongation 72 °C	45 s
Pause 4 °C	∞

} 45 Zyklen

Tabelle 3: Real time Primer für die Quantifizierung von cDNA (Maus).

Genname	Gen Bank Nummer	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Produkt-Länge (bp)
PDGFR b	NM_001146268	agccagaagtagcgagaagc	ggcagattccgtgatgatg	137
PDGF b	NM_011057	ggagtcgagttggaagctc	gatcgatgaggtccgagag	130
PDGFR a	NM_001083316	tttatgccttgaaagcaacg	ccagcatggatgatacctttg	171
PDGF a	NM_008808	gctcgaagtcagatccacag	gggctctcagacttgtctcc	97
CXCR4	NM_009911	gcagcaggtagcagtgaaac	cagggttccttgttgagtc	163
CXCL12	NM_001012477	cgtaagcatctgaaaatcc	cccacttttctctctgc	163
PBGD	NM_013551.2	atgtccgtaacggcggc	ggtacaaggcttcagcatcgc	130

Analyse der Real time PCR Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte über den jeweiligen Ct-Wert, d.h. den Zyklus, an dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die relative Genregulation wurde über die Berechnung des Δ Ct (Cycle threshold)-Wertes ermittelt. Dieser wurde über die folgende Formel errechnet: Δ Ct = Ct (Test-Gen) – Ct (Referenzgen). Dabei wird die Genexpression jedes Gens gegenüber einem internen Referenzgen (Porphobilinogen Deaminase (PBGD)) normalisiert.

3.2.1.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Identifizierung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA)-Fragmenten, dies geschieht der Größe und Ladung nach über eine Gelmatrix. Für die Auftrennung von PCR-Produkten wurden 1-1,5 %ige Agarosegele (in 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE Puffer)) verwendet, diesen wurde vor Polymerisierung Ethidiumbromid zugegeben; auf diese Weise können die Banden der PCR-Produkte im Gel sichtbar gemacht werden, da sich Ethidiumbromid in der DNA interkaliert. Als Standard wurde ein 100 bp Marker verwendet.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)

Für die Isolation zirkulierender Fibrozyten wurden humane Buffy-Coats (BC, Blutbank Uniklinikum Giessen) verwendet. Es wurden zwischen 25-30 ml BC mit 15-20 ml Dulbeccos modified Eagles Medium (DMEM, PAA, the cell culture company) bzw. DMEM Glutamax gemischt und anschließend auf 15-25 ml Ficoll (Saccharose Lösung) überschichtet und für 21 min ohne Bremse zentrifugiert (1800 rpm). In der mittleren Phase entstand nach der Zentrifugation ein Leukozytenring, der vorsichtig abgenommen wurde (Abbildung 6).

Anschließend wurden die PBMCs noch mal für 15-21 min mit Bremse zentrifugiert (1800 rpm). Hierbei entstand ein Pellet aus PBMCs und ein Überstand aus Plasma, welcher vorsichtig abgesaugt wurde (Vakuumpumpe). Das Pellet wurde noch 1-2 x mit Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung (DPBS) gewaschen und zentrifugiert (1500 rpm, 7 min), um Thrombozyten zu entfernen. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml Medium (DMEM, 20 % Fetales Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/ Streptomycin) resuspendiert. Anschließend wurde in einer Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt und die Zellen in Medium in Kultur genommen (37 °C, 5 % CO₂ Inkubator).

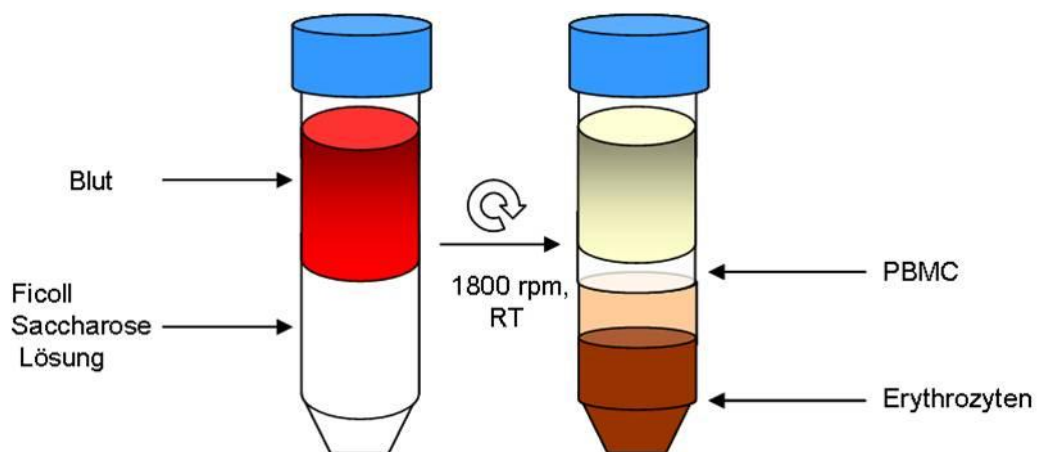


Abbildung 6: Schematische Darstellung für die Isolation von PMBCs aus Buffy-Coats. Die verschiedenen Phasen stellen die unterschiedlichen Blutbestandteile dar und sind gekennzeichnet.

Nach 3 Tagen Kultur wurden die nicht-adhärenenten Zellen vorsichtig abgesaugt und neues Medium auf die adhärenenten Zellen gegeben. Nach 3, 7, 14, 21 Tagen bzw. zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen morphologisch durch ihre charakteristische Spindelform identifiziert. Des Weiteren wurden die Zellen für die mesenchymalen und hämatopoetischen Marker gefärbt, um die Reinheit der Zellen zu bestimmen. Teilweise erfolgte die Reinigung der Zellen über magnetische Kügelchen.

3.2.2.2 Isolation zirkulierender Fibrozyten durch magnetische Aufreinigung

Für die Aufreinigung der zirkulierenden Fibrozyten aus den PBMCs wurde eine Zelldepletion mit magnetischen Kügelchen (Dynalbeads, CELLection™ Pan Mouse IgG Kit, Invitrogen) verwendet (Abbildung 7). Die Depletion wurde mit folgenden Antikörpern durchgeführt: CD2 zur Entfernung von T-Lymphozyten; CD14 zur Entfernung von Monozyten bzw. Makrophagen und CD19 zur Entfernung von B-Lymphozyten und Thrombozyten. Es wurde

die indirekte Methode verwendet, bei der die Zellen zunächst mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert werden und anschließend die Zell-Antikörperbindung an die Kügelchen erfolgt. Zudem wurde eine negative Depletion durchgeführt, d. h. die an die Kügelchen gebundenen Zellen verworfen wurden und die nicht gebundenen Zellen weiter verwendet wurden.

Für die Isolation wurden die sich in Kultur befindenden Zellen 3-4-mal mit DPBS gewaschen und anschließend mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)/Trypsin (2-5 min, 37 °C) bzw. 0,05 % EDTA/PBS von den Kulturflaschen abgelöst (1 h, 37 °C). Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 % FCS/ DMEM zu den Zellen gegeben und die noch adhären Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Kulturflasche gelöst, in ein Falconröhrchen überführt und zentrifugiert (7 min, 600 g). Das Zellpellet wurde in 1 % FCS/ DMEM resuspendiert und die Gesamtzahl der adhären Zellen mittels einer Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit dem entsprechenden Antikörpern (Tabelle 4) in der erforderlichen Konzentration inkubiert (Roller, 1 h, 4 °C). Für 1×10^6 Zellen sollten jeweils 1 µg Antikörper verwendet werden. Während der Antikörperinkubation wurden die Kügelchen (Dyna Beads, CELlection™ Pan Mouse IgG Kit, Invitrogen) für die Inkubation mit dem Zell-Antikörperkomplex vorbereitet. Hierfür wurden sie 3-4-mal mit PBS/ 0,1 % BSA, pH 7,4 gewaschen und anschließend zu der Zell-Antikörper-Suspension gegeben. Dieses Gemisch wurde dann für 60 min bei 4 °C auf dem Roller inkubiert. Das Röhrchen mit der Zell-Antikörpersuspension wurde dann in einen Magneten gehalten und der Suspensionsüberstand mit den darin befindlichen Zellen vorsichtig abgenommen. Die Kügelchen wurden noch 2-3-mal mit Medium gewaschen, um nichtgebundene Zellen zu lösen. Dieser Vorgang wurde dann mit den weiteren Antikörpern wiederholt. Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, bei RT unter der Sterilbank.

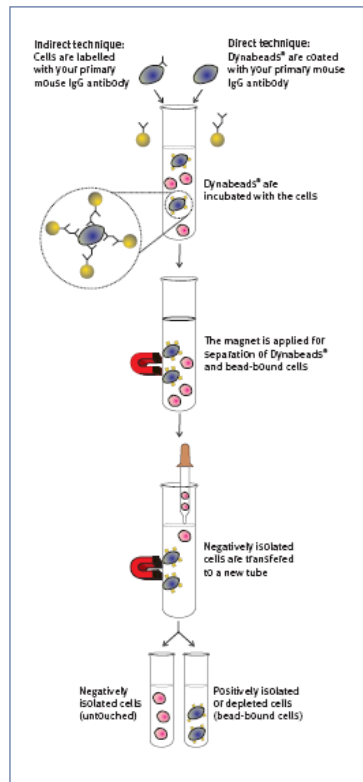


Abbildung 7: Prinzip der Aufreinigung von Zellen mit Hilfe der indirekten, negativen Depletion über Dynalbeads und Antikörper (Invitrogen 2010).

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die Zelldepletion.

Antikörper	Konzentration	Verwendetes Volumen des Antikörpers für 1×10^6 Zellen
CD2 (Millipore)	0,1 mg/ ml	10 μ l
CD14 (Millipore)	1 mg/ ml	1 μ l
CD19(Millipore)	0,5 mg/ ml	2 μ l

3.2.2.3 Kultivierung pulmonal-arterieller glatter Muskelzellen (PASMC)

Für die Kultivierung glatter Muskelzellen wurden Zellen aus humanen Pulmonalarterien verwendet, welche aus Spenderlungen (Wien) isoliert wurden. Die Isolation erfolgte über die technische Assistentin (Sabine Gräf-Hoechst) des Universitätsklinikums Gießen. Die Zellen wurden in spezifischem Medium kultiviert (5 % CO₂, 37 °C). Jeden zweiten Tag wurde frisches Medium zu den Zellen gegeben; sobald diese konfluent waren, wurden sie auf weitere Kulturflaschen aufgeteilt und weiter kultiviert.

3.2.2.4 Kultivierung von Fibroblasten

Als Fibroblastenkultur wurden humane pulmonale Fibroblasten aus Spenderlungen (Wien) verwendet. Diese wurden aus der Adventitia der Pulmonalgefäße gewonnen. Die Isolation erfolgte über die technische Assistentin (Sabine Gräf-Hoechst) des Universitätsklinikums Gießen. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium (20 % FCS, DMEM 4,5 g/l Glukose, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 % CO₂, 37 °C). Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie auf weitere Kulturflaschen aufgeteilt und weiterkultiviert.

3.2.2.5 Herstellung von konditioniertem Medium

Für die Erzeugung von konditioniertem Medium wurden die Zellen (Fibrozyten) für 7 Tage nach der Isolation in Kultur gehalten (5 % CO₂, 37 °C). Anschließend wurde das Medium durch frisches Medium (20 % FCS, DMEM Glutamax, 1% Penicillin/Streptomycin) ausgetauscht und die Zellen für die angegebenen Zeitpunkte (24-48 h) weiter kultiviert, z. T. erfolgte eine Behandlung mit Imatinib. Das Medium wurde anschließend über einen 0,22 µm Filter steril filtriert, somit wurden restliche Zellbestandteile entfernt. Das gewonnene konditionierte Medium wurde sofort in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.2.6 ³[H]Thymidin-Proliferationsassay

Zur Proliferationsbestimmung der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen wurde ein ³[H]Thymidin-Proliferationsassay gewählt. Dieser Assay beruht auf der Inkorporation von ³[H]Thymidin in die DNA während der Zellteilung, wobei es zur Markierung der neu synthetisierten DNA-Stränge kommt. Anschließend erfolgt eine Messung der Inkorporation des radioaktiv markierten Thymidins mittels eines Szintillationszählers.

Die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen bzw. Fibroblasten wurden wie bereits beschrieben (3.2.2.3) kultiviert bis sie konfluent waren, anschließend wurden sie für 24 h ausgehungert, d. h. dass ihnen Medium ohne FCS oder andere Wachstumsfaktoren gegeben wurde. Dann wurde den Zellen für 24 h das konditionierte Fibrozytenmedium, zum Teil mit Imatinib, zugesetzt, wobei in den letzten 4 h des Versuchs ³[H]Thymidin zum Medium gegeben wurde. Anschließend erfolgte die Messung der Inkorporation (Proliferation). Der Assay wurde mit der Unterstützung von Frau Dr. Soni Pullamsetti und ihrer technischen Assistentin, Katharina Weidl durchgeführt.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Probenherstellung und quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinaufreinigung aus Zellen

Für die Proteinanalytik über Western Blots wurde mit humanen Proben gearbeitet. Hierfür wurden die zirkulierenden Fibrozyten für unterschiedlich lange Zeit (3, 7, 14 und 21 Tage) in Zellkultur im Inkubator gehalten. Für die Aufbereitung von Proteinen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 3-4-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde RIPA mit Proteaseinhibitoren (Complete, NaF und Vanadat) hinzugegeben und die Zellen von der Kulturschale abgeschabt. Nach Überführung der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß bzw. Falkonröhrchen erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (4 °C, 13300 rpm), um die nicht gelösten Zellfragmente als Pellet zu erhalten. Die gelösten Proteine befanden sich im Überstand, welcher abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry.

Proteinaufreinigung aus Gewebe

Die Aufreinigung von Proteinen aus Mauslungen erfolgte zunächst, indem je 100 mg Gewebe mit 500 µl RIPA Puffer + Protease und Phosphataseinhibitorcocktail (Thermo Scientific) versetzt wurden. Das Homogenisieren erfolgte über 1,4 mm Precellys-Keramik-Kit im Precellys 24 Homogenisator (3 x 20 s, RT). Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (30 min, 13000 rpm, 4 °C), der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Vom Überstand der homogenisierten Proben wurde die Proteinkonzentration mittels der Lowry-Methode bestimmt. Hierbei kommt es zu einem Farbumschlag durch die Biuretreaktion, wobei eine Komplexbildung zwischen Peptidbindungen und zweiwertigen Kupferionen erfolgt, die zu einer Violettfärbung führen. Anschließend wird dieses Kupfer(II)ion zum Kupfer(I)ion reduziert. Kupfer(I) reduziert daraufhin das gelbliche Folin-Ciocalteu Reagenz zu Molybdän. Die daraus resultierende Blaufärbung wird für die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt (750 nm). Als Kontrolle diente der jeweilige Puffer, in dem die Proben vor der Homogenisierung aufgenommen

wurden. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3.2 SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Durch die SDS-PAGE werden die einzelnen Proteine eines Proteingemisches nach ihrer Molmasse aufgetrennt (diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese). Hierbei werden die Proteine denaturiert. Für die SDS-PAGE wurden 6, 8 bzw. 10 %ige Gele verwendet, teilweise wurden Gradientengele (Biorad) verwendet. Die Proben wurden mit 10 x Laemmlipuffer versetzt, 5 min aufgekocht, auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (5 min, 4 °C, 13300 rpm). Das Gel wurde mit den vorbereiteten Proben beladen und ihrer Größe nach aufgetrennt (100 V, 400 mA, 1-2 h, RT). Die Auftrennung erfolgte im Laufpuffer und einer Apparatur von Biorad. Es wurden zwischen 20-40 µg Gesamt-Protein eingesetzt. Als Standards wurden der DualMarker von Biorad bzw. Meerrettichperoxidase-konjugierter Marker (cell signalling) verwendet.

3.2.3.3 Proteintransfer und Antikörper-Inkubation

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Kühlblock, 1 h, 100 V, 400 mA). Nach dem Transfer wurde ein Teil der Membranen mit Ponceau S-Lösung gefärbt, um den Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran zu überprüfen; die Membranen wurden anschließend mit ddH₂O und 1 x PBS gewaschen, bis die Banden entfernt waren. Die Membran wurde für 1-1½ h mit 5 % Milchpulver / TBST blockiert. Die Inkubation des primären Antikörpers (Tabelle 6) erfolgte über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei RT (Schüttler). Sodann wurde die Membran 3 x 10 min mit 5 % Milchpulver / TBST gewaschen und mit dem sekundären Antikörper inkubiert (1-2 h, Schüttler). Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit TBST gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte mit ECL-Lösung (Amersham) und einem Röntgenfilm bzw. SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat und dem VersaDoc Imaging System. Alle Schritte, wenn nicht anders beschrieben, erfolgten bei RT.

3.2.3.4 Quantifizierung des Proteingehalts

Die Analyse der Western Blot Banden erfolgte mithilfe der Software Image J, wobei durch das Gelanalyse-Tool die Bandendichte gemessen wurde und diese ins Verhältnis zum

Referenzprotein (β -Actin) gesetzt wurde, um eine Aussage zum quantitativen Proteingehalt machen zu können.

3.2.3.5 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA ist ein immunologisches Testverfahren, welches zum Nachweis von Proteinen, aber auch Hormonen und Toxinen genutzt wird. Hierbei werden mit Antikörpern beschichtete Platten verwendet, an die das zu identifizierende Antigen gebunden wird. Über eine durch das Enzym katalysierte Reaktion wird ein Substrat umgesetzt, welches zu einem Farbumschlag führt und photometrisch gemessen werden kann. Die Signalstärke ist im Allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass der ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

Als Nachweis für PDGF BB und SDF-1 alpha aus Mausserum wurde ein ELISA von R&D verwendet. Dieser wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.4 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine essentielle Methodik für die Lokalisation von Proteinen auf Gewebe und Zellen. Hierfür eignet sich das Markieren der Antigene über die direkte (ein Antikörper) bzw. indirekte (zwei Antikörper) Fluoreszenzmethodik.

3.2.4.1 Färbung von Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden humane Zellen verwendet. Diese wurden 3-4 x mit PBS gewaschen und anschließend mit einem eiskalten Aceton / Methanol-Gemisch (1:1) fixiert (5-10 min, RT bzw. -20 °C). Nach weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen für 30 min bei RT bzw. 4 °C ü. N. mit 3 %igem Rinderserumalbumin (BSA)/PBS blockiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und mit 3 % BSA/ Ziegen Serum – Gemisch (1:1) für 45-60 min blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Es erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 6) für 60 min. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre fluoreszenz-gekoppelte Antikörper (Tabelle 6) auf die Zellen gegeben (60 min, abgedunkelt). Anschließend folgten eine Färbung mit Hoechst (1:3000) für 10 min bzw. Sytox Blue (1:2000) und die Einbettung der Zellen in Mowiol. Bis zur weiteren Verwendung wurden die fertigen Präparate abgedunkelt bei 4 °C gelagert.

Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, bei RT. Zwischen ihnen erfolgten jeweils Waschschriffe mit PBS.

3.2.4.2 Vorbereitung des Lungengewebes für Immunhistochemische bzw. Immunfluoreszenzfärbungen

Nach Lungenentnahme und Organlagerung in 1 % Paraformaldehyd (PFA)/PBS ü. N. wurden diese in PBS gewaschen und anschließend entwässert (Leica). Es folgte das Einbetten in Paraffin. Danach wurden die Paraffinblöcke mit Hilfe eines Mikrotoms (Microm) geschnitten. Die Schnitte wurden auf ein Wasserbad (40 °C) überführt, dann auf Objektträger gelegt und ü.N. auf einer Heizplatte (40 °C) getrocknet. Anschließend erfolgte das Färben der Schnitte.

3.2.4.3 Färbung von Lungengewebe

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Lungenschnitten wurden diese zunächst bei 65 °C deparaffiniert (Wärmeschrank, 25-30 min). Anschließend folgte eine Alkoholreihe zur Rehydrierung der Schnitte:

Xylol /Rotihistol 1	3-mal 10 min
99,6 % Ethanol	2-mal 5 min
96 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min

Dann wurden die Schnitte mit Aqua dest. gewaschen (5 min). Zur Antigen-Demaskierung wurde 1 mM EDTA in PBS verwendet. Die Schnitte wurden darin für 8 min in der Mikrowelle bei 630 W aufgekocht und anschließend für 30 min bei RT abgekühlt. Die Demaskierung dient der Wiederzugänglichmachung der Antigene für die Antikörper auf dem Gewebe und soll die spezifische Bindungsfähigkeit des Antikörpers an das passende Antigen ermöglichen. Nach 5-minütigem Waschen der Schnitte in VE-Wasser folgte das Blockieren der Schnitte mit 20 % Ziegen Serum / histologischer Puffer (60 min, feuchte Kammer, RT). Das Blockieren dient der Vermeidung bzw. Verringerung von starken Hintergründen, welche durch die van-der-Waals-Kräfte zwischen dem angewandten Antikörper und den Gewebsmolekülen entstehen können. Hierzu eignet sich Ziegen Serum aufgrund seiner Absättigung unspezifischer Bindungsstellen sehr gut, zudem interagiert es nicht mit dem verwendeten Antikörper. Anschließend wurde das Serum von den Proben dekantiert, die Schnitte kurz mit PBS gewaschen und mit dem primären Antikörper inkubiert (2 h, RT bzw. ü.N. bei 4 °C, Tabelle 6). Der primäre Antikörper war zum Teil direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, so dass die Verwendung eines sekundären Antikörpers nicht erforderlich war. Bei der Verwendung eines ungekoppelten primären Antikörpers erfolgte nach dem Waschen mit

PBS (3-mal) die Inkubation des zweiten Antikörpers (abgedunkelt, Tabelle 6), welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die Inkubation betrug in der Regel nicht mehr als 2 h bei RT. Bei einer Doppelfärbung erfolgten die beschriebenen Schritte erneut. Zum Schluss wurde eine Kernfärbung mit Sytox blue bzw. Topro 3 für 10-20 min, RT durchgeführt (Tabelle 6) und die Schnitte im Eindeckmedium (Mowiol) abgedunkelt und bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.4.4 Quantifizierung von Prokollagen 1a1 / GFP (Green fluorescent Protein)-positiven Zellen (zirkulierende Fibrozyten) im Lungengewebe

Nach der Färbung des Gewebes wurden die Lungenschnitte auf die Präsenz von doppelt positiven Zellen (Prokollagen 1a1 und GFP) hin untersucht. Dies erfolgte über die konfokale Mikroskopie, welche es ermöglichte, genaue Kollokalisierungen von Fluoreszenzfarbstoffen zu detektieren. Es wurden pro Lunge 13-15 Gefäße mit einem Durchmesser von 20-50 µm zufällig ausgewählt. Diese wurden auf das Vorhandensein von Prokollagen 1a1 und GFP, GFP allein bzw. Prokollagen 1a1 allein hin untersucht und die Zellen in unmittelbarer Gefäßnähe gezählt. Die Auswertung erfolgte blind.

3.2.5 Stereologische Aufbereitung des Mauslungengewebes

Für die stereologische Aufbereitung des Lungengewebes wurde dieses über eine zufällige Probennahme (random sampling) randomisiert.

Hierfür wurde zunächst das Volumen nach Scherle bestimmt (Immersionmethode): Die Lungen wurden in PBS getaucht und das verdrängte Volumen (Gewicht) mit einer Waage gemessen. Anschließend wurden die Lungen in 3 %iger low melt Agarose (in PBS) eingebettet, ausgehärtet und mit Hilfe eines Schneideblocks in gleichmäßig dicke Scheiben geschnitten. Von diesen wurden die Schichtdicke vermessen und die Schnitte fotografiert; dies galt der späteren Volumenbestimmung nach dem Cavalieri-Prinzip. Die Lungen wurden anschließend vorsichtig aus der Agarose gelöst und in Einbettkassetten gelegt. Die Entwässerung des Gewebes wurde automatisiert (Leica) durchgeführt. Es folgten das Einbetten des entwässerten Gewebes in Paraffin und das Schneiden der Blöcke in 3 µm dünne Schnitte (Mikrotom). Anschließend wurden die Schnitte histologisch gefärbt.

3.2.5.1 Histologische Färbung

Für die histologische Färbung von Lungengewebe aus der Maus wurde das folgende Protokoll (Tabelle 5) verwendet. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, bei RT.

Tabelle 5: Färbeprotokoll für die Doppelfärbung mit Peroxidase (Maus):

1. AB = alpha-Smooth muscle Actin (lila, rot) 2. AB = von Willebrandt (Endothel, braun)

Schritt	Dauer (min)	Reagenz	Anmerkungen
1	20-60	Deparaffinieren bei 58-60°C	Wärmeschrank
2	10	Xylol 1	Ablösen des Paraffins
3	10	Xylol 2	Ablösen des Paraffins
4	10	Xylol 3	Ablösen des Paraffins
5	5	EtOH 99,6 %	Rehydrierung
6	5	EtOH 99,6 %	Rehydrierung
7	5	EtOH 96 %	Rehydrierung
8	5	EtOH 70 %	Rehydrierung
9	15	H ₂ O ₂ -MeOH Gemisch 3 %	Ansatz: 100 ml MeOH (reinst) + 100 ml Wasserstoffperoxid 30 %
10	2 x 5	Aqua dest (bidest)	Waschen
11	2 x 5	1 x PBS	Schüttler, danach Schnitte mit Pap Pen umranden
12	15	Trypsinverdau bei 37 °C	1 ml Trypsin (2A) + 2 ml Diluent (2B)
13	3 x 5	1 x PBS	Schüttler
14	15	Streptavidin Blocking	Blockiert endogenes Streptavidin
15	5	1 x PBS	Schüttler
16	15	Biotin Blocking	Blockiert endogenes Biotin
17	5	1 x PBS	Waschen
18	15	10 % BSA	Waschen
19	2 x 5	1 x PBS	Waschen
20	60	Mouse IG Blocking Reagenz (1)	2 Tropfen M.O.M. IG Blocking Reagenz zu 2,5 ml 1 x PBS (bei RT)

Schritt	Dauer (min)	Reagenz	Anmerkungen
21	3 x 5	1 x PBS	Waschen
22	5	M.O.M. Diluent/Proteinblocking (2)	7,5 ml PBS + 600µl Protein Concentrate, dann nur dekantieren und 1.AB drauf
23	30 bzw. 4 °C ü.N.	1. AB alpha –SMA	1 : 900 in 10 % BSA
24	4 x 5	1 x PBS	Waschen
25	10	M.O.M. biotinyliertes IgG Reagenz (3)	10 µl Reagenz (3) + 2,5 ml M.O.M. Diluent
26	4 x 5	1 x PBS	Waschen
27	30	R.T.U. Horseradish POD Streptavidin	
28	3 x 5	1 x PBS	Waschen
29	30 s Mikroskop	Vector Nova Red Substrat Kit	5 ml Aqua dest.+ 3 Tropfen Reagenz 1 + 2 Tropfen Reagenz 2 + 2 Tropfen Reagenz 3 + 2Tropfen Hydrogen Peroxid Lösung
30	5	H ₂ O (Leitungswasser)	Waschen
31	2 x 5	1 x PBS	Waschen
32	20	10 % BSA	Blocken
33	3 x 5	1 x PBS	Waschen
34	20	Serumblock 1	2,5 % Normal Horse Serum (ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig) Serum abdekantieren
35	30	1. AB vWF aus Kaninchen (bei 37 °C)	1 : 900 in 10 % BSA
36	4 x 5	1 x PBS	Schüttler, waschen
37	30	2. AB	ImmPRESS REAGENT anti- Rb POD
38	4 x 5	1 x PBS	Substrat ansetzen
39	20-40 s	DAB Substrat Kit	5 ml Aqua dest. + 2 Tropfen Puffer pH 7,5 +4 Tropfen DAB Substrat

Schritt	Dauer (min)	Reagenz	Anmerkungen
			+2 Tropfen Hydrogenperoxid
40	5	H ₂ O	Waschen
41	3	Counterstain Methylgrün	60 °C Heizplatte
42	Kurz	Aqua dest.	Spülen
43	2	EtOH 96 %	Dehydrieren
44	5	Isopropanol	Dehydrieren
45	5	Isopropanol	Dehydrieren
46	5	Xylol 1	Dehydrieren
47	5	Xylol 2	Dehydrieren
48	5	Xylol 3	Dehydrieren
49		Eindecken mit Pertex	

3.2.6 Stereologische Vermessung des Muskularisierungsgrades in Mauslungen

Die stereologische Vermessung stellt ein neues Verfahren dar, um gemessene Parameter in Bezug auf das vermessene Gesamtobjekt herstellen zu können. Die Messung erfolgte mit Hilfe einer speziellen Software, der NewCAST Software (Visiopharm). Das Gewebe der gesampelten und gefärbten Lungen (3.2.5 und 3.2.5.1) wurde auf den Objektträgern optisch über eine Maske markiert. Anschließend wurde eine Matrix optisch über die Schnitte gelegt und zufällig Teile des Gewebes durch die Computersoftware ausgewählt. Es wurde entschieden, ob sich ein passendes Gefäß (Arterie von 20-50 µm Durchmesser) im ausgewählten Abschnitt befand. Dieses wurde mit Hilfe verschiedener Parameter (glatte Muskelzellen, Endothel, Gefäßlumen) markiert. Pro Lunge wurden ca. 170 Bildabschnitte des Gewebes betrachtet, im Durchschnitt ergaben sich 20-25 Gefäße, welche die gewünschten Parameter erfüllten. Abschließend wurde der Anteil der muskularisierten Fläche, der Wanddicke und des Endothels berechnet.

3.2.7 Mikroskopie

Alle verwendeten Präparate wurden mit Hilfe des Zeiss Z1 Fluoreszenzmikroskops bzw. des konfokalen Mikroskops (Zeiss) analysiert. Für die stereologischen Messungen wurde das Leica DM6000 verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung (IF), Immunhistologische Färbung (H) und Western Blot (WB).

Primäre Antikörper (Human und Maus)	Verdünnung (Verwendungszweck)	Spezies	Firma
CD11b	1:100 (IF)	Maus	BD Pharmingen
CD45	1:100 (IF)	Maus	BD Bioscience
c-KIT	1:500 (WB)	Kaninchen	Cell Signaling
CXCR4	1:800 (WB)	Kaninchen	Abcam
EGFP-FITC	1:70 (IF)	Ziege	Novus Biologicals
IgG Kaninchen	jeweilige Konzentration des Primärantikörpers	Kaninchen	Cell signalling
IgG Maus	jeweilige Konzentration des Primärantikörpers	Maus	Sigma
Kollagen1	1:70 (IF)	Kaninchen	Biodesign
PDGFR alpha	1:500-1:1000 (WB)	Kaninchen	Cell Signaling
PDGFR beta	1:500-1:1000 (WB)	Kaninchen	Cell Signaling
Phospho-PDGFR-Tyrosin 1021	1:300 (WB)	Kaninchen	Santa Cruz
Prokollagen 1A1	1:50 (IF)	Ziege	Santa Cruz
VEGFR 2	1:500 (WB)	Kaninchen	Cell Signaling
Vimentin Cy3 gekoppelt	1:300 (IF)	Maus	Sigma
Von Wille Brandt Faktor (vWF)	1:900 (H)	Kaninchen	DakoCytomation
α - Smooth muscle actin Cy3 gekoppelt	1:300 (IF)	Maus	Sigma Aldrich
α -Smooth muscle actin	1:900 (IH)	Maus	Sigma Aldrich
β -Aktin	1:3000 (WB)	Maus	Abcam
Sekundäre Antikörper			
Alexa 488 (Kaninchen)	1:1000 (IF)	Ziege	Invitrogen
Alexa 488 (Maus)	1:1000 (IF)	Ziege	Invitrogen
Alexa 555 (Kaninchen)	1:1000 (IF)	Ziege	Invitrogen
Alexa 555 (Maus)	1:1000 (IF)	Ziege	Invitrogen
Alexa 555 (Ziege)	1:1000 (IF)	Kaninchen	Invitrogen
POD Kaninchen	1:1000 (WB)	Ziege	Millipore Chemicon
POD Maus	1:1000 (WB)	Ziege	Millipore Chemicon
Kernfarbstoffe			
Hoechst	1:1000 (IF)		Invitrogen
Sytox blue	1:2000 (IF)		Molecular Probes Invitrogen
Topro 3	1:1000 (IF)		Invitrogen

3.2.8 Tierversuchsmodell

3.2.8.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für alle folgenden Versuche wurden männliche C57/Bl6 Mäuse (*Mus musculus*) verwendet. Die verwendeten Tiere stammen aus dem Zuchtbetrieb Charles River Laboratories, Deutschland. Das Tialter für die Transplantationsversuche betrug 8-10 Wochen. Für die

Applikationsversuche wurden ebenso 8-10 Wochen alte Tiere verwendet. Das Gewicht der Tiere wurde individuell jeweils vor der Applikation ermittelt, um eine genaue Verabreichungsdosis (mg / kg) sicherstellen zu können.

Für die jeweilige Versuchsdauer wurden die Tiere einzeln und unter standardisierten Bedingungen im Tierstall des Uniklinikums Gießen bzw. des Max-Planck Institutes für Herz- und Lungenforschung (Bad Nauheim) gehalten. Die Haltung erfolgte in Makrolonkäfigen. Die Tag-Nacht-Phasen betragen je 12 h pro Tag. Die Fütterung der Tiere erfolgte *ad libitum*, den Tieren stand jederzeit Trinkwasser aus Nippeltränken zur Verfügung.

3.2.8.2 Knochenmarktransplantation bei der Maus

Für die Knochenmarktransplantation wurden C57/Bl6 Männchen verwendet. Zunächst wurden diese für 1 h bei 11 gray γ -Strahlen in der Radiologie in Gießen (Dr. Wallbott) bestrahlt. Der Abstand der Käfige zu den Stäben betrug 95 cm. Die Käfige wurden für die Bestrahlungszeit mittels eines Kartons halbiert, damit die Distanz der Mäuse zu den Stäben definiert werden konnte.

Das Knochenmark wurde aus GFP-Mäusen (Dr. Katrin Ahlbrecht) isoliert. Hierfür wurde ihnen vorerst Heparin in isotonischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert (100 μ l, 1:5), nach 15 min wurden sie mit einer Überdosis Isofluran getötet und ausgeblutet. Anschließend wurden die Tiere fixiert und die hinteren Extremitäten abgetrennt. Die Knochen der Extremitäten wurden von Muskel- und Fettgewebe befreit und in Falconröhrchen mit Medium (DMEM + 1 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin) gegeben (auf Eis).

Unter sterilen Bedingungen wurde dann das Knochenmark isoliert. Es erfolgte die Abtrennung der Kondylen und das Spülen des Knochenschafts mit Medium über eine Kanüle, um das Knochenmark zu lösen. Anschließend wurde das Knochenmark mit Medium 5 min bei 800 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen erneut in Medium resuspendiert und auf einen Zellfilter (40 μ m-Poren) gegeben, um große Partikel zu entfernen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation unter den genannten Bedingungen. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellen gezählt.

4 h nach der Bestrahlung der C57/Bl6 Mäuse wurden je 3 Millionen Knochenmarkzellen in die Schwanzvene der Tiere injiziert. Hierfür wurden die Mäuse auf einer Wärmeplatte (30 °C) fixiert. Während der weiteren Haltung erfolgte für 10 Tage eine Zugabe von Baytril®

(Breitbandantibiotikum) im Trinkwasser (1 ml / 250 ml). Somit wurde eventuellen Infektionen entgegengewirkt.

3.2.8.3 Hypoxie-Modell

Es wurden zwei Hypoxiestudien durchgeführt. In der ersten Studie (Abbildung 8) sollte der präventive und therapeutische (reverse remodeling) Effekt von Imatinib während 5-wöchiger Hypoxie untersucht werden. Hierbei erfolgte vor der Hypoxie eine Knochenmarktransplantation von GFP-Mäusen in bestrahlte C57/Bl6 Tiere (Abschnitt 3.2.8.2).

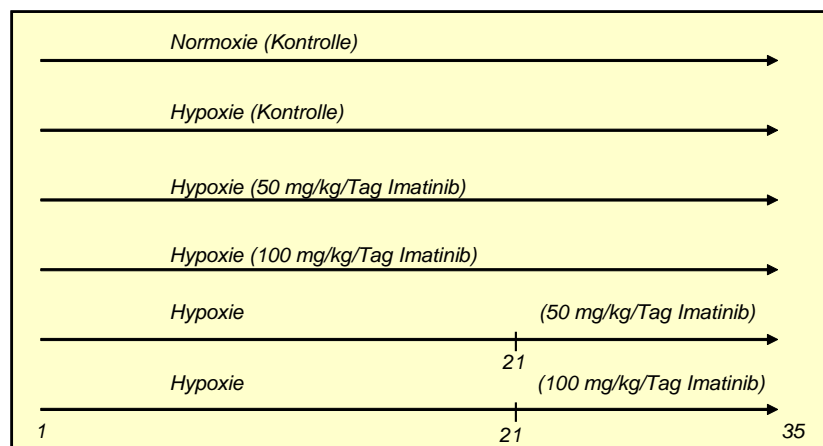


Abbildung 8: Behandlungsgruppen für den 5-wöchigen Imatinibversuch.

Die Tiere (C57/Bl6) wurden für 35 Tage in Hypoxie bzw. Normoxie gehalten und wie angegeben behandelt. Die Verabreichung des Wirkstoffes bzw. des Wassers erfolgte per Schlundsonde. Dieser Versuch erfolgte mit der freundlichen Genehmigung von Herrn Prof. Norbert Weissmann in Gießen.

In der zweiten Studie (Abbildung 9) wurde der präventive Effekt von Imatinib während 3-wöchiger Hypoxie untersucht; hierfür erfolgte keine Knochenmarkstransplantation.

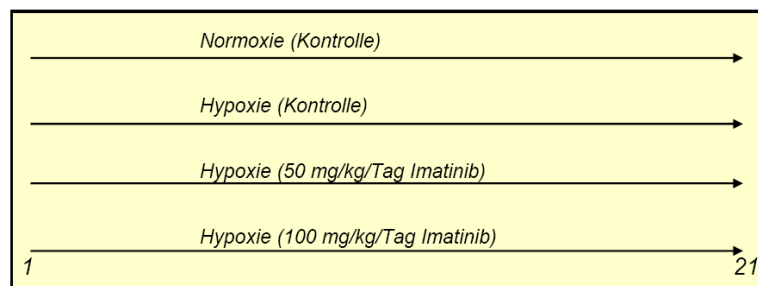


Abbildung 9: Behandlungsgruppen für den 3-wöchigen Imatinibversuch.

Die Tiere (C57/Bl6) wurden für 21 Tage in Hypoxie bzw. Normoxie gehalten und wie angegeben behandelt. Die Verabreichung des Wirkstoffes bzw. des Wassers erfolgte per Schlundsonde.

Die Mäuse wurden, bis auf die normoxische Kontrollgruppe, während des Versuchs unter kontrollierten Bedingungen in einer Hypoxiekammer (Vinylhypoxiekammer, 10 % O₂, COY laboratory products, Michigan, USA, Abbildung 10) gehalten.

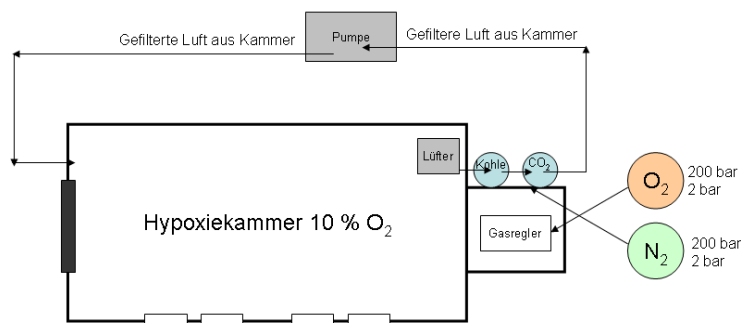


Abbildung 10: Hypoxiekammer.

In der oberen Abbildung ist die verwendete Hypoxiekammer abgebildet. In der unteren Abbildung ist eine schematische Darstellung der Kammer und des Prinzips der Kohlendioxidabsorption dargestellt. Über eine Pumpe wurde die veratmete Kohlendioxid angereicherte Luft aus der Kammer transportiert. Hierbei wurde diese über einen Aktivkohlefilter und einen Kohlendioxidabsorber gepumpt. Die gereinigte Luft wurde anschließend wieder in die Kammer gepumpt. Ein Sauerstoffsensor in der Kammer sorgte für die Messung des Gasgehaltes in der Kammer. Über einen Gasregler wurden die 10 % Sauerstoff exakt reguliert. Als Hintergrundgas diente Stickstoff. Die Applikation der Wirkstoffe und die Säuberung der Käfige erfolgten in der Kammer.

3.2.8.4 Hämodynamische Messung

Bei der hämodynamischen Messung erfolgte kontinuierlich die Aufzeichnung verschiedener Drücke. Zunächst wurden die Tiere 1-2 min im Narkosekasten in Narkose überführt. Dies erfolgte über ein 5 %iges Isofluran-Luft-Sauerstoff-Gemisch. Anschließend wurden sie an eine Atemmaske überführt und das System mit einem 1,5-2,0 %igen Isofluran-Luft-Sauerstoffgemisch (RUS-1321-RA, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland) geflutet. Die Mäuse atmeten das Gemisch unter Spontanatmung

selbstständig ein, dies diente dem Erhalt der Narkose. Mit Hilfe einer Wärmeplatte wurde die physiologische Körpertemperatur von 37-38 °C aufrechterhalten. Nach der Durchführung eines Reflextests, zur Überprüfung der Narkose und dem Anlegen des Elektrokardiogramms (EKG), wurde ein Millar-Katheter (1.4 F, SPR-671, FMI Föhr Medical Instruments GmbH) zunächst in die rechte *V. jugularis* und dann in den rechten Ventrikel eingeführt. Es folgte die kontinuierliche Aufzeichnung des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVPsys). Anschließend wurde der Katheter aus dem rechten Ventrikel entfernt und in die rechte *A. carotis* eingeführt. Hier erfolgte die Messung des systemisch-arteriellen Drucks (SAP). Über das Echokardiogramm (EKG) wurde die Herzfrequenz (HR) gemessen. Abschließend wurden der Katheter und das EKG entfernt, das Isofluran auf 5 % hochreguliert und der Thorax eröffnet. Es folgte die intrakardiale Blutentnahme zur Serumgewinnung. Alle hämodynamischen Messungen wurden mit dem PowerLab System und der Chart 6.0 Software durchgeführt (ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland). Die Erfassung der hämodynamischen Daten erfolgte durch Frau Dr. med. vet. Wiebke Janssen. Des Weiteren wurden eine Perfusion der Lunge und die Organentnahme durchgeführt.

3.2.8.5 Lungen- / Herzentnahme und Probenvorbereitung für histologische Färbung

Für die Entnahme der Lungen wurden die Mäuse zunächst mit einer Überdosis Isofluran getötet. Anschließend wurde ein Hautschnitt vom Abdomen zum Thorax durchgeführt und das Abdomen eröffnet. Es erfolgte das Durchtrennen des Diaphragmas und des *Sternums* medial bis zur Klavikula. Die Rippenbögen wurden auseinandergespreizt und seitlich fixiert. Zudem wurde die Trachea freigelegt und über einen Schnitt eine Kanüle eingeführt. In den rechten Ventrikel wurde ein Herzkatheter eingeführt und über das Herz die Lunge mit PBS blutfrei gespült (20 cm Wassersäule). Anschließend wurden die Lunge über die Trachea mit 1% PFA in PBS gebläht (10 cm Wassersäule) und die Atemwege fixiert (20-30 min). Ebenso wurde über das rechte Herz das Gefäßsystem der Lunge mit 1 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Lunge und das Herz aus dem Thorax entnommen und die Lunge nach Abtrennen des Herzens über Nacht in 1 % PFA bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Lungen in PBS bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt (3.2.5.1).

3.2.8.6 Bestimmung des Verhältnisses zwischen dem rechten Ventrikel und linkem Ventrikel + Septum (RV/LV+S) als Maßstab für die Rechtsherzhypertrophie

Für die Bestimmung des Verhältnisses zwischen dem rechten und linken Ventrikel mit Septum wurden zunächst beide Herzohren abgetrennt und der rechte Ventrikel vom linken vorsichtig separiert. Anschließend wurden der rechte sowie der linke Ventrikel + Septum bei 40 °C für 1½ h und dann über Nacht bei 60 °C im Inkubator getrocknet und das Trockengewicht bestimmt bzw. zuvor sofort das Nassgewicht bestimmt.

3.2.8.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Graph Pad Prism 5 Software verwendet. Es wurden die 1-way ANOVA mit Student-Newman-Keuls post hoc-Test bzw. Students T-TEST mit Welsh-Korrektur angewendet. Alle Werte mit einer Irrtums-Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Immunologische Charakterisierung von zirkulierenden Fibrozyten von Mensch

In den nachfolgenden Experimenten erfolgte die Charakterisierung der zirkulierenden Fibrozyten. Hierfür wurden mononukleäre Zellen aus humanem isoliert und kultiviert. Bereits nach 3 Tagen waren die Zellen adhären und zeigten nach 7 Tagen eine heterogene, spindelartige bzw. sternartige Morphologie (Abbildung 11).

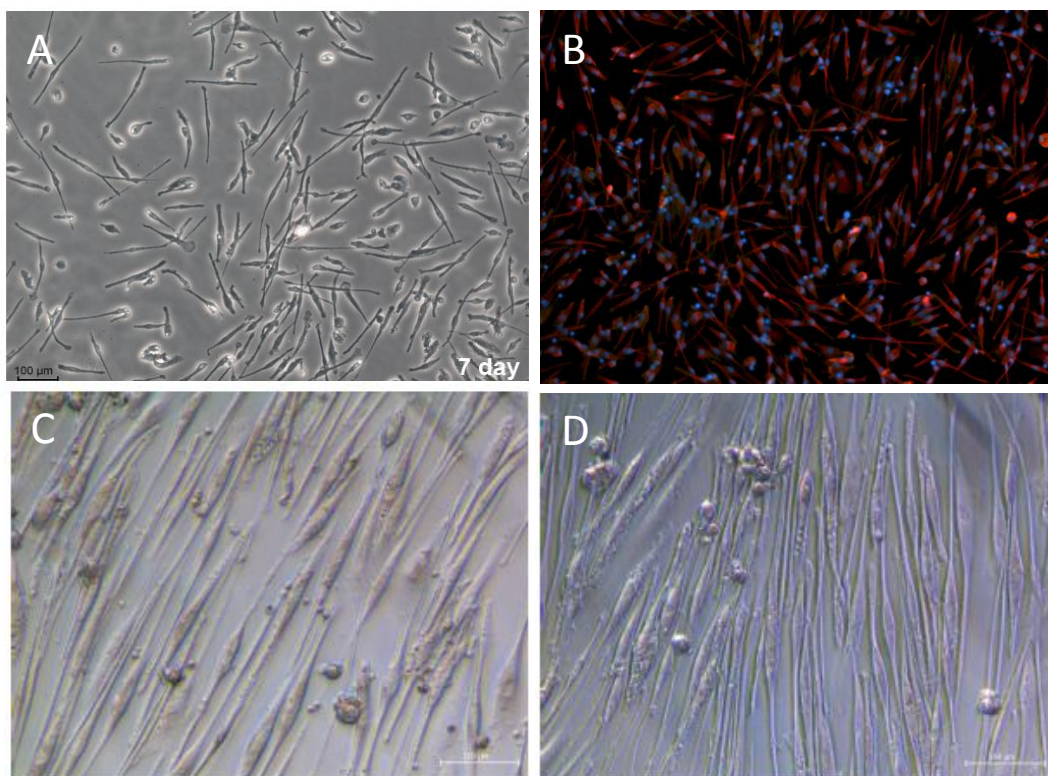


Abbildung 11: Morphologie von humanen zirkulierenden Fibrozyten nach 7 (A und B) und 28 Tagen (C und D) Kultur.

Die Zellen wurden aus humanen Buffy coats isoliert und kultiviert. A und B) Bereits nach 7 Tagen zeigten sie ihre typische spindelartige Form und exprimierten den mesenchymalen Marker Vimentin. C und D) Nach 28 Tagen erreichten die Zellen zum Teil Konfluenz. Vergrößerung 10 x (A) bzw. 40 x (A, C und D).

Humane Fibrozyten wiesen sowohl mesenchymale (Vimentin, Kollagen 1 und Prolyl-4-Hydroxylase) als auch hämatopoetische Marker (CD45, CD11b) auf (Abbildung 12).

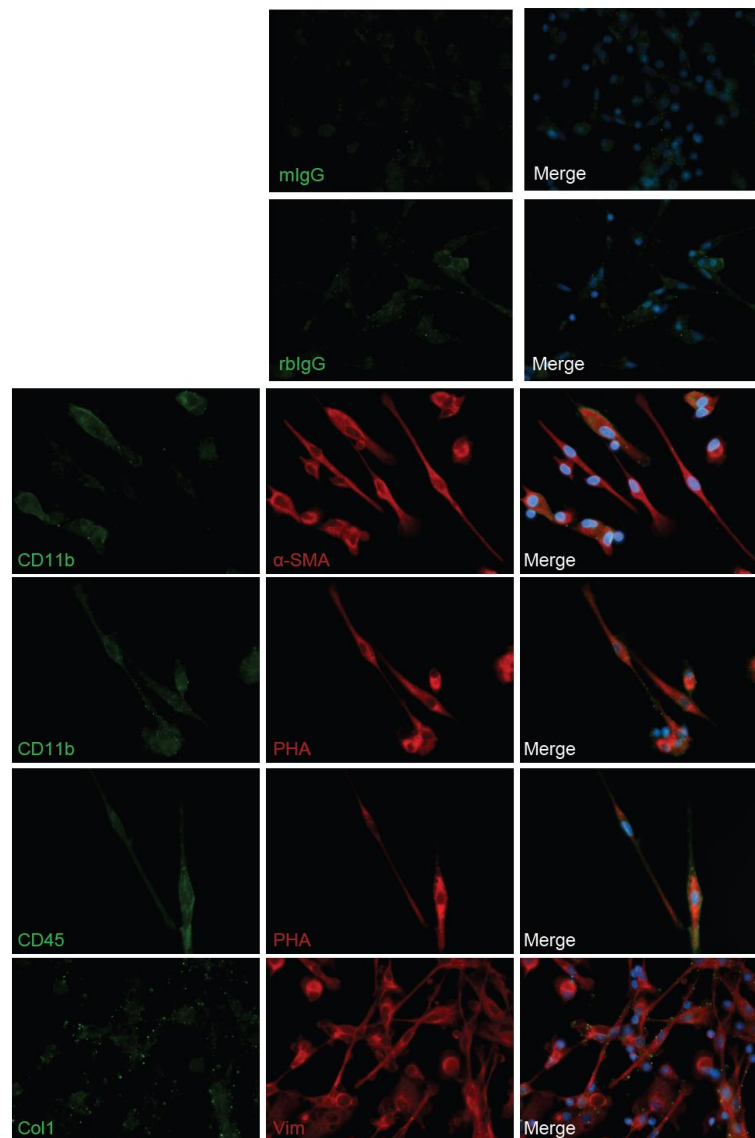


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von mesenchymalen und hämatopoetischen Markern auf humanen zirkulierenden Fibrozyten (7 Tage alt).

PBMC wurden in 8 Well Glas chamber slides (5×10^5 Zellen /well) kultiviert, fixiert und für CD11b, Vimentin, CD45, Prolyl-4-hydroxylase (PHA) und Kollagen gefärbt. Als negative Kontrolle diente Kaninchen bzw. Maus IgG, die Kerne wurden mit Dapi gefärbt. Vergrößerung 25 x.

Ein weiterer Aspekt für die detailliertere Charakterisierung von humanen zirkulierenden Fibrozyten war der Nachweis des CXC-Rezeptors 4 (CXCR 4). Hierfür wurden 7 Tage alte Fibrozyten immunologisch gefärbt (Abbildung 13). Der Chemokinrezeptor konnte auf der Zelloberfläche und an den Adhäsionsstellen der Zellen identifiziert werden (Abbildung 13).



Abbildung 13: Expression von CXCR4 auf humanen zirkulierenden Fibrozyten. 8 Tage alte zirkulierende Fibrozyten wurden in 8 Well Glas chamber slides (5×10^5 Zellen /well) kultiviert, fixiert und immunologisch gegen Vimentin, CXCR4 gefärbt. Die Kerne wurden mit Sytox blue(blau) dargestellt. Vergrößerung 25 x.

Über Immunfluoreszenzfärbungen sollte ebenso der Nachweis der PDGF-Rezeptoren auf zirkulierenden Fibrozyten erbracht werden. Jedoch konnte der Rezeptor β nicht und der Rezeptor α nicht ausreichend unter den herrschenden Bedingungen (7 Tage Kultur) auf diesem Zelltyp durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Als Kontrolle für die verwendeten Antikörper wurden humane glatte Muskelzellen aus Pulmonalarterien für beide Rezeptoren gefärbt (Abbildung 14). Bei glatten Muskelzellen konnte der PDGFR α und α -Smooth muscle Actin per Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

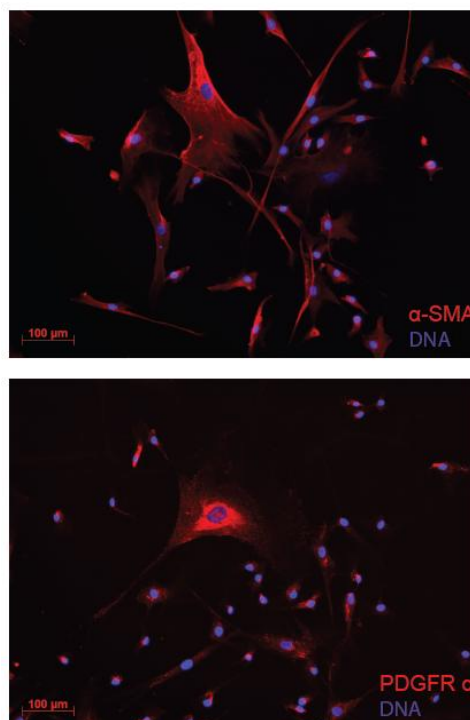


Abbildung 14: Charakterisierung von humanen glatten Muskelzellen aus Pulmonalarterien. Die glatten Muskelzellen zeigten typische Marker, wie α -Smooth muscle Actin (α SMA) und den PDGF-Rezeptor α (PDGFR α).

4.2 Molekulare Charakterisierung humaner zirkulierender Fibrozyten

Es folgte die Identifizierung weiterer neuer Moleküle, welche zur näheren Charakterisierung beitragen könnten. Hierfür wurde die Expression verschiedener Rezeptortyrosinkinasen untersucht. Auf mRNA-Ebene konnte die Expression der Tyrosinkinasen PDGFR β , KDR (VEGFR2), ABL und c-KIT nachgewiesen werden (Abbildung 15). Außerdem konnte die Expression vom KIT-Liganden nachgewiesen werden (Abbildung 15).

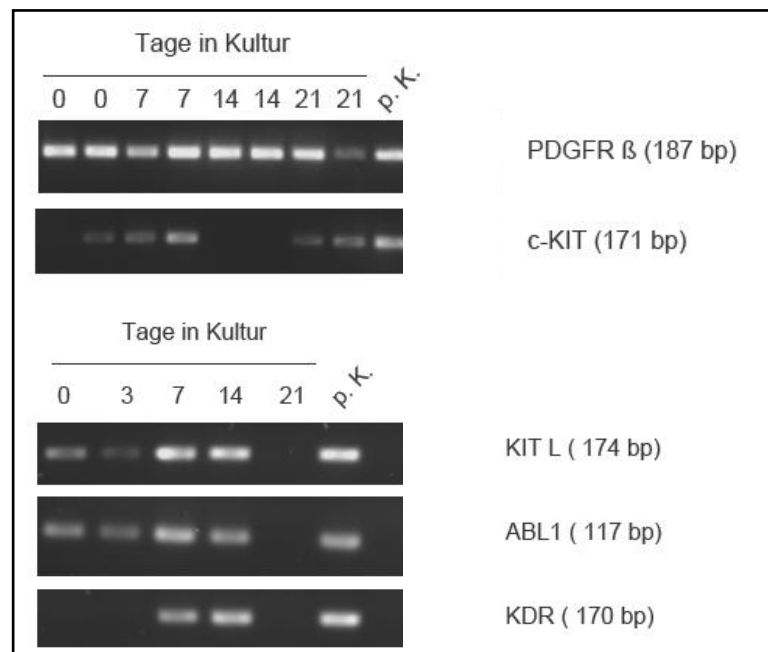


Abbildung 15: Expressionsprofil von Rezeptortyrosinkinasen und Liganden auf humanen zirkulierenden Fibrozyten.

RT-PCR von 0-21 Tage alten humanen Zellen, p.K. = Positivkontrolle.

Für die Analyse der Expression von Rezeptortyrosinkinasen auf Proteinebene ergaben sich folgende Ergebnisse für zirkulierende Fibrozyten: Nach drei- bzw. siebentägiger Kultur der PBMCs und Reinheitsprüfung der Fibrozyten konnte die Expression des PDGF Rezeptors α und β , sowie des VEGF Rezeptors 2 gezeigt werden (Abbildung 16). Als Kontrolle diente humanes Lungenarterien- bzw. Lungengewebehomogenat.

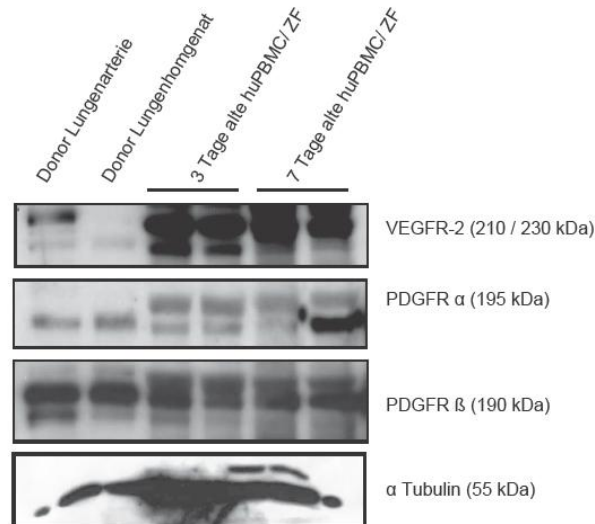


Abbildung 16: Expression verschiedener Rezeptortyrosinkinasen auf Proteinebene. Western Blots von 3 und 7 Tage alten Zellen. Als Kontrolle diente humane Lungenarterie bzw. Lungenhomogenat.

Zur Überprüfung des Einflusses von sekretierten Faktoren (Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren) der Fibrozyten auf die Proliferation von humanen glatten Muskelzellen wurde konditioniertes Medium hergestellt, und mit diesem die humanen glatten Muskelzellen aus Pulmonalarterien behandelt. Hierbei ergab sich, dass dieses Medium, im Vergleich zur Kontrolle (338.9 ± 11.52 cpm/mg, nicht konditioniertes Fibrozytenmedium), zu einem Anstieg der Proliferationsrate glatter Muskelzellen führt (Abbildung 17). Konditioniertes Medium, welches 24 h auf Fibrozyten konditioniert wurde, führte zu einem Anstieg der Proliferation von glatten Muskelzellen (1218 ± 70.77 cpm/mg). Dieser proliferative Effekt wurde nach 48 h Konditionierung des Mediums auf Fibrozyten noch verstärkt (2076 ± 171.8 cpm / mg).

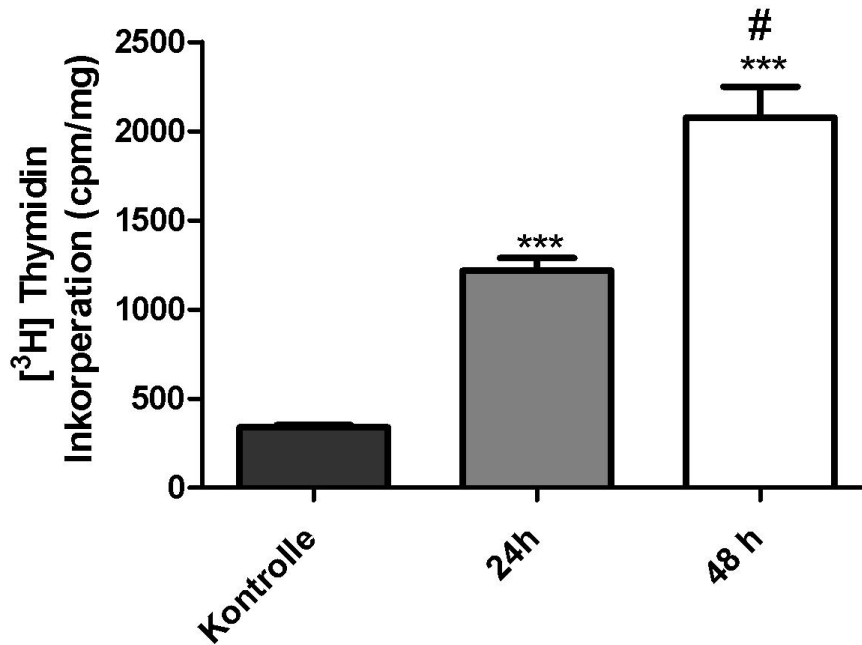


Abbildung 17: Konditioniertes Medium von zirkulierenden Fibrozyten beeinflusst die Proliferation von huPASCs.

Als Kontrolle wurde nicht konditioniertes Fibrozytenmedium verwendet. (*** $p < 0,001$, jeweilige Gruppe versus Kontrolle, # $p < 0,05$, 24 h versus 48 h, $n = 3$, je 6 Replikate).

Des Weiteren wurde der Einfluss von Imatinib auf die parakrinen, pro-proliferativen Effekte der zirkulierenden Fibrozyten getestet. Hierbei wurden humane pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen bzw. Fibroblasten aus der Adventitia mit konditioniertem Medium von Fibrozyten, welche zu diesem Zweck mit oder ohne Imatinib behandelt wurden, inkubiert (Abbildung 18). Für die glatten Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass das konditionierte Medium (2232 ± 107.0 cpm/mg), im Vergleich zur Kontrolle (914.9 ± 50.15 cpm/mg, nicht konditioniertes Fibrozytenmedium), die Proliferation signifikant stimulierte (Abbildung 18 A). Dieser aktivierende Effekt konnte durch die Gabe von Imatinib signifikant inhibiert werden, wobei sowohl $1 \mu\text{M}$ Imatinib (1228 ± 101.6 cpm/mg) als auch $5 \mu\text{M}$ (1033 ± 92.73 cpm/mg) die Proliferation der Muskelzellen stark inhibierte. Ein ähnlicher Effekt konnte für die Fibroblasten, welche mit konditioniertem Medium behandelt wurden, festgestellt werden (Abbildung 18 B). Im Vergleich zum Kontrollmedium (1735 ± 51.14 cpm/mg), stieg die Proliferation signifikant nach Behandlung mit konditioniertem Medium an (4390 ± 315.1 cpm/mg). Die Gabe von Imatinib auf die Fibrozyten, während der Herstellung des konditionierten Mediums, führte zur Herabregulation der Proliferation in Fibroblasten. Sowohl $1 \mu\text{M}$ (2704 ± 391.0 cpm/mg), als auch $5 \mu\text{M}$ (2403 ± 232.3 cpm/mg) zeigten einen inhibitorischen Effekt auf die Fibroblasten-Proliferation (Abbildung 18 B).

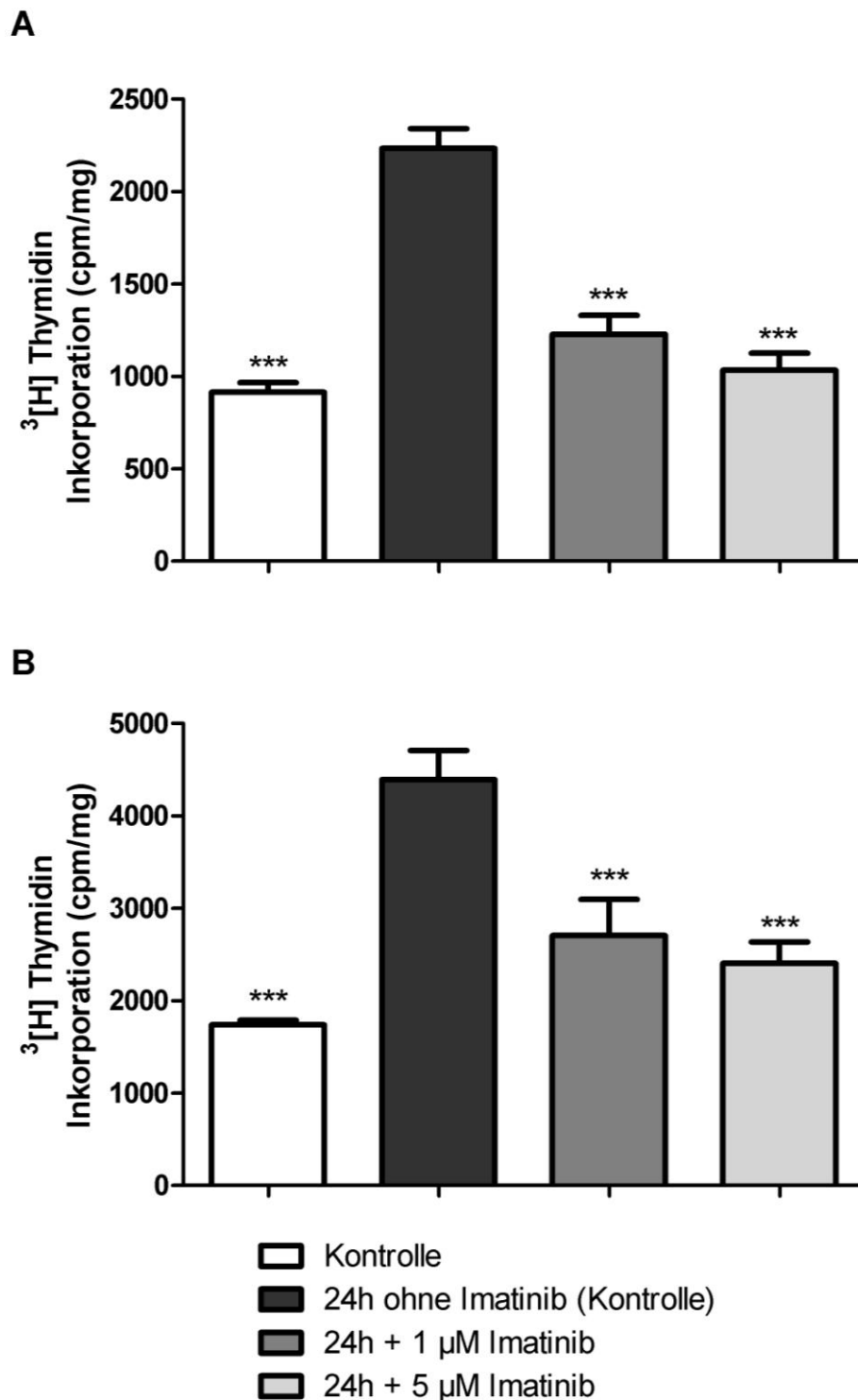


Abbildung 18: Imatinib inhibiert dosisabhängig die parakrine Stimulation der Proliferation von huPASCs und Fibroblasten der Adventitia durch konditioniertes ZF Medium *in vitro*. Zirkulierende Fibrozyten wurden 7 Tage kultiviert und anschließend auf ihnen konditioniertes Medium für 24 h mit und ohne Imatinib hergestellt. A) Proliferationsassay auf humanen PASCs. B) Proliferationsassay auf humanen Fibroblasten aus der Lungenadventitia. Als Kontrolle wurde nicht konditioniertes Fibrozytenmedium verwendet. (*** $p < 0,001$, jeweilige Gruppe versus 24 h ohne Imatinibbehandlung (Kontrolle), $n = 3$ (je 4 Replikate)).

4.3 Stereologische Quantifizierung der Gefäßmuskularisierung bei hypoxischen Mäusen

Nach der Charakterisierung der zirkulierenden Fibrozyten *in vitro* erfolgten verschiedene *in vivo* Experimente. Nach 5-wöchiger Hypoxie- bzw. Normoxie-Exposition der Tiere mit jeweiliger Medikation (Abbildung 8) wurden die Gefäße der Lungen stereologisch vermessen und verglichen. Hierfür wurden das Endothel (Von-Wille-Brandt-Faktor) und die glatte Muskulatur (Smooth muscle Actin) der Gefäße gefärbt (Abbildung 19). Aus der stereologischen Vermessung des Muskularisierungsgrades der pulmonalen Widerstandsgefäße mit einem Durchmesser von 20-50 μm ging hervor, dass ein signifikanter Anstieg der Media in der hypoxischen Kontrollgruppe im Vergleich zu den behandelten Tieren auftrat (Abbildung 19). Bei normoxischen Tieren lag die muskularisierte Fläche pro Gefäß im Durchschnitt bei $3,64 \pm 0,74 \mu\text{m}^2$, in den hypoxischen Kontrolltieren bei $11,29 \pm 1,98 \mu\text{m}^2$. Diese erhöhte Muskularisierung konnte in allen Behandlungsgruppen mit Imatinib signifikant reduziert werden (Abbildung 19). In den Imatinib-Behandlungsgruppen lag die durchschnittliche muskularisierte Fläche bei $4,03 \pm 1,45$ (50 mg/kg Imatinib) bzw. $5,95 \pm 2,66 \mu\text{m}^2$ (100 mg/kg Imatinib, Abbildung 19). Ebenso konnte eine Reduzierung der Rechtsherzhypertrophie in den mit Imatinib behandelten Tieren beobachtet werden (Abbildung 19). In den hypoxischen Kontrolltieren erhöhte sich die RV/LV+S Ratio von $0,35 \pm 0,02$ (Normoxie) auf $0,52 \pm 0,02$ (Hypoxie). Dieser Anstieg der RV/LV+S Ratios konnte durch die Behandlung mit Imatinib in den 2 präventiven und einer therapeutischen Behandlungsgruppen signifikant auf $0,32 \pm 0,07$ bis $0,40 \pm 0,04$ reduziert werden. Keine signifikante Verbesserung der Rechtsherzhypertrophie wurde in der Tiergruppe erlangt, welche therapeutisch für zwei Wochen mit einer Dosis von 100 mg/kg/Tag Imatinib behandelt wurde ($0,45 \pm 0,08$).

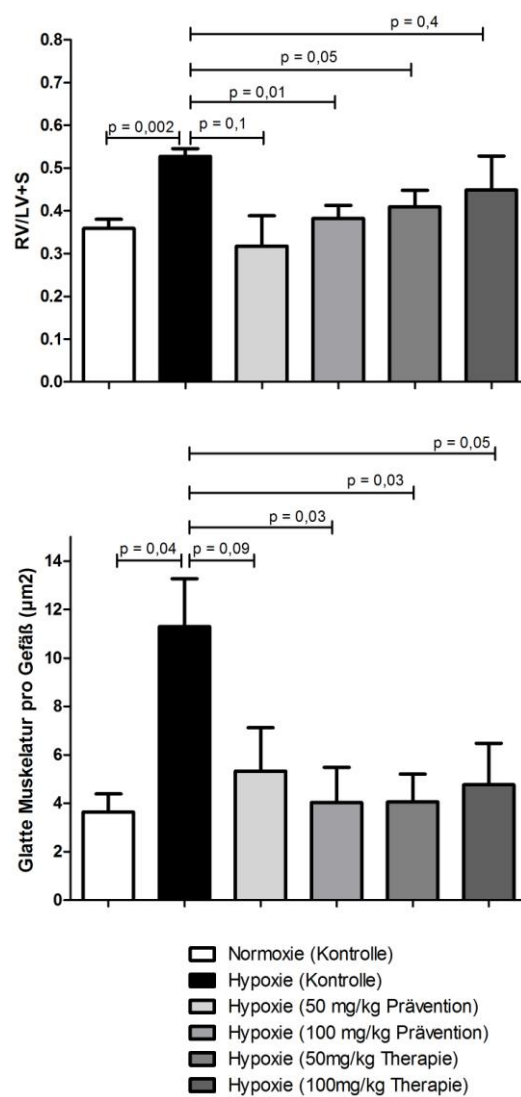
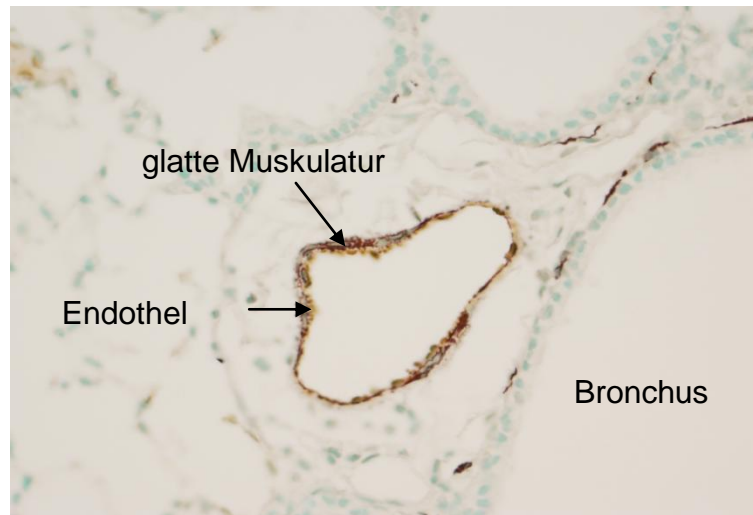


Abbildung 19: Stereologische Vermessung der Muskularisierungsfläche pro Gefäß. Färbung des Endothels (vWF; braun), der glatten Muskulatur (SMA; rot) und der Zellkerne (blau). Stereologische Vermessung der Gefäßmuskularisierung und der Rechtsherzhypertrophie (RV/LV+S). Die Zahlen geben die P-Werte an, n = 4.

4.4 Identifizierung und Lokalisierung von zirkulierenden Fibrozyten *in vivo*

Nach der Ermittlung der Muskularisierungsdaten und der Auswirkung der Hypoxie bzw. Imatinib-Behandlung in Hypoxie erfolgte die Quantifizierung der zirkulierenden Fibrozyten in Gefäßnähe. Bei den hier betrachteten Tiergruppen handelte es sich um Tiere, welche vor dem Hypoxieversuch eine Knochenmarktransplantation mit Mark von konstitutiv generalisiert GFP-exprimierenden Tieren erfahren hatten. Die Lungen wurden gegen GFP und Prokollagen 1a1 Immunfluoreszenz-gefärbt (Abbildung 20). Es wurden, wie für die stereologischen Vermessungen, Gefäße mit einem Durchmesser von 20-50 μm analysiert. Mit Hilfe dieser Doppelfärbung konnten sowohl der hämatopoetische Ursprung der Zellen, sowie die Expression eines mesenchymalen Markers dargestellt werden.

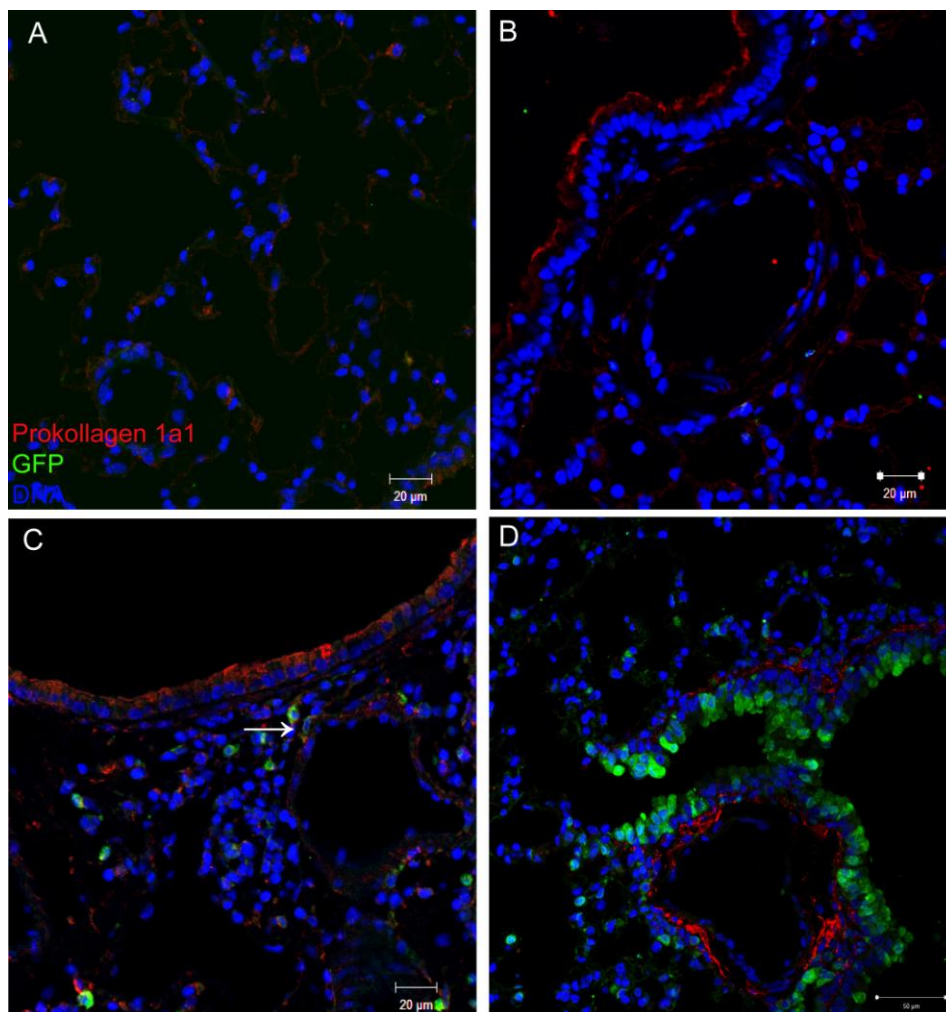


Abbildung 20: Identifizierung von GFP/ Prokollagen 1A1 positiven Zellen in hypoxischen Mäuselungen (Konfokalmikroskopie).

A) Normoxische Kontrolle, B) Hypoxische Behandlungsgruppe (100 mg/kg), C) Hypoxische Kontrolle, D) GFP-Maus (positiv Kontrolle). Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten mit Prokollagen 1A1 (rot) und GFP-FITC (grün), als Kernfarbstoff wurde Sytox blue verwendet. Doppelt positive Zellen wurden als zirkulierende Fibrozyten (Pfeil) charakterisiert.

Ebenso wurde die Anzahl von Zellen bestimmt, welche nur die Expression von GFP und Prokollagen 1a1 zeigten (Abbildung 21). Es konnte ein signifikanter Anstieg an doppelt-positiven Zellen in der hypoxischen Kontrollgruppe ($1,60 \pm 0,20$ Zellen/Gefäß) im Vergleich zu normoxischen Kontrollgruppe ($0,37 \pm 0,09$ Zellen/Gefäß) festgestellt werden (Abbildung 21). In allen Imatinib-Behandlungsgruppen wurde eine Reduzierung der doppelt-positiven Zellen festgestellt ($0,37 \pm 0,10$ bis $0,54 \pm 0,13$ Zellen/Gefäß) (Abbildung 21). Für die GFP-positiven, Kollagen I-negativen Zellen, welche hämatopoetische Zellen mit Knochenmarkursprung darstellen, konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg an rekrutierten Zellen/Gefäß in der hypoxischen Kontrollgruppe bestimmt werden. Im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe stieg die Anzahl der GFP-positiven Zellen von $1,53 \pm 0,19$ Zellen/Gefäß auf $2,82 \pm 0,29$ Zellen/Gefäß an (Abbildung 21). Dieser Anstieg wurde signifikant in allen Gruppen (präventiv und therapeutisch) durch die Behandlung mit Imatinib verhindert bzw. rückgängig gemacht. In allen Behandlungsgruppen reduzierte sich die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Gefäßnähe auf $1,18 \pm 0,18$ bis $1,81 \pm 0,31$ Zellen/Gefäß. Des Weiteren wurde die Anzahl an Prokollagen 1a1-positiven, GFP negativen Zellen untersucht. Hierbei kann es sich um ortsständige Fibroblasten handeln. Es konnte ein signifikanter Anstieg an Prokollagen 1a1-positiven Zellen/Gefäß in der hypoxischen Kontrollgruppe dargestellt werden. Hier lag die Anzahl an positiven Zellen bei durchschnittlich $3,06 \pm 0,21$ Zellen/Gefäß, im Vergleich zur normoxischen Gruppe ($1,66 \pm 0,18$ Zellen/Gefäß). Dieser Anstieg konnte nur in den therapeutisch behandelten Tiergruppen signifikant reduziert werden (Abbildung 21). Hier lag die Anzahl der Prokollagen 1a1-positiven Zellen /Gefäß bei durchschnittlich $1,64 \pm 0,13$ bis $1,80 \pm 0,19$. In den präventiv behandelten Gruppen lag die Anzahl an Prokollagen 1a1-positiven Zellen in Gefäßnähe zwischen $2,60 \pm 0,15$ bis $2,85 \pm 0,21$. Zur Darstellung des Verhältnisses zwischen Prokollagen-positiven Zellen und Prokollagen/GFP-positiven Zellen wurden die Daten gegenübergestellt (Abbildung 21), um einen Vergleich der ortsständigen Fibroblasten (mesenchymale Zellen) und rekrutierten zirkulierenden Fibrozyten zu erhalten (Abbildung 21). In der Normoxie-Kontrollgruppe konnten 4,4-mal so viele Prokollagen 1a1-positive Zellen, im Vergleich zu doppelt positiven Zellen gefunden werden. In der hypoxischen Kontrollgruppe waren es nur noch 1,9-mal so viele Zellen. In der präventiv behandelten hypoxischen Imatinib-Gruppe (50 mg/kg) lag die Rate bei 5,2-mal so vielen Zellen. In der 100 mg/kg Imatinib präventiv

behandelten Gruppe wurden 6,9-mal so viele Prokollagen-positive Zellen ermittelt. In den therapeutisch behandelten Imatinib-Gruppen sank die Rate auf 3,8-4,4.

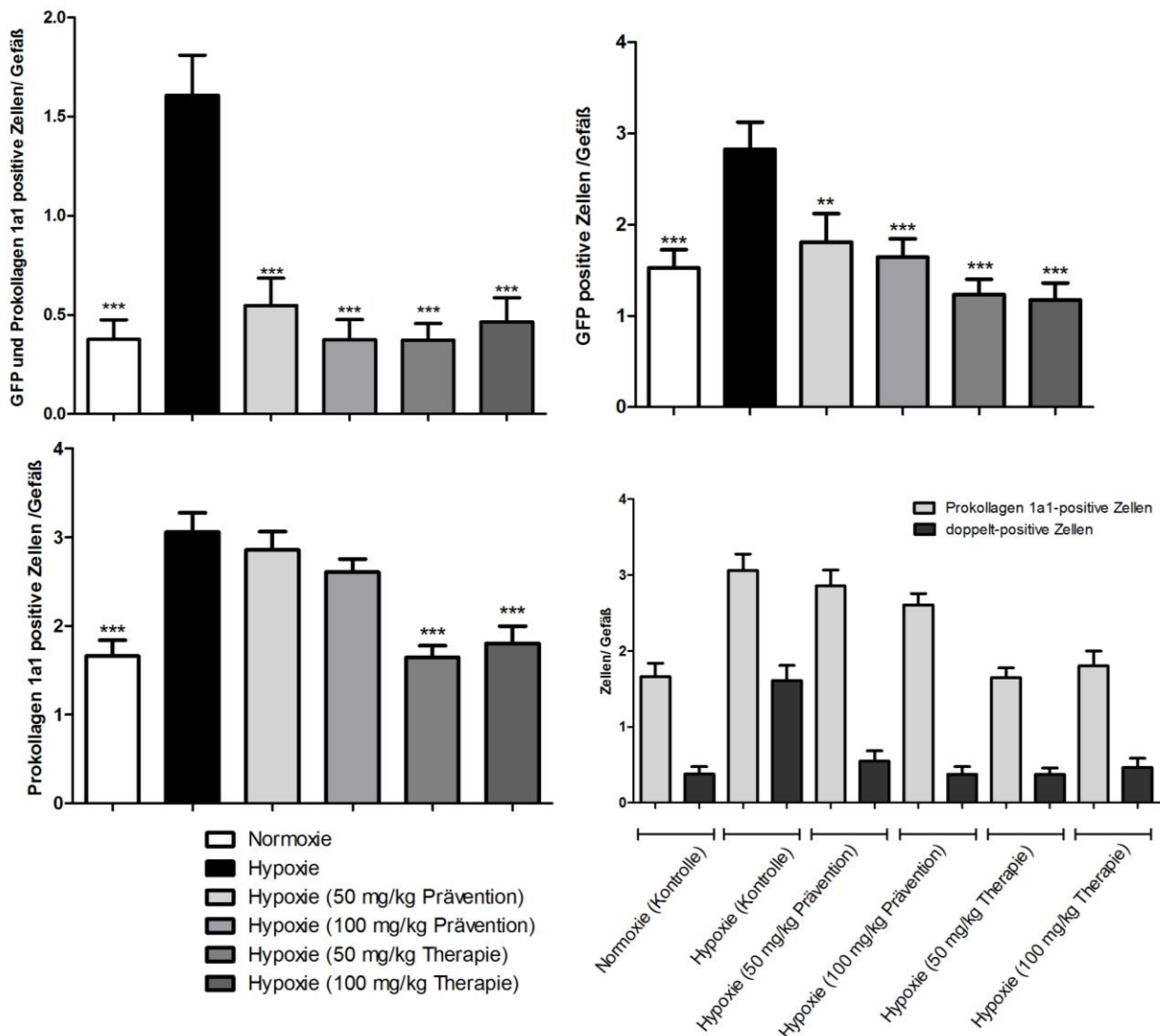


Abbildung 21: Quantifizierung von doppelt positiven Zellen (Prokollagen 1a1 und GFP) in hypoxischen Mäuselungen.

In den Graphen sind die Prokollagen /GFP- positiven (Fibrozyten), GFP-positiven (Leukozyten) und Prokollagen-positiven (residente Fibroblasten) Zellen/Gefäß dargestellt. Des Weiteren wurde das Verhältnis von doppelt positiven und Prokollagen-positiven Zellen dargestellt. (**, $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, jeweilige Gruppe versus Hypoxiekontrolle, $n = 4$, 14 Gefäße / Tier vermessen).

4.5 Hämodynamische Messung in präventiv behandelten Hypoxietieren

Innerhalb eines zweiten *in vivo* Hypoxieversuchs wurden unter anderem hämodynamische Messungen, sowie Untersuchungen der Lungen auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt. Innerhalb dieses Versuchs wurde keine Knochenmarktransplantation durchgeführt. Die Tiere wurden 3 Wochen normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen

exponiert und von Beginn der Studie an mit Imatinib bzw. Wasser (Kontrolle) behandelt (Abbildung 9). Zur Überprüfung der Effektivität des verwendeten Hypoxie-Modells (10 % Sauerstoff) wurde die Hämodynamik gemessen (Frau Dr. med. vet. Wiebke Janssen). Hierdurch konnte ausgeschlossen werden, dass sich das verwendete Modell auch auf den systemischen Kreislauf in den Tieren auswirkt.

Der systolische Blutdruck (SBP sys) war in allen vier Vergleichsgruppen vergleichbar (ca. 100 mmHg), ebenso konnten keine Unterschiede in der Herzfrequenz (HR) festgestellt werden. Diese betrug im Durchschnitt 480 Schläge/ Minute. Der rechtsventrikuläre enddiastolische Druck (RVEDP) war ebenso nicht signifikant verändert (Daten nicht gezeigt). Bei den hypoxischen Kontrolltieren konnte die Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie ($0,33 \pm 0,02$), im Vergleich zur normoxischen Tieren ($0,20 \pm 0,01$) beobachtet werden. Im Vergleich zu der 50 mg/kg behandelten Imatinibgruppe ($0,28 \pm 0,01$) ergab sich keine signifikante Verbesserung des RV/LV+S-Verhältnisses (Abbildung 22). Der Vergleich zwischen der hypoxischen Kontrollgruppe zur hypoxischen Imatinibgruppe mit einer 100 mg/kg Dosis führte zu einer signifikanten Reduzierung der Rechtsherzhypertrophie ($0,24 \pm 0,02$). Hinsichtlich des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVP sys) konnte ein Anstieg bei den hypoxischen Kontrolltieren ($34,12 \pm 1,14$ mmHg) im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen ($27,27 \pm 1,17$) detektiert werden (Abbildung 22). Dieser Effekt wurde durch die Gabe von 100 mg/kg Imatinib rückgängig gemacht ($30,48 \pm 0,93$). Eine Dosis von 50 mg/kg Imatinib ergab keinen signifikanten Effekt ($35,60 \pm 2,61$).

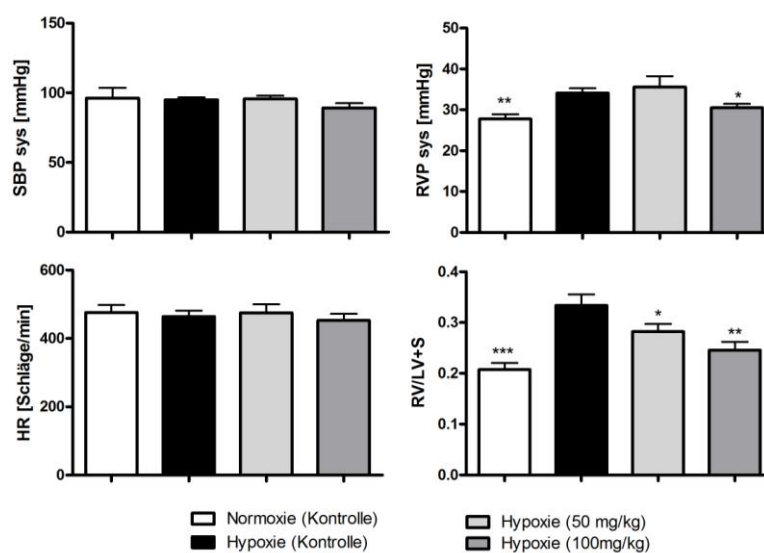


Abbildung 22: Hämodynamische Messung von Hypoxie induzierten PH Mäusen.

Die Graphen zeigen den systolischen Blutdruck (SBP sys), die Herzfrequenz (HR), den rechtsventrikulären systolischen Druck (RVP sys) und die Rechtsherzhypertrophie (RV/LV+S). (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, jeweilige Gruppe versus Hypoxiekontrolle, $n = 5-10$).

4.6 Quantifizierung von PH-relevanten Rezeptoren *in vivo*

Nach der *in vivo* Quantifizierung der hämodynamischen Daten wurden die Lungen in Hinsicht auf die Expression PH-relevanter Faktoren überprüft. Hierfür wurden molekularbiologische Verfahren wie die Real time PCR und Western Blots durchgeführt. Es wurde die Regulation von PDGFR α und β ; CXCR4 sowie ihrer Liganden mittels Real time PCR betrachtet (Abbildung 23). Für PDGFR β und CXCR 4 konnte eine Hochregulation unter Hypoxie festgestellt werden. Dies bedeutete für CXCR4 einen Anstieg des Δ Ct auf 1.840 ± 0.9109 im Vergleich zu normoxischen Bedingungen (Δ Ct -0.8425 ± 0.8682 , Abbildung 23). Während der Behandlung mit Imatinib (100mg/ kg/ Tag Imatinib) ergab sich eine signifikante Reduktion der Expression von CXCR4 auf einen Δ Ct-Wert von -4.737 ± 0.4351 im Vergleich zu den anderen drei Gruppen. Für die 50 mg/ kg/ Tag Imatinib-Gruppe (Δ Ct 2.873 ± 0.1692) konnte im Vergleich zur hypoxischen Gruppe kein Hinweis auf eine verringerte Expression festgestellt werden (Abbildung 23). Für den CXCR4-Liganden (CXCL12) konnte eine signifikante Hochregulation der Expression in den Lungen unter Hypoxie (Δ Ct 5.120 ± 0.1002), sowie den zwei Imatinibbehandlungsgruppen im Vergleich zur Normoxie-Gruppe (Δ Ct 4.258 ± 0.2225) festgestellt werden (Abbildung 23). Hier hatte die Gabe von Imatinib keinerlei Effekte auf die Ligandenexpressionen (Abbildung 23). Für den PDGFR β konnte ebenso wie für CXCR4 ein Anstieg der Expression unter Hypoxie (Δ Ct 5.998 ± 0.1554) im Vergleich zur Normoxie (Δ Ct 3.823 ± 0.4090) festgestellt werden (Abbildung 23). Unter Imatinibbehandlung sank der Expressionsgehalt auf 3.103 ± 0.1185 in der 100mg/kg Imatinib-Gruppe. Hinsichtlich der 50 mg/kg/Tag Imatinib-Gruppe (Δ Ct 6.173 ± 0.2254) konnte kein Effekt im Vergleich zur hypoxischen Gruppe ermittelt werden (Abbildung 23). Innerhalb der PDGF β -Liganden Betrachtung konnten keinerlei Unterschiede zwischen den vier Gruppen festgestellt werden (Abbildung 23). Die Expression des PDGF-Rezeptors α und dessen Liganden lag in allen vier Gruppen unverändert vor (Abbildung 23); der Effekt der Hypoxie sowie von Imatinib schienen keinen Einfluss auf das Expressionsverhalten dieses Rezeptors und seinen Liganden auszuüben.

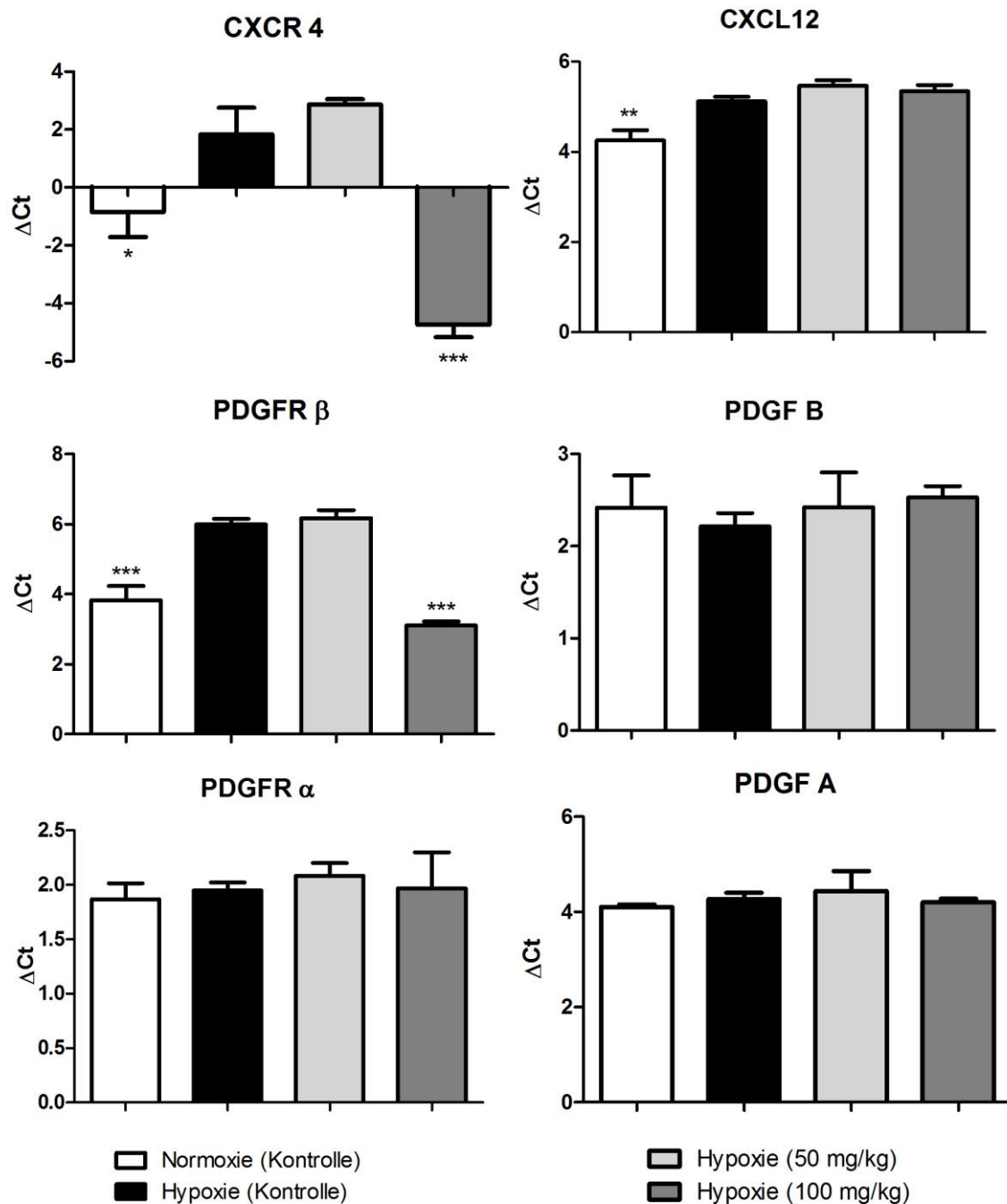


Abbildung 23: Real-time-PCR für die Rezeptortyrosinkinasen, CXCR4 und ihren Liganden in Maus-Lungenhomogenaten.

(* , $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, jeweilige Gruppe versus Hypoxiekontrolle, $n = 3-4$).

Nach der Untersuchung der Expression der verschiedenen Rezeptoren und ihrer Liganden auf Transkriptionsebene sollte auch die Proteinexpression im Lungengewebe der unterschiedlichen Tiergruppen analysiert werden. Hierfür wurden die PDGF-Rezeptoren α und β , sowie der CXC-Rezeptor 4 untersucht. Der Proteingehalt wurde normiert und das Verhältnis zur verwendeten β -Actin-Kontrolle berechnet (Abbildung 24). Beim Vergleich der

Normoxie- zur Hypoxiekontrolle konnte für den PDGF β -Rezeptor eine signifikante Erhöhung des Rezeptors festgestellt werden. Beim Vergleich der mit Imatinib behandelten Gruppen in Hypoxie zur hypoxischen Kontrollgruppe konnte eine signifikante Senkung der Expression des β -Rezeptors auf Proteinebene ermittelt werden (Abbildung 24). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für den PDGF-Rezeptor α und den CXC-Rezeptor 4 (Abbildung 24). Für beide Rezeptoren konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen dargestellt werden. Es handelt sich hierbei jeweils um einen Trend, welcher beobachtet wurde. Dieser spiegelt jedoch die Ergebnisse für den PDGF-Rezeptor β wieder. Eine mögliche Erklärung für die nicht-signifikanten Unterschiede könnte die kleine Datenmenge von jeweils nur drei Tieren sein.

Der PDGFR-Signalweg führt nach der Aktivierung der Rezeptoren über die Liganden PDGF-BB und PDGF-AA zu einer Aktivierung weiterer wichtiger Moleküle. Hierzu gehört die extrazellulär Signal regulierte Kinase 1 und 2 (ERK 1/2). Diese gehört zu den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), welche durch extrazelluläre Stimuli aktiviert werden können. Dies erfolgt z. B. über Membran-ständige Wachstumsfaktoren wie dem PDGF-Rezeptor. ERK 1/2 stellt innerhalb des PDGFR-Signalweges ein wichtiges Zielmolekül dar.

Zur Überprüfung der Aktivierung des PDGFR β und der MAP Kinasen ERK 1 und 2 wurde die Phosphorylierung des PDGFR β adressiert. Die Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors wurde mit Hilfe eines Antikörpers überprüft, welcher spezifisch die Phosphorgruppen am Tyrosin 1021 nachweist. Die Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung des Rezeptors war, verglichen mit der normoxischen Kontrollgruppe, signifikant erhöht (Abbildung 24). Dieser Effekt konnte in der 100 mg/kg Imatinib Behandlungsgruppe rückgängig gemacht werden. Für die 50 mg/kg Imatinib Gruppe konnte keine reversible Phosphorylierung des PDGFR β festgestellt werden. Es folgte die Betrachtung der Phosphorylierung der ERK 1/2 MAP Kinase. Hierbei konnte festgestellt werden, dass innerhalb der hypoxischen Kontrollgruppe ein Anstieg der ERK 1/2-Phosphorylierung vorlag (Abbildung 24). Im Vergleich hierzu kam es zu einer signifikanten Reduktion der ERK-Phosphorylierung in den mit Imatinib behandelten Tiergruppen (Abbildung 24).

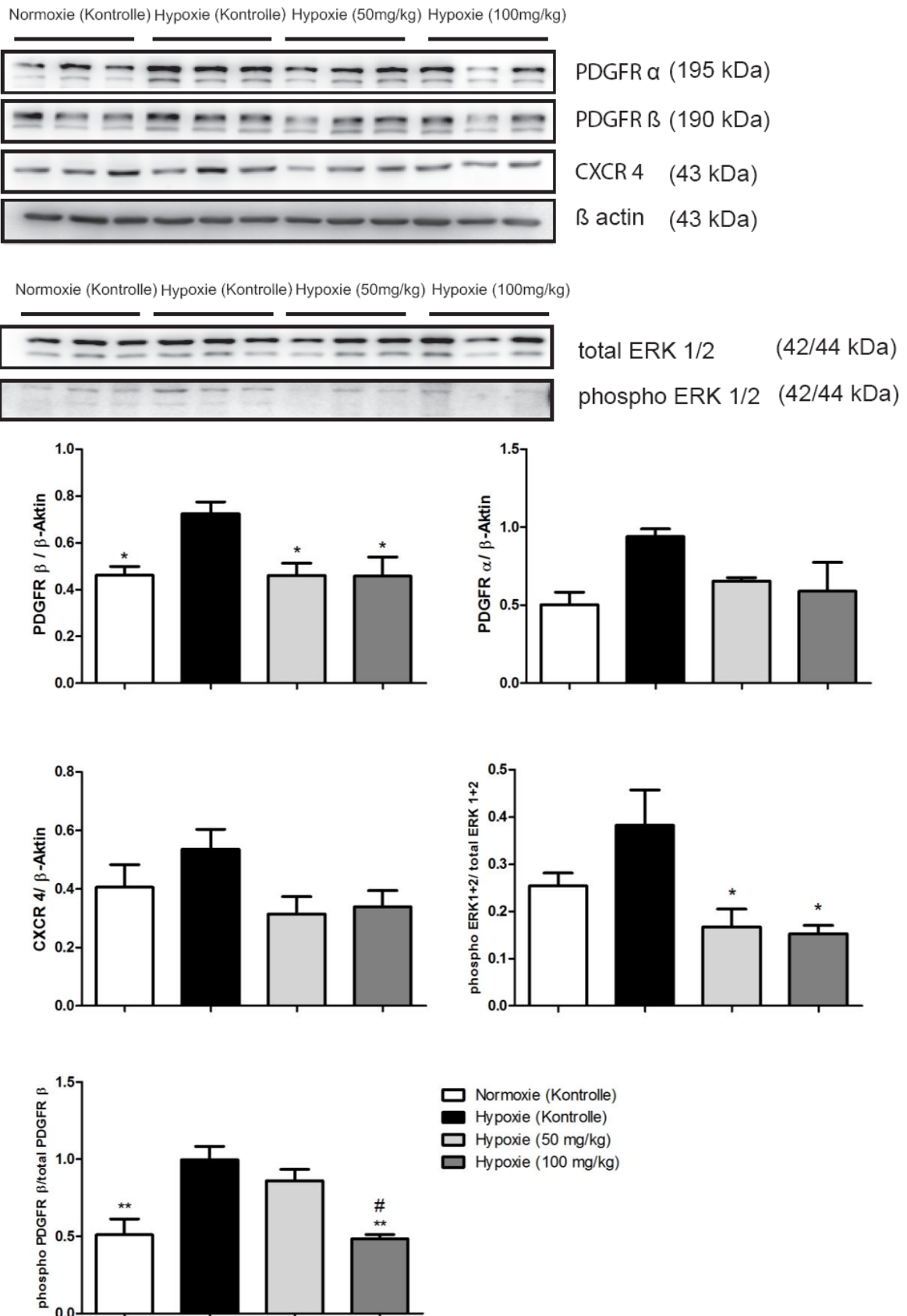


Abbildung 24: Expression PH relevanter Rezeptoren im Lungenhomogenat auf Proteinebene. In den Graphen wurde jeweils die Expression des jeweiligen Proteins ins Verhältnis zu β -Aktin oder dem Gesamtprotein gesetzt. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ jeweilige Gruppe versus Hypoxiekontrolle bzw. Hypoxie (100 mg/kg Imatinib) versus Hypoxiekontrolle; #, $p < 0,05$, $n = 3$).

Ein weiterer Aspekt, welcher betrachtet werden sollte, war die Messung der Konzentration der spezifischen Liganden PDGF-BB und SDF-1 alpha im Serum der unterschiedlichen Tiergruppen innerhalb des Imatinibversuches. Hierfür wurden Enzym gekoppelte Immunadsorbtionstests (ELISA) durchgeführt. Für SDF-1 und PDGF-BB konnte festgestellt werden, dass keine Konzentrationsunterschiede zwischen den Normoxie- und Hypoxiegruppen bestanden (Abbildung 25). Für SDF-1 konnte ein Anstieg des Liganden in der 100 mg/kg Imatinibgruppe beobachtet werden. Für PDGF-BB konnte ein Anstieg in beiden Imatinibgruppen beobachtet werden. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

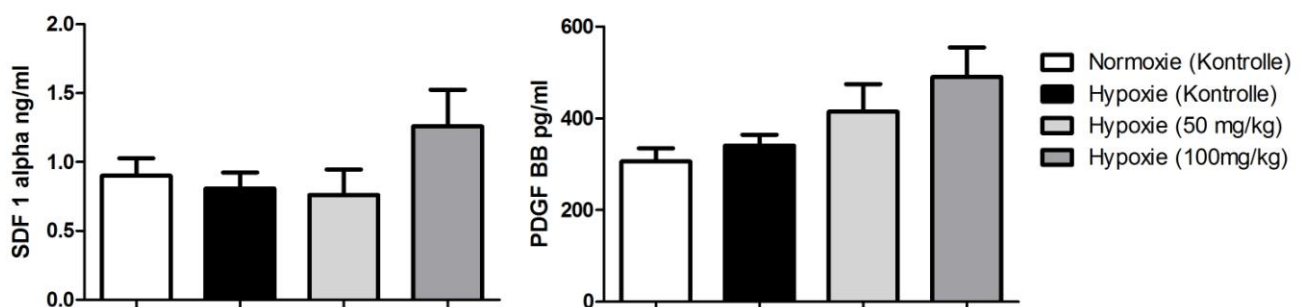


Abbildung 25: PDGF BB und SDF 1 alpha (CXCL12) Konzentration im Serum von PH-induzierten Mäusen (n = 6-8, Duplikate).

5 Diskussion

5.1 Zirkulierende Fibrozyten – mesenchymale und hämatopoetische Vorläuferzellen

Zirkulierende Fibrozyten beschreiben eine einzigartige Zellpopulation, die an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beteiligt ist. Hierzu gehören vor allem fibrosierende Erkrankungen, wie die pulmonale Fibrose, Asthma, Sklerodermie und auch die physiologische Fibrosierung bei der Wundheilung (Bucala, Spiegel et al. 1994; Gomperts und Strieter 2007). Durch ihre Eigenschaft der Expression von extrazellulären Matrix-Komponenten, wie Kollagen, wird ihnen eine Beteiligung an fibroproliferativen und reparativen Prozessen in Geweben zugeschrieben (Chesney, Metz et al. 1998; Metz 2003). Die Rekrutierung dieser Zellen aus dem Knochenmark ähnelt der Rekrutierung von Leukozyten. Eine Vielzahl an Chemokin-Rezeptoren und ihrer Liganden spielen eine wichtige Rolle während dieses Vorgangs (Luster, Alon et al. 2005). Hierzu gehören in humanen Zellen CCR3, CCR5, CCR7 und CXCR4 (Abe, Donnelly et al. 2001; Quan, Cowper et al. 2004). Für die Rekrutierung von hämatopoetischen Stammzellen spielt CXCR4 die Schlüsselrolle (Murdoch 2000).

Die pathogenetische Relevanz der Fibrozyten bei der experimentellen pulmonalen Fibrose konnte bereits in zahlreichen Untersuchungen belegt werden (Gomperts und Strieter 2007). Im Bleomycin-induzierten Fibrose-Modell wurde die Migration dieser Zellen entlang der CXCL12/ CXCR4 vermittelten, chemotaktischen Achse gezeigt (Phillips, Burdick et al. 2004). In den Bleomycin-behandelten Tieren konnten erhöhte CXCL12-Gehalte im Lungengewebe und Blutplasma, sowie eine vermehrte Fibrozytenanzahl in den Lungen im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Dies deutet auf einen durch Bleomycin-induzierten CXCL12-Anstieg und damit verbundene Fibrozyten (CXCR4+)-Rekrutierung hin (Phillips, Burdick et al. 2004). Diese Annahme wird durch Beobachtungen unterstützt, welche eine verminderte Fibrozyten-(CD45+, Col1+, CXCR4+) Rekrutierung und Fibrose-Ausprägung nach Unterbrechung der CXCR4/ CXCL12-Achse im Bleomycin-Modell beschrieben (Gomperts und Strieter 2007). In Lungenfibrose-Patienten wurden ein erhöhter CXCL12-Gehalt, sowohl in den Lungen als auch im Blutplasma, sowie erhöhte Fibrozytenzahlen (bei Exazerbation der Erkrankung) beschrieben (Mehrad, Burdick et al. 2007).

Auch bei der Reparatur und dem Remodeling von Luftwegen im asthmatischen Krankheitsbild konnte eine Beteiligung von zirkulierenden Fibrozyten dargestellt werden (Schmidt, Sun et al. 2003). Sie zeigten in allergischen Asthma-Patienten, welche Allergenen ausgesetzt waren, dass es zu einer Akkumulation von Fibrozyten-artigen Zellen in der Bronchialschleimhaut kommt. Humane zirkulierende Fibrozyten differenzieren durch Stimulation mit Endothelin 1 und TGF- β 1 *in vitro* zu Myofibroblasten, dies ist durch die Expression von α Smooth muscle Actin gekennzeichnet. Des Weiteren konnte im allergischen Asthma-Maus-Modell die Rekrutierung von Fibrozyten in das Bronchialgewebe und die Differenzierung dieser Zellen in Myofibroblasten dargestellt werden (Schmidt, Sun et al. 2003). Diese Daten weisen darauf hin, dass Fibrozyten beim Asthma als Vorläuferzellen für Myofibroblasten auftreten und an fibrotischen Umbauprozessen in den Atemwegen teilhaben.

Erste Untersuchungen zur Beteiligung von zirkulierenden Fibrozyten an der Entstehung von chronischer pulmonaler Hypertonie wurden 2006 veröffentlicht. In neonatalen, chronisch hypoxischen Kälbern und Ratten wurde die perivaskuläre Akkumulation von CD45 positiven, Kollagen-1 positiven Zellen (Fibrozyten) gezeigt (Frid, Brunetti et al. 2006). Des Weiteren konnte die wesentliche Rolle, die diese Zellen während der adventitiellen Umbauprozesse im Vergleich zu ortsständigen Fibroblasten spielen, dargestellt werden (Frid, Brunetti et al. 2006). Durch eine *in vivo* Depletion zirkulierender monozytärer Zellen in chronisch hypoxischen Ratten konnte die Akkumulation von Fibrozyten in der pulmonalarteriellen Adventitia sichtbar reduziert werden (Frid, Brunetti et al. 2006). Diese und weitere Studien (Varcoe, Mikhail et al. 2006) zeigen erste Hinweise auf die Beteiligung der zirkulierenden Fibrozyten in Prozessen der pulmonalen Hypertonie .

Innerhalb dieser Arbeit wurde eine weiterführende Charakterisierung der Zellen unternommen, sowie ihre Beteiligung am vaskulären Remodeling in der experimentellen PH und die Effekte des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors Imatinib untersucht.

Zirkulierende Fibrozyten stellen eine relativ neue Subpopulation der Leukozyten des peripheren Blutes dar (Bucala, Spiegel et al. 1994), deren Ursprung bis heute nicht vollständig geklärt ist. Dieser Zelltyp erhielt seine Bezeichnung aufgrund der „Fibroblasten-artigen“ Charakteristika (Bucala, Spiegel et al. 1994). Sie zeichnen sich zudem durch ihre spindelartige Morphologie aus (Abbildung 11). Innerhalb dieser Arbeit konnten diese Zellen erfolgreich aus humanem Blut isoliert und charakterisiert werden (Abbildung 11, Abbildung

12). Es konnte der Nachweis für die Expression der beschriebenen mesenchymalen und hämatopoetischen Marker erbracht werden (Abbildung 12). Zu den untersuchten Markern gehören Vimentin, Kollagen I, Prolyl-4-hydroxylase sowie CD45, CD11b, CXCR4 und α -Smooth muscle Actin. Bei Vimentin handelt es sich um ein Typ3-Intermediärfilament, welches spezifisch für mesenchymales Gewebe ist und in Fibroblasten vorkommt. Kollagen ist das meistverbreitete Protein im Tierreich; es wird von Zellen des Bindegewebes sekretiert. Kollagen 1 ist ein fibrilläres Kollagen und kommt in Haut, Knochen und der Lunge vor. Prolyl-4-hydroxylase gehört zu den Schlüsselenzymen der Kollagenbiosynthese. Sie katalysiert die Hydroxylierung von 4-Hydroxyprolin, welches für die Stabilität der Kollagen-Triple-Helix eine wesentliche Rolle spielt. Die Expression dieses Enzyms in Zellen weist auf die Produktion von Kollagen in diesen Zellen hin. CD45 ist ein Oberflächenprotein auf Leukozyten und wird, bis auf Erythrozyten, auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert. Es handelt sich um eine Transmembranproteintyrosinphosphatase. CD11b bzw. Integrin alpha M (ITGAM) ist ein Oberflächenmolekül auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten und vermittelt Adhärenz. Zusätzlich exprimieren Fibrozyten zum Teil spontan α -Smooth muscle Actin (Gomperts und Strieter 2007), einem typischen Marker für glatte Muskelzellen (Quan, Cowper et al. 2004), welcher auf eine Transdifferenzierung in Myofibroblasten hinweisen könnte. Innerhalb dieser Arbeit konnten nach 7-tägiger Kultur alle beschriebenen Marker für humane Fibrozyten detektiert werden (Abbildung 12).

Ein wichtiger Diskussionspunkt innerhalb der Literatur zu zirkulierenden Fibrozyten ist deren Ursprung, welcher bis heute nicht vollständig geklärt wurde. Ebenso ist eine ausführlichere Charakterisierung der Fibrozyten im Hinblick auf weitere Rezeptoren, Oberflächenmarker und sekretierte Botenstoffe notwendig. Hierdurch kann eine weitere Aufschlüsselung der Eigenschaften und damit verbundene Beteiligung an unterschiedlichen molekularen und zellphysiologischen Prozessen getätigt werden. Für die molekulare Charakterisierung der Zellen wurden in dieser Arbeit jeweils periphere mononukleare Blutzellen verwendet. Die Kultivierung erfolgte, mit einigen Modifikationen (3.2.2.1), wie bereits in der Literatur beschrieben (Bucala, Spiegel et al. 1994; Chesney, Bacher et al. 1997). Einen kritischen Punkt stellte die Aufreinigung der Zellen über magnetische Depletion mittels anti-CD2 (T-Lymphozyten), anti-CD14 (Monozyten bzw. Makrophagen) und anti-CD19 (B-Lymphozyten und Thrombozyten) Antikörpern dar, welche teils in der Literatur Anwendung findet (Chesney, Bacher et al. 1997). Da die Ausbeute bei weniger als 10 % der Ausgangspopulation

lag, war es schwierig, genügend Material für die Proteinbiochemie und weitere molekulare Methoden zu erhalten. Aus diesem Grund, und da man auch im *in vivo* Modell die gesamte periphere Population betrachtet, wurde auf diesen Schritt zum Großteil verzichtet. Dies entspricht auch dem Protokoll von Vannella et. al. und Saunders et. al., welche nach 14-tägiger Kultur der mononukleärer Blutzellen eine 95 %ige reine Fibrozytenkultur erhielten (CD45/ Prokollagen positiv bzw. CD34/ Kollagen), ohne eine Depletion durchzuführen (Vannella, McMillan et al. 2007; Saunders, Siddiqui et al. 2009).

Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass es während des Depletionsverfahrens zum Verlust von zirkulierenden Fibrozyten bzw. deren Vorläuferzellen und einer Verringerung der Ausbeute kommt. Bis heute ist umstritten, aus welcher Population der Leukozyten die zirkulierenden Fibrozyten stammen. Es wird diskutiert, dass die Zellen ihren Ursprung in der CD14+-Population haben, d. h. dass sie aus der Makrophagen/Monozyten-Population stammen (Abe, Donnelly et al. 2001; Quan, Cowper et al. 2004). Zunächst wurde dies jedoch ausgeschlossen, da sie nicht das entsprechende Rezeptor-Molekül CD14 trugen (Bucala, Spiegel et al. 1994). Diese Beobachtung wurde nach 6-wöchiger Kultur der Zellen gemacht (Bucala, Spiegel et al. 1994). Später wurde bekannt, dass auf Fibrozyten die Expression dieses Markers bereits nach 2-wöchiger Kultur nicht mehr nachweisbar ist (Chesney, Metz et al. 1998). Über Transwellexperimente konnte festgestellt werden, dass ein Zusammenspiel zwischen T-Zellen und CD14+-Zellen stattfindet, welches für die Differenzierung der zirkulierenden Fibrozyten notwendig ist (Abe, Donnelly et al. 2001). Dies spricht für eine komplexe Interaktion von Faktoren bzw. Zellen, welche für die Differenzierung von Fibrozyten notwendig erscheint. Innerhalb dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Differenzierung von Fibrozyten aus den mononukleären Blutzellen nach 3-7 Tagen stattfand und diese nach 7-10 Tagen ihre spindelartige Form ausprägten (Abbildung 11) (Quan und Bucala 2007). In dieser Arbeit wurde anhand der morphologischen (Abbildung 11) und immunologischen Begutachtung (Abbildung 12) der Zellen über die Reinheit der Zellen entschieden.

5.1.1 Fortführende Charakterisierung von humanen zirkulierenden Fibrozyten

Innerhalb dieser Arbeit sollte eine weitere Charakterisierung der zirkulierenden Fibrozyten hinsichtlich der Expression von Rezeptortyrosinkinasen erfolgen. Hierfür wurden Kinasen und Rezeptoren betrachtet, welchen bereits eine Rolle in der Pathogenese der pulmonalen

Hypertonie zugeschrieben wurde, bzw. spezifische Ziele für den in klinischer Entwicklung befindlichen Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Imatinib darstellen. Zwei Rezeptoren, die eine wesentlich bei der PAH-Pathogenese Einfluss nehmen, sind PDGFR α und β . Beide Rezeptoren werden vermehrt in Pulmonalarterien von Patienten mit PAH als auch von Ratten im PH-Tiermodell exprimiert (Schermully, Dony et al. 2005; Perros, Montani et al. 2008). Des Weiteren wurden Fibrozyten auf die Expression von VEGFR, c-kit und CXCR4 getestet.

In dieser Arbeit ergaben sich durch mRNA- und Proteinanalysen Hinweise darauf, das zirkulierende Fibrozyten sowohl PDGFR α als auch β exprimieren (Abbildung 15, Abbildung 16). Diese Beobachtung stimmt mit der von Aono et. al. publizierten überein. Diese Gruppe ermittelte die Expression von PDGF-Rezeptoren in humanen und Mausfibrozyten (Aono, Nishioka et al. 2009). Des Weiteren konnte die Chemotaxis von Fibrozyten hinsichtlich der PDGF-Liganden nachgewiesen und durch die Gabe von PDGF-spezifischen Antikörpern bzw. Imatinib im Bleomycin induzierten Fibrose-Modell verhindert werden (Aono, Nishioka et al. 2009). Ebenso konnte im Asthma-Modell gezeigt werden, das sekretiertes PDGF von glatten Muskelzellen der Atemwege einen Stimulus für die Migration von Fibrozyten darstellt, welcher durch die Gabe von PDGF-spezifischen Antikörpern blockiert werden konnte (Saunders, Siddiqui et al. 2009). Diese Ergebnisse unterstützen die Resultate dieser Arbeit hinsichtlich der Rezeptorexpression in humanen Zellen und die Hypothese, dass Imatinib einen Effekt auf die Rekrutierung von Fibrozyten *in vivo* und *in vitro* besitzt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt während der Zellrekrutierung aus dem Knochenmark während Remodeling- und Wundheilungsprozessen stellt der CXCR 4-Rezeptor dar (Abe, Donnelly et al. 2001; Phillips, Burdick et al. 2004). Dieser gehört zu einer Klasse von Chemokinrezeptoren, welcher mit seinem Liganden CXCL 12 bzw. SDF-1 alpha eine chemotaktische Achse für die Rekrutierung von Stamm- bzw. Vorläuferzellen aus dem Knochenmark bildet (Murdoch 2000). Die Expression dieses Chemokinrezeptors und weiterer Chemokine konnte bereits in humanen und Mausfibrozyten nachgewiesen werden (Abe, Donnelly et al. 2001; Phillips, Burdick et al. 2004; Quan, Cowper et al. 2004; Moore, Kolodsick et al. 2005). Innerhalb dieser Arbeit konnte durch Immunfluoreszenzfärbungen der CXCR 4 Rezeptor auf humanen zirkulierenden Fibrozyten dargestellt werden (Abbildung 13). Ebenso wurde die Expression dieses Rezeptors und seines Liganden innerhalb der *in vivo* Modelle überprüft. Hierbei konnte für CXCR 4 eine Hochregulation der mRNA-Expression

innerhalb der Mauslungen in hypoxischen Tieren festgestellt werden (Abbildung 23). Dieser Effekt wurde durch die Gabe von 100 mg/kg/Tag Imatinib rückgängig gemacht. Eine Ursache für diese erhöhte und durch Imatinib reversible Expression des Rezeptors könnte eine verminderte Rekrutierung von CXCR 4-positiven Zellen sein. CXCR 4 wird des Weiteren von Monozyten und Makrophagen exprimiert. Auf der Proteinebene konnte ebenso eine Erhöhung des Rezeptors in Hypoxie festgestellt werden (Abbildung 24), welche durch die Gabe von Imatinib gesenkt werden konnte.

5.2 Diskussion des Tiermodells

Für Untersuchungen zur pulmonalen arteriellen Hypertonie eignen sich hauptsächlich zwei Tiermodelle. Die Monocrotalin (MCT) -induzierte pulmonale Hypertonie und die durch chronische Hypoxie induzierte pulmonale Hypertonie, wobei das MCT-Modell in Ratten und das Hypoxie Modell in Mäusen und Kälbern häufig angewandt wird. Welches der beiden Modelle am besten geeignet ist, bleibt bis heute unter Experten umstritten. Das MCT-Modell wird durch einen toxischen Stimulus induziert. Die Vorteile des MCT Modells stellen die einmalige Behandlung mit MCT, im Vergleich zur mehrwöchigen Haltung der Tiere in einer Hypoxiekammer dar. Des Weiteren ist der sichtbare Effekt der sich entwickelnden PH, wie starke Proliferation der Media und Adventitia, sehr deutlich im Vergleich zum Hypoxie-Modell der Maus.

Innerhalb dieser Arbeit wurde das Hypoxie-induzierte PH-Modell in der Maus verwendet. Da es die physiologischen Bedingungen von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen oder von Menschen, die in großer Höhe leben widerspiegelt. Histologische Untersuchungen von Pulmonalgefäßen aus Patienten, die in Hochgebirgen leben, zeigen die typischen Muster des Krankheitsbildes der Pulmonalen Hypertonie (Arias-Stella und Saldana 1963; Gamboa und Marticorena 1972). Durch die reduzierte Sauerstoff-Konzentration in der eingeatmeten Luft erfolgt eine pulmonale Vasokonstriktion, welche zu einem Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes führt (von Euler-Liljestrand Mechanismus). Chronische Hypoxie wird begleitet von strukturellen Veränderungen, wie de-novo-Muskularisierung, Mediaverdickung und erhöhte Matrixdeposition in den Pulmonalgefäßen. Dies führt zum Anstieg der Arbeitslast des rechten Ventrikels. Chronische und akute Hypoxie zählen zu den am häufigsten verwendeten Tiermodellen für die Darstellung und Erforschung der PAH. In dieser Arbeit konnte nach 3-wöchiger Hypoxie-Exposition der Tiere eine vermehrte

Muskularisierung der pulmonalen Widerstandsgefäße, die Ausprägung einer Rechtsherzhypertrophie und ein Anstieg des rechtventrikulären systolischen Drucks beobachtet werden (Abbildung 19, Abbildung 22). Dies sind alles Zeichen einer manifesten pulmonalen Hypertonie.

Beim Monocrotalin-Modell wird über die Gabe eines Toxins eine PH ausgelöst. MCT führt hierbei zu einer Endothel-Degeneration, einer Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskelzellen und der Fibroblasten in der Adventitia. Nach vier Wochen führt die subkutane Injektion von MCT in Ratten zum Anstieg der Muskularisierung der Pulmonalgefäße, sowie einem dramatischen Anstieg des rechtsventrikulären systolischen Druckes (Campbell, Zhao et al. 2001). Sechs bis sieben Wochen nach MCT Injektion versterben die Ratten am Rechtsherzversagen aufgrund der schweren PH.

In beiden Modellen steigt der Muskularisierungsgrad der Arteriolen an, allerdings ist die Ausprägung einer rechtventrikulären Hypertrophie langsamer im MCT-Modell. Des Weiteren wird die PH in diesem Modell nicht primär durch Vasokonstriktion sondern durch eine stark ausgeprägte Entzündungsreaktion mit Apoptose von Endothelzellen in den kleinen Arteriolen getriggert. Es kommt im Verlauf zu einem Verlust peripherer Arterien.

Im Hypoxie-Modell sind histopathologische Veränderungen, im Vergleich zum MCT-Modell, weniger ausgeprägt. Es fehlen eine erhöhte Sterblichkeitsrate und massives Gefäßremodeling, wie sie im MCT-Modell zu erkennen sind. Des Weiteren kommt es in beiden Modellen nicht zur Ausprägung plexiformer Läsionen (Voelkel und Tudor 2000).

Ein wichtiger Grund für die Nutzung des Hypoxie-induzierten PH-Modells in der Maus ist die Verfügbarkeit von GFP-exprimierenden Tieren für die beschriebene Knochenmarkstransplantation sowie die weitere Verfügbarkeit genmanipulierter Mausstämme. Durch dieses Transplantationsmodell kann der Ursprung dieser Zellen aus dem Knochenmark dargestellt werden.

5.3 Effekte von Imatinib auf die Gefäßmuskularisierung und Rechtsherzhypertrophie im Hypoxie-induzierten PH Modell in Mäusen

Während der Entstehung der PAH findet ein fortschreitender Anstieg des pulmonalen vaskulären Widerstandes statt, welcher langfristig zu einer Rechtsherzhypertrophie und zum Herzversagen führt (Humbert, Sitbon et al. 2004). Remodelingprozesse, welche hauptsächlich die kleinen Pulmonalgefäße betreffen, sind durch proliferative Prozesse der

glatten Muskelzellen in der Media bedingt und führen zum erhöhten Gefäßwiderstand in den betroffenen Arterien (Humbert, Morrell et al. 2004; Pietra, Capron et al. 2004). Verschiedene Wachstumsfaktoren haben Einfluss auf die pathologische Proliferation und Migration glatter Muskelzellen; hierzu gehören unter anderem EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), FGF (Fibroblasten Wachstumsfaktor) und PDGF (Xin, Johnson et al. 1994; Jones, Cowan et al. 1997; Ushio-Fukai, Griendling et al. 2001; Balasubramaniam, Le Cras et al. 2003; Yu, Sweeney et al. 2003). Durch unterschiedliche *in vitro* Studien konnte bewiesen werden, dass PDGF als Mitogen und Chemoattraktans für glatte Muskelzellen agiert (Yu, Sweeney et al. 2003) und somit ein neues therapeutisches Ziel für die Behandlung von PAH darstellt. In unterschiedlichen Studien konnte der Einfluss von PDGF und PDGFR bestätigt werden. Ebenso konnte in dieser Arbeit die Expression des PDGF-Rezeptors auf humanen glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien gezeigt werden (Abbildung 14).

Imatinib (Glivec®) ist ein Inhibitor von Rezeptortyrosinkinasen und wurde von Novartis ursprünglich zur Behandlung von Krebspatienten entwickelt. Imatinib wirkt über die Blockierung der ATP-Bindungstasche von Rezeptortyrosinkinasen (BCR-ABL, c-kit und PDGFR) (Capdeville, Buchdunger et al. 2002). Seit acht Jahren wird es erfolgreich für die Behandlung von chronisch myeloischer Leukämie (CML) (Buchdunger, Cioffi et al. 2000; Capdeville, Buchdunger et al. 2002) und gastrointestinalen Stromatumoren eingesetzt (Dagher, Cohen et al. 2002).

Sowohl für das MCT-induzierte als auch für das hypoxische PH-Modell konnte Imatinib seine Wirksamkeit auf das Gefäßremodeling und die Rechtsherzhypertrophie beweisen (Schermuly, Dony et al. 2005). Der antiproliferative Effekt von Imatinib auf PSMCs stellt eine neue therapeutische Strategie in PAH-Patienten dar (Perros, Montani et al. 2008). Für PAH-Patienten konnte ebenfalls der positive Effekt von Imatinib gezeigt werden (Ghofrani, Seeger et al. 2005; Sastry 2006; Souza, Sitbon et al. 2006; Garcia Hernandez, Castillo Palma et al. 2008).

Zur Darstellung der Effektivität des gewählten Hypoxie-Modells wurden das Gefäßremodeling sowie die hämodynamischen Daten analysiert. Die stereologische Vermessung der kleinen Widerstandsgefäße (20-50 µm Durchmesser), sowie die Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie (Abbildung 19) bestätigten die früheren Ergebnisse (Schermuly, Dony et al. 2005), dass Imatinib einen positiven Effekt auf das Remodeling in diesem Tiermodell hat. Innerhalb der hypoxischen Kontrollgruppe wurde eine signifikante

Vermehrung der glatten Muskulatur der Gefäßmedia beobachtet (Abbildung 19). Diese konnte durch die Behandlung mit Imatinib auf Werte der normoxischen Kontrolle zurückgeführt werden (Abbildung 19). Dieser Effekt ist auf die antiproliferative und proapoptische Wirkung von Imatinib auf die glatten Muskelzellen zurückzuführen. Imatinib bindet an die ATP-Bindungsstelle des PDGF-Rezeptors in den Muskelzellen der Media und sorgt somit, trotz PDGF-Ligandenbindung an die Rezeptoren, für eine Inaktivierung der nachfolgenden Signalwege, wie z. B. die MAPK-Kaskade. Im normalen Zustand führt der PDGFR-Signalweg nach der Aktivierung der Rezeptoren über die Liganden PDGF-BB und PDGF-AA zu einer Aktivierung weiterer Moleküle. Hierzu gehört ERK 1/2, diese gehört zu den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), welche durch extrazelluläre Stimuli aktiviert werden können. Dies erfolgt z. B. über membranständige Wachstumsfaktorrezeptoren wie dem PDGF-Rezeptor. ERK 1/2 stellt innerhalb des PDGFR-Signalweges eine weitere wichtige Komponente dar. Durch seine Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin mittels MEK (MAP/ERK phosphorylierende Kinase) kommt es zur Aktivierung von ERK. Als Folge kann ERK weitere Proteinkinasen phosphorylieren bzw. in den Zellkern wandern und Transkriptionsfaktoren (z. B. ELK-1) aktivieren. Diese Aktivierung führt zum Anschalten von Proliferations-, Migrations- und anti-apoptischen Prozessen. Zur Überprüfung der Expression der PDGF-Rezeptoren, ihrer Liganden und ERK 1/2 wurden die Lungenhomogenate der Mäuse aus den Imatinib und Hypoxie behandelten Tieren auf mRNA- und Proteinebene überprüft (Abbildung 23, Abbildung 24). Es konnte eine vermehrte Präsenz von PDGFR β unter hypoxischen Bedingungen detektiert werden, welche durch die Imatinibbehandlung (100 mg/kg/Tag) wieder gesenkt werden konnte (Abbildung 23, Abbildung 24). Hinsichtlich der hämodynamischen Messungen konnte die Wirkung der Hypoxie auf den Lungenkreislauf bestätigt werden. Es wurden keine Veränderungen für den systolischen Blutdruck (SBP sys) und die Herzfrequenz (HR) festgestellt (Abbildung 22). Dies weist darauf hin, dass die Hypoxie keinen Einfluss auf den systemischen Kreislauf hat. Hinsichtlich der Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie zeigte sich für die hypoxische Kontrollgruppe ($0,33 \pm 0,02$), im Vergleich zur normoxischen Kontrolle ($0,20 \pm 0,01$), eine Verdickung des rechten Herzens gegenüber dem linken Herzen und Septum. Diese Ausprägung konnte nur in der hypoxischen Imatinibgruppe mit einer 100 mg/kg Dosis signifikant reduziert werden ($0,24 \pm 0,02$). Ebenso lag der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVP sys) erhöht in den hypoxischen Kontrolltieren ($34,12 \pm 1,14$ mmHg) im Vergleich

zu den normoxischen Kontrollen ($27,27 \pm 1,17$) vor (Abbildung 22). Dieser Effekt wurde durch die Gabe von 100 mg/ kg Imatinib rückgängig gemacht ($30,48 \pm 0,93$). Eine Dosis von 50 mg/kg Imatinib ergab keinen positiven Effekt ($35,60 \pm 2,61$). Diese Daten konnten bereits vorhandene Studien in der Maus bestätigen, die zeigten das Imatinib Dosis-abhängig wirkt (Schermyly, Dony et al. 2005).

5.4 Einfluss des Rezeptortyrosinkinaseinhibitors Imatinib auf die Rekrutierung von zirkulierenden Fibrozyten im Hypoxie-Modell

Es konnte gezeigt werden, dass Imatinib die Anzahl an zirkulierenden Fibrozyten im hypoxischen PH-Modell in der Maus reduziert (Abbildung 20, Abbildung 21). Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung könnte die direkte inhibitorische Wirkung von Imatinib auf die PDGF-Rezeptoren auf den zirkulierenden Fibrozyten sein. Hierdurch kommt es zu einer Unterbrechung der weiteren Signalwege (MAPK) und den damit verbundenen Prozessen, wie Proliferation, Migration und anti-Apoptose. Durch diesen Effekt wäre eine verminderte Rekrutierung von Fibrozyten in die Lunge oder eine Apoptose der Zellen denkbar. Wie bereits erwähnt konnten Aono et. al. im Fibrosemodell sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zeigen, dass die Inhibition der Rekrutierung von Fibrozyten sowohl durch Imatinib als auch durch die Blockierung von PDGF durch Antikörper reduziert werden kann. Durch die verminderte Rekrutierung und die damit verbundene verminderte PDGF-Ausschüttung könnte die reduzierte Muskularisierung der Gefäße erklärt werden. Innerhalb des m-RNA Expressionschemas konnten jedoch keine Veränderungen im PDGF BB- Gehalt in den Lungenhomogenaten detektiert werden. Des Weiteren stiegen unter Imatinibbehandlung die PDGF BB und SDF 1 alpha Werte im Blutserum der Tiere unter Imatinib an, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant (Abbildung 25). Dieser Effekt kann mit der autokrinen Rückkopplung erklärt werden. Hierbei wird auf den PDGF-Rezeptor tragenden Zellen, welche durch Imatinib blockiert sind, eine erhöhte PDGF-Ausschüttung veranlasst. Dies geschieht aufgrund dessen, dass die eigentliche Signalkaskade unterbrochen wird und die Zelle das Signal erhält, mehr Liganden zu produzieren, um die Kaskade erneut anschalten zu können. Des Weiteren konnte auch eine Reduzierung an GFP-positiven Makrophagen und anderen leukozytären Zellen, die ihren Ursprung im Knochenmark besitzen, unter Imatinibbehandlung beobachtet werden (Abbildung 20, Abbildung 21). Das heißt, dass Imatinib grundsätzlich einen Einfluss auf die Rekrutierung dieser Zellen besitzt bzw. dass die Wirkung von Imatinib in den Zellen der Lunge (vor allem glatten Muskelzellen) zu einer

verminderten Rekrutierung führt. Über welchen Mechanismus Imatinib Einfluss auf zirkulierende Fibrozyten im Hypoxie-Modell nimmt konnte durch das verwendete *in vivo* Modell nicht geklärt werden.

5.5 Sekretiertes PDGF von Fibrozyten als Stimulus für das Remodeling

Eine weitere Annahme, welche in Betracht gezogen werden sollte, war der direkte Effekt von zirkulierenden Fibrozyten auf Zellen in den Pulmonalarterien. Ein wichtiger Aspekt hierbei stellen die glatten Muskelzellen der Media und die Fibroblasten der Adventitia dar, welche einen Hauptanteil während des vaskulären Remodelings einnehmen. Die Stimulation der Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen wird zum Großteil von PDGF übernommen.

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Beobachtung gemacht, dass im Hypoxie-induzierten PH-Modell in der Maus die Anzahl an zusätzlich rekrutierten zirkulierenden Fibrozyten in die Pulmonalgefäße relativ gering, im Vergleich zu den normoxischen Kontrolltieren, war (Abbildung 20, Abbildung 21). Daraus lässt sich schließen, dass nicht die zirkulierenden Fibrozyten den Hauptanteil am vaskulären Remodeling in diesem Maus-Modell ausmachen. Jedoch ist bereits aus anderen Publikationen bekannt, dass diese Zellen die Fähigkeit besitzen, verschiedene Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren zu sekretieren (Stenmark, Davie et al. 2005). Hierbei soll das bereits erwähnte PDGF hervorgehoben werden, da es einen der wichtigsten Wachstumsfaktoren im Bezug zum Remodeling in der PAH darstellt und die Proliferation verschiedener Zelltypen aktiviert.

Es besteht die Annahme, dass die rekrutierten Fibrozyten PDGF in das umliegende Gewebe sekretieren und somit die Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten stimulieren, was wiederum zum Remodeling führt. Für die Analyse von Interaktionen zwischen zirkulierenden Fibrozyten und glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien bzw. Fibroblasten der Adventitia wurde ein Proliferationsassay mit konditioniertem Medium von Fibrozyten durchgeführt. Hierbei konnte für die glatten Muskelzellen aus humanen Pulmonalarterien ein Anstieg der Proliferation durch $^3\text{[H]}$ Thymidin-Inkorporation beobachtet werden (338.9 ± 11.52 , normales Fibrozytenmedium versus 1218 ± 70.77 cpm/mg nach 24 h bzw. 2076 ± 171.8 cpm/mg nach 48 h konditioniertem Medium, Abbildung 17). Diese Daten sprechen für die Sekretion stimulierender Faktoren, wie PDGF, welche zum Anstieg der Proliferation von glatten Muskelzellen führen. Zur Überprüfung ob

dieser Effekt durch Inhibitoren beeinflusst werden kann, wurde in einem zweiten Assay die inhibitorische Wirkung von Imatinib getestet. Hierbei konnten die Beobachtungen gemacht werden, dass Imatinib Dosis-abhängig die Proliferation von humanen glatten Muskelzellen und humanen Fibroblasten der Adventitia inhibiert und den stimulierenden Effekt des konditionierten Mediums von zirkulierenden Fibrozyten aufhebt (Abbildung 18). Ob durch die Behandlung der zirkulierenden Fibrozyten mit Imatinib die Sekretion von PDGF in das Medium unterbrochen wird und daraufhin weniger PDGF im konditionierten Medium vorhanden ist, welches die Proliferation der Muskelzellen und Fibroblasten stimuliert, konnte in diesem Zusammenhang nicht geklärt werden. Um dies zu untersuchen, wäre die Durchführung eines ELISAs (PDGF BB) notwendig. Außerdem konnte über diesen Assay nicht die Frage geklärt werden, welche Faktoren in das Medium von den Fibrozyten entlassen werden und letztendlich zur Proliferation führen, hierfür könnte ebenso ein ELISA für unterschiedliche proproliferative Faktoren hilfreich sein. Dennoch kann spekuliert werden, dass PDGF ein wesentlicher Faktor ist, der von den Fibrozyten sekretiert wird und die Proliferation der glatten Muskelzellen und Fibroblasten anregt. Dieser Signalweg konnte *in vitro* über Imatinib blockiert werden.

5.6 Ausblick

Zirkulierende Fibrozyten stellen eine relativ neu definierte Subpopulation des peripheren Blutes dar, welche Anteil an verschiedenen pathologischen Prozessen haben. Innerhalb dieser Arbeit konnte die Beteiligung dieser Zellen im Remodelingprozess von pulmonalen Widerstandsgefäßen bestätigt werden. Ebenso konnten erste Hinweise gefunden werden, dass Imatinib, ein Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor, Einfluss auf das Vorhandensein von Fibrozyten hat.

Ein weiterer Aspekt, welcher in dieser Arbeit keine Betrachtung gefunden hat, ist die Ermittlung des Ursprungs der Zellen, sowie die Untersuchung, auf welche Art und Weise Imatinib Einfluss auf die Rekrutierung von zirkulierenden Fibrozyten hat.

Welchen Anteil diese Zellen an der Entstehung von pulmonaler Hypertonie im Hypoxie-induzierten Modell besitzen, konnte bis heute nicht geklärt werden. Eine Möglichkeit dies zu prüfen, stellt ein transgenes Mausmodell dar. Der Aspekt, dass zirkulierende Fibrozyten die einzigen Zellen im peripheren Blut sind, die Kollagen I und Prokollagen exprimieren, kann dabei von immensem Nutzen sein. Für dieses Modell wird durch einen Kollagen-I bzw. Prokollagen-Promoter die Expression der Herpesvirus-Thymidinkinase (HSV TK) reguliert, so dass alle Zellen, die Kollagen /Prokollagen exprimieren, diese Thymidinkinase exprimieren. Das Knochenmark dieser transgenen Tiere würde dann in letal bestrahlte Tiere transplantiert werden. Nach Angehen des Knochenmarkes würden diese Tiere mit Ganciclovir behandelt werden. Ganciclovir ist ein Virostatikum, das gegen Herpesviren eingesetzt wird. Dieses wird durch virale Kinasen (Thymidinkinasen) in Monophosphat und anschließend zu 5'-Triphosphat phosphoryliert. Dieses Nukleosid-Analogon wird in die virale DNA eingebaut und führt zum Kettenabbruch. Hierdurch werden alle transplantierten Knochenmarkszellen, die Kollagen bzw. Prokollagen exprimieren, abgetötet. Durch diese Methodik würden die zirkulierenden Fibrozyten zum gewünschten Zeitpunkt eliminiert. Es kann so der direkte Effekt dieser Zellen im Hypoxiemodell und weiteren Modellen betrachtet und untersucht werden.

Über die Erzeugung einer immortalisierten Zelllinie würden neue experimentelle Möglichkeiten geschaffen werden, da eine aufwändige Primärzellisolation vernachlässigt werden könnte. Allerdings wirft diese Aufgabe auch einige Probleme auf. Wie bei anderen Zelllinien auch stellt sich die Frage, inwiefern immortalisierte Zellen die eigentlichen

Eigenschaften und das Verhalten von Primärzellen zeigen. Da unter den Bedingungen einer immortalisierten Zelllinie grundlegende Eigenschaften verändert vorliegen und nicht mehr das eigentliche Bild von Primärzellen widerspiegeln. Aufgrund dessen müssten diese Zellen zunächst zureichend und gründlich charakterisiert und mit den Primärzeleigenschaften verglichen werden.

Zusammenfassung

Die Pathogenese der pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH) geht mit Remodeling-Prozessen der Pulmonalgefäße einher, die zur Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes und Widerstandes führen. Durch Hypertrophie und Hyperplasie glatter Muskelzellen und Fibroblasten sowie übermäßiger Deposition extrazellulärer Matrix (z.B. Kollagen) kommt es zu einer progressiven Lumenverengung.

Proliferation residenter Zellen sowie Rekrutierung hämatopoetischer Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften (zirkulierender Fibrozyten) tragen zum Remodeling der pulmonalen Widerstandsgefäße bei. Anti-proliferative Substanzen etablieren sich derzeit als potentieller neuer Therapiepfad für PAH-Patienten, da diese die übermäßige proliferative Stimulation durch Wachstumsfaktoren, wie PDGF, blockieren.

In dieser vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich eine positive Beeinflussung des Remodelings sowie die Induktion des reverse Remodelings (Rückführung der Veränderungen in etablierter Krankheit) durch den Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Imatinib im *in vivo* Hypoxie-induzierten PH-Modell gezeigt werden. Imatinib senkte wesentliche PH-relevante klinische, hämodynamische und histologische Parameter, wie die Ausprägung einer Rechtsherzhypertrophie, die Senkung des rechtventrikulären Drucks und den Muskularisierungsgrad der Pulmonalgefäße. Der Muskularisierungsgrad wurde erfolgreich erstmalig in dieser Arbeitsgruppe mittels Stereologie bestimmt, und zeigte eine gute Korrelation zu bereits publizierten Daten mit herkömmlicher Morphometrie-Messung der Pulmonalgefäße. Ebenso konnte auf Transkriptions- und Proteinebene eine Herabregulation der Expression des PDGF- β Rezeptors und CXCR4, einem Chemokinrezeptor, der für die Rekrutierung von zirkulierenden Fibrozyten wichtig ist, in Maus-Lungenhomogenaten festgestellt werden. Imatinib bewirkte eine signifikante Reduktion der Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten in pulmonale Widerstandsgefäße Hypoxie-exponierter Mäuse. Innerhalb dieser Arbeit konnten zirkulierende Fibrozyten erfolgreich aus humanen Blut isoliert und kultiviert werden. Es konnten die charakteristischen hämatopoetischen und mesenchymalen Marker auf den Zellen nachgewiesen werden. *In vitro* wurden die Zellen auf mRNA- und Proteinebene positiv auf die Expression PH-relevanter Rezeptoren (PDGFR β) getestet, ebenso konnte die Expression von CXCR4 bestätigt werden, welche bei der Rekrutierung aus dem Knochenmark von Bedeutung ist. Zirkulierende Fibrozyten induzierten

parakrin eine Proliferationsstimulation pulmonaler glatter Muskelzellen und Fibroblasten der Adventitia, was den negativen Einfluss der Fibrozyten im pulmonalen Gefäßsystem zusätzlich erklärt.

Summary

In pulmonary arterial hypertension (PAH), remodeling processes of pulmonary vessels cause an increase of pulmonary arterial pressure and resistance. Thickening of the vessel walls due to smooth muscle cell hyperplasia and extracellular matrix components, like collagens, leads to a narrowing of the lumen. In this process, the recruitment of circulating fibrocytes (CFs) from the blood to the vessels has been proposed. Proliferative processes are important during the pulmonary vascular remodeling. Targeted anti-proliferative substances are currently investigated as new therapeutic tools for PAH treatment. Increased expression and activity of growth factors like PDGF-B have been shown to be involved in the pathogenesis of PAH as well as PH in animal models. The treatment with a PDGFR β inhibitor can block these effects. In this work the anti-proliferative effects of Imatinib, a receptor tyrosine-kinase inhibitor of PDGF, c-kit and BCR-ABL, significantly decreased PH-relevant clinical, hemodynamic and histologic parameters, like right heart hypertrophy, right ventricular pressure and muscularization of pulmonary resistance vessels in hypoxia-exposed mice. For the first time the degree of muscularization was measured by stereology and showed good correlations to published data regarding morphometric measurement. On transcriptional and protein levels Imatinib decreased the mRNA and protein expression of the PDGFR β and CXCR4 in hypoxic lung homogenates. CXCR4 is a chemokine receptor important for the recruitment of CFs and was also detected on circulating fibrocytes in this project. There was a beneficial effect of Imatinib in terms of reduction of the recruitment of CFs to pulmonary resistance vessels in the hypoxia-induced mouse model. *In vitro* these cells were positive for PH-relevant receptors (PDGFR β). We found a role of paracrine pro-proliferative stimulation of smooth muscle cells and adventitial fibroblasts by CF *in vitro*, which likely contributes to remodeling process *in vivo*.

Abkürzungsverzeichnis

Δ Ct	Cycle treshold
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Buffy coat
BCR-ABL	Philadelphia Chromosom (breakpoint cluster region-Abelson)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic Adenosylmonophosphate)
CD34	Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary desoxyribonucleic acid)
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic Guanylatemonophosphate)
CF	Circulating fibrocyte
CML	chronisch myeloischer Leukämie
cpm	counts per minute
CXCL12/ SDF 1 alpha	Stromal-derived Factor
CXCR4	CXC Rezeptor 4
DMEM	Dubeccos Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DPBS	Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor

EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzym gekoppelter Immunadsorbtionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ELK	Mitglied der ETS Onkogen Familie
ET _A	Endothelin A
ET _B	Endothelin B
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (Fibroblast growth factor)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (Green fluorescent protein)
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HR	Herzfrequenz (Heart rate)
HSV-TK	Herpesvirus Thymidinkinase
ICH	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunopräzipitation
ITGAM	Integrin alpha M
LV	linker Ventrikel
MCT	Monocrotalin
MEK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase 1-Interagierendes Protein 1
mPAP	Mittlerer pulmonal-arterieller Druck
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid

PACES	Pulmonary Hypertension Combination study of Epoprostenol and Sildenafil
PAH	Pulmonal arterielle Hypertonie
PASMC	pulmonal arterielle glatte Muskelzellen
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBMC	mononukleäre zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pulmonale Hypertonie
p. K.	Positiv Kontrolle
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Drehzahl pro Minute (revolution per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (reverse transcriptase- polymerase chain reaction)
RV	rechter Ventrikel
RVEDP	rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck
RVP sys	Rechtsventrikulärer systolischer Druck
S	Septum

SAP	Serum Amyloid P
SAP	systemisch-arterieller Druck (systemic arterial pressure)
SBP sys	systolischer Blutdruck
SDS	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard Error of Mean
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung/ 0,1 % Tween
TGF α	transforming growth factor α
TGF β 1	transforming growth factor β 1
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIUMPH	TReprostinil Sodium Inhalation Used in the Management
ü. N.	über Nacht
VE	voll entsalzt
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
Vim	Vimentin
WB	Western Blot
ZFs	zirkulierende Fibrozyten

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Mechanismen der Pathogenese der pulmonal-arteriellen Hypertonie und daraus abgeleitete therapeutische Angriffspunkte (Humbert, Sitbon et al. 2004).....	6
Abbildung 2: Pathobiologie der pulmonalen Hypertonie.	7
Abbildung 3: Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen am Beispiel der PDGF Rezeptoren und ihre Inhibition durch Imatinib.	15
Abbildung 4: A) Strukturformel von Imatinib. B) Kristallstruktur der Tyrosinkinase c-ABL im Komplex mit Imatinib (Nagar 2007).	16
Abbildung 5: Pathomechanismen des vaskulären Remodelings in der Lunge unter Hypoxie und Beteiligung von Monozyten bzw. Fibrozyten (Stenmark, Davie et al. 2005).....	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung für die Isolation von PMBCs aus Buffy-Coats.....	33
Abbildung 7: Prinzip der Aufreinigung von Zellen mit Hilfe der indirekten, negativen Depletion über Dynalbeads und Antikörper (Invitrogen 2010).	35
Abbildung 8: Behandlungsgruppen für den 5-wöchigen Imatinibversuch.	47
Abbildung 9: Behandlungsgruppen für den 3-wöchigen Imatinibversuch.	47
Abbildung 10: Hypoxiekammer.....	48
Abbildung 11: Morphologie von humanen zirkulierenden Fibrozyten nach 7 (A und B) und 28 Tagen (C und D) Kultur.	51
Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von mesenchymalen und hämatopoetischen Markern auf humanen zirkulierenden Fibrozyten (7 Tage alt).	52
Abbildung 13: Expression von CXCR4 auf humanen zirkulierenden Fibrozyten.....	53
Abbildung 14: Charakterisierung von humanen glatten Muskelzellen aus Pulmonalarterien.53	
Abbildung 15: Expressionsprofil von Rezeptortyrosinkinasen und Liganden auf humanen zirkulierenden Fibrozyten.....	54
Abbildung 16: mRNA-Expression verschiedener Rezeptortyrosinkinasen auf Proteinebene. 55	
Abbildung 17: Konditioniertes Medium von zirkulierenden Fibrozyten beeinflusst die Proliferation von huPASMC.....	56
Abbildung 18: Imatinib inhibiert dosisabhängig die parakrine Stimulation der Proliferation von huPASMC und Fibroblasten der Adventitia durch konditioniertes ZF Medium <i>in vitro</i> . ..	57
Abbildung 19: Stereologische Vermessung der Muskularisierungsfläche pro Gefäß.....	59

Abbildung 20: Identifizierung von GFP/ Prokollagen 1A1 positiven Zellen in hypoxischen Mäuselungen (Konfokalmikroskopie).	60
Abbildung 21: Quantifizierung von doppelt positiven Zellen (Prokollagen 1a1 und GFP) in hypoxischen Mäuselungen.....	62
Abbildung 22: Hämodynamische Messung von Hypoxie induzierten PH Mäusen.....	63
Abbildung 23: Real-time-PCR für die Rezeptortyrosinkinasen, CXCR4 und ihren Liganden in Maus-Lungenhomogenaten.....	65
Abbildung 24: Expression PH relevanter Rezeptoren im Lungenhomogenat auf Proteinebene.	67
Abbildung 25: PDGF BB und SDF 1 alpha (CXCL12) Konzentration im Serum von PH-induzierten Mäusen(n = 6-8, Duplikate).	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick der bekannten Marker und sekretierten Faktoren von Fibrozyten (Metz 2003).....	18
Tabelle 2: Real time Primer für die Quantifizierung von humaner cDNA.	31
Tabelle 3: Real time Primer für die Quantifizierung von cDNA (Maus).	32
Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die Zelldepletion.	35
Tabelle 5: Färbeprotokoll für die Doppelfärbung mit Peroxidase (Maus):	42
Tabelle 6: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung (IF), Immunhistologische Färbung (H) und Western Blot (WB).	45

Literaturverzeichnis

Abe, R., S. C. Donnelly, et al. (2001). "Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites." J Immunol **166**(12): 7556-7562.

Aono, Y., Y. Nishioka, et al. (2009). "Inhibition of PDGF-Mediated Recruitment of Fibrocytes by Imatinib in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice." Am J Respir Crit Care Med **179**.

Arias-Stella, J. and M. Saldana (1963). "The Terminal Portion of the Pulmonary Arterial Tree in People Native to High Altitudes." Circulation **28**: 915-925.

Balasubramaniam, V., T. D. Le Cras, et al. (2003). "Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(5): L826-833.

Benayoun, L., A. Druilhe, et al. (2003). "Airway structural alterations selectively associated with severe asthma." Am J Respir Crit Care Med **167**(10): 1360-1368.

Bhatia, S., R. P. Frantz, et al. (2003). "Immediate and long-term hemodynamic and clinical effects of sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension receiving vasodilator therapy." Mayo Clin Proc **78**(10): 1207-1213.

Blaukovitsch, M., P. Zabel, et al. (2009). "Vasoproliferation and antiproliferative treatment options in pulmonary arterial hypertension." Recent Pat Cardiovasc Drug Discov **4**(2): 142-149.

Bucala, R., L. A. Spiegel, et al. (1994). "Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair." Mol Med **1**(1): 71-81.

Buchdunger, E., C. L. Cioffi, et al. (2000). "Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors." J Pharmacol Exp Ther **295**(1): 139-145.

Campbell, A. I., Y. Zhao, et al. (2001). "Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension." Circulation **104**(18): 2242-2248.

Capdeville, R., E. Buchdunger, et al. (2002). "Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug." Nat Rev Drug Discov **1**(7): 493-502.

Channick, R. N., G. Simonneau, et al. (2001). "Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study." Lancet **358**(9288): 1119-1123.

Chauhan, H., A. Abraham, et al. (2003). "There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions." J Clin Pathol **56**(4): 271-276.

Chesney, J., M. Bacher, et al. (1997). "The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6307-6312.

Chesney, J., C. Metz, et al. (1998). "Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes." J Immunol **160**(1): 419-425.

Clapp, L. H., P. Finney, et al. (2002). "Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(2): 194-201.

Clozel, M. and G. A. Gray (1995). "Are there different ETB receptors mediating constriction and relaxation?" J Cardiovasc Pharmacol **26 Suppl 3**: S262-264.

Cowper, S. E., R. Bucala, et al. (2005). "Case 35-2004: nephrogenic fibrosing dermopathy." N Engl J Med **352**(16): 1723-1724; author reply 1723-1724.

D'Alonzo, G. E., R. J. Barst, et al. (1991). "Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry." Ann Intern Med **115**(5): 343-349.

Dagher, R., M. Cohen, et al. (2002). "Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors." Clin Cancer Res **8**(10): 3034-3038.

Dumitrescu, D., H. A. Ghofrani, et al. (2009). "[Update: Current clinical developments in pulmonary hypertension]." Dtsch Med Wochenschr **134 Suppl 5**: S160-163.

Frid, M. G., J. A. Brunetti, et al. (2006). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage." Am J Pathol **168**(2): 659-669.

Galie, N., H. A. Ghofrani, et al. (2005). "Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **353**(20): 2148-2157.

Galie, N., M. M. Hoeper, et al. (2009). "Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension." Eur Respir J **34**(6): 1219-1263.

Gamboa, R. and E. Marticorena (1972). "The ductus arteriosus in the newborn infant at high altitude." Vasa **1**(3): 192-195.

Garcia Hernandez, F. J., M. J. Castillo Palma, et al. (2008). "[Experience with imatinib to treat pulmonary arterial hypertension]." Arch Bronconeumol **44**(12): 689-691.

Gewurz, H., X. H. Zhang, et al. (1995). "Structure and function of the pentraxins." Curr Opin Immunol **7**(1): 54-64.

Ghofrani, H. A., F. Rose, et al. (2003). "Oral sildenafil as long-term adjunct therapy to inhaled iloprost in severe pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **42**(1): 158-164.

Ghofrani, H. A., W. Seeger, et al. (2005). "Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **353**(13): 1412-1413.

Giaid, A., M. Yanagisawa, et al. (1993). "Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension." N Engl J Med **328**(24): 1732-1739.

Gomperts, B. N. and R. M. Strieter (2007). "Fibrocytes in lung disease." J Leukoc Biol **82**(3): 449-456.

Herzog, E. L. and R. Bucala (2010). "Fibrocytes in health and disease." Exp Hematol.

Hoepfer, M. M., N. Taha, et al. (2003). "Bosentan treatment in patients with primary pulmonary hypertension receiving nonparenteral prostanoids." Eur Respir J **22**(2): 330-334.

Humbert, M., N. W. Morrell, et al. (2004). "Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **43**(12 Suppl S): 13S-24S.

Humbert, M., O. Sitbon, et al. (2004). "Treatment of pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **351**(14): 1425-1436.

Hutchinson, W. L., E. Hohenester, et al. (2000). "Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum." Mol Med **6**(6): 482-493.

Iqbal, J., R. Sanghia, et al. (2005). "Endothelin receptor antagonists: an overview of their synthesis and structure-activity relationship." Mini Rev Med Chem **5**(4): 381-408.

Itoh, T., N. Nagaya, et al. (2004). "A combination of oral sildenafil and beraprost ameliorates pulmonary hypertension in rats." Am J Respir Crit Care Med **169**(1): 34-38.

Janssen, W., H. A. Ghofrani, et al. (2009). "[Update: Preclinical developments for the treatment of pulmonary arterial hypertension]." Dtsch Med Wochenschr **134 Suppl 5**: S157-159.

Johnson, P. R., M. Roth, et al. (2001). "Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma." Am J Respir Crit Care Med **164**(3): 474-477.

Jones, P. L., K. N. Cowan, et al. (1997). "Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease." Am J Pathol **150**(4): 1349-1360.

Klein, M., R. T. Schermuly, et al. (2010). "Anti-Remodeling Attempts in the Therapy for Pulmonary Hypertension." Pneumologie **64**: 18-19.

Klein, M., R. T. Schermuly, et al. (2008). "Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling." Circulation **118**(20): 2081-2090.

Knighton, D. R., J. H. Zheng, et al. (1991). "Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase." Science **253**(5018): 407-414.

Lalich, J. J. and L. Merkow (1961). "Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*." Lab Invest **10**: 744-750.

Luster, A. D., R. Alon, et al. (2005). "Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets." Nat Immunol **6**(12): 1182-1190.

Marsboom, G. and S. Janssens (2004). "Models for pulmonary hypertension." Elsevier Ltd.

McLaughlin, V. V., R. L. Benza, et al. (2010). "Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled clinical trial." J Am Coll Cardiol **55**(18): 1915-1922.

Mehrad, B., M. D. Burdick, et al. (2007). "Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease." Biochem Biophys Res Commun **353**(1): 104-108.

Metz, C. N. (2003). "Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing." Cell Mol Life Sci **60**(7): 1342-1350.

Monnet, E. and J. C. Chachques (2005). "Animal models of heart failure: what is new?" Ann Thorac Surg **79**(4): 1445-1453.

Moore, B. B., J. E. Kolodsick, et al. (2005). "CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury." Am J Pathol **166**(3): 675-684.

Moreno-Vinasco, L., M. Gomberg-Maitland, et al. (2008). "Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension." Physiol Genomics **33**(2): 278-291.

Murdoch, C. (2000). "CXCR4: chemokine receptor extraordinaire." Immunol Rev **177**: 175-184.

Nagar, B. (2007). "c-Abl tyrosine kinase and inhibition by the cancer drug imatinib (Gleevec/STI-571)." J Nutr **137**(6 Suppl 1): 1518S-1523S; discussion 1548S.

Nikam, V. S., R. T. Schermuly, et al. (2010). "Treprostinil inhibits the recruitment of bone marrow derived circulating fibrocytes in chronic hypoxic pulmonary hypertension." Eur Respir J.

Perros, F., D. Montani, et al. (2008). "Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **178**(1): 81-88.

Phillips, R. J., M. D. Burdick, et al. (2004). "Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis." J Clin Invest **114**(3): 438-446.

Pietra, G. G., F. Capron, et al. (2004). "Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol **43**(12 Suppl S): 25S-32S.

Pilling, D., C. D. Buckley, et al. (2003). "Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P." J Immunol **171**(10): 5537-5546.

Quan, T. E. and R. Bucala (2007). "Culture and analysis of circulating fibrocytes." Methods Mol Med **135**: 423-434.

Quan, T. E., S. Cowper, et al. (2004). "Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood." Int J Biochem Cell Biol **36**(4): 598-606.

Rabinovitch, M. (2008). "Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension." J Clin Invest **118**(7): 2372-2379.

Rich, S., E. Kaufmann, et al. (1992). "The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension." N Engl J Med **327**(2): 76-81.

Rosenkranz, S. (2008). "[Novel concepts in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension]." Dtsch Med Wochenschr **133 Suppl 6**: S167-169.

Rubin, L. J., D. B. Badesch, et al. (2002). "Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **346**(12): 896-903.

Rubin, L. J. and S. Roux (2002). "Bosentan: a dual endothelin receptor antagonist." Expert Opin Investig Drugs **11**(7): 991-1002.

Sastry, B. K. (2006). "Pharmacologic treatment for pulmonary arterial hypertension." Curr Opin Cardiol **21**(6): 561-568.

Saunders, R., S. Siddiqui, et al. (2009). "Fibrocyte localization to the airway smooth muscle is a feature of asthma." J Allergy Clin Immunol **123**(2): 376-384.

Schermuly, R. T., E. Dony, et al. (2005). "Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition." J Clin Invest **115**(10): 2811-2821.

Schermuly, R. T., K. P. Kreisselmeier, et al. (2004). "Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." Am J Respir Crit Care Med **169**(1): 39-45.

Schmidt, M., G. Sun, et al. (2003). "Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma." J Immunol **171**(1): 380-389.

Shchemelinin, I., L. Sefc, et al. (2006). "Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases." Folia Biol (Praha) **52**(3): 81-100.

Simonneau, G., I. M. Robbins, et al. (2009). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S43-54.

Simonneau, G., L. J. Rubin, et al. (2008). "Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized trial." Ann Intern Med **149**(8): 521-530.

Sitbon, O., M. Humbert, et al. (1998). "Inhaled nitric oxide as a screening agent for safely identifying responders to oral calcium-channel blockers in primary pulmonary hypertension." Eur Respir J **12**(2): 265-270.

Sommer, N., A. Dietrich, et al. (2008). "Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms." Eur Respir J **32**(6): 1639-1651.

Souza, R., O. Sitbon, et al. (2006). "Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension." Thorax **61**(8): 736.

Steel, D. M. and A. S. Whitehead (1994). "The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein." Immunol Today **15**(2): 81-88.

Stenmark, K. R., N. J. Davie, et al. (2005). "Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation." J Appl Physiol **98**(2): 715-721.

ten Freyhaus, H., D. Dumitrescu, et al. (2009). "Significant improvement of right ventricular function by imatinib mesylate in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension." Clin Res Cardiol **98**(4): 265-267.

Trian, T., G. Benard, et al. (2007). "Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma." J Exp Med **204**(13): 3173-3181.

Ushio-Fukai, M., K. K. Griendling, et al. (2001). "Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(4): 489-495.

Vannella, K. M., T. R. McMillan, et al. (2007). "Cysteinyl leukotrienes are autocrine and paracrine regulators of fibrocyte function." J Immunol **179**(11): 7883-7890.

Varcoe, R. L., M. Mikhail, et al. (2006). "The role of the fibrocyte in intimal hyperplasia." J Thromb Haemost **4**(5): 1125-1133.

Voelkel, N. F. and R. M. Tuder (2000). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease?" J Clin Invest **106**(6): 733-738.

W. Seeger and H. J. Schäfers (2001). Pulmonale Hypertonie. Berlin, Wien, Oxford, Blackwell Wissenschafts-Verlag.

Wang, J. F., H. Jiao, et al. (2007). "Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts." Wound Repair Regen **15**(1): 113-121.

Weissmann, N., F. Grimminger, et al. (2001). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(2): L314-317.

Wilhelm, S., C. Carter, et al. (2006). "Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer." Nat Rev Drug Discov **5**(10): 835-844.

Wilhelm, S. M., L. Adnane, et al. (2008). "Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling." Mol Cancer Ther **7**(10): 3129-3140.

Woodruff, P. G., G. M. Dolganov, et al. (2004). "Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression." Am J Respir Crit Care Med **169**(9): 1001-1006.

Xin, X., A. D. Johnson, et al. (1994). "The predominant form of fibroblast growth factor receptor expressed by proliferating human arterial smooth muscle cells in culture is type I." Biochem Biophys Res Commun **204**(2): 557-564.

Yang, L., P. G. Scott, et al. (2005). "Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar." Wound Repair Regen **13**(4): 398-404.

Yu, Y., M. Sweeney, et al. (2003). "PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression." Am J Physiol Cell Physiol **284**(2): C316-330.

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Seeger dafür danken, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen durfte, des Weiteren danke ich ihm für die vielen Ideen, Anregungen und seinem Engagement für das Projekt.

Zudem möchte ich meinen beiden Betreuern für die intensive und kritische Betreuung danken. Herrn Dr. Voswinckel danke ich für die Vergabe dieses aktuellen Themas und die gute Betreuung während meiner Doktorarbeit, sowie die Möglichkeit mein Thema auf nationalen und internationalen Kongressen vorstellen zu dürfen. Herrn Prof. Dr. Claus danke ich für die Betreuung meiner Arbeit im Fachbereich der Biologie und die Zeit, welche er sich für die Besprechung meines Themas genommen hat

Für die nette Arbeitsatmosphäre und netten Gespräche, auch außerhalb der Arbeit danke ich meiner Arbeitsgruppe, den „Voswinckels“ und Prof. Dr. Schermuly und seiner Arbeitsgruppe. Danke an Frau Dr. Soni Pullamsetti für die konstruktive Kritik und Hilfe während der Proliferationsassays.

Für die Nutzung der Hypoxiekammer in Gießen, danke ich Herrn Prof. Dr. Norbert Weissmann.

Mein besonderer Dank geht an Sven Becker, Wiebke Janssen, Jens-Christian Wolff und Katrin Ahlbrecht, ohne eure Mithilfe und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für eure Geduld, die vielen Ideen und guten Brainstormings, die mir geholfen haben meine Experimente zu realisieren und unklares klarer zu machen.

Dann möchte ich auch noch meinen beiden Annes, meinen „Bayreuth Mädels“ (Sabine, Katrin, Anja und Katja) und Franzi danken.

Ihr habt mich immer wieder daran erinnert, dass es auch noch was anderes gibt außer der Doktorarbeit. Viel Glück wünsche ich euch bei eurer weiteren Arbeit.

Ohne meine Familie wäre das alles gar nicht möglich gewesen, deshalb gilt euch, Mama, Papa und Nadine mein ganz besonderer Dank.

Am meisten danke ich dir Jürgen für deine unermüdliche Unterstützung und Geduld, du bist mein Ein und Alles.

Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche gekennzeichnet.

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.“