

Charakterisierung der Expression des Kolonie-stimulierenden  
Faktor-1 Rezeptors in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen

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

vorgelegt von Merlin Dolf Nathan Reinhardt  
aus Berlin

Gießen 2018



Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Seeger

Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Gutachter: Prof. Dr. Fahrer

Tag der Disputation: 09.08.2018

# Inhalt

<b>CHARAKTERISIERUNG DER EXPRESSION DES KOLONIE-STIMULIERENDEN FAKTOR-1 REZEPTORS IN PULMONALARTERIELLEN GLATTEN MUSKELZELLEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 AUFBAU UND FUNKTION DES MENSCHLICHEN ATEMAPPARATS .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 DIE LUNGENPERFUSION UND DER MENSCHLICHE BLUTKREISLAUF .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 DER PHYSIOLOGISCHE GEFÄßAUFBAU.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 ALLGEMEINES ZUR PULMONALEN HYPERTONIE (PH).....</b>	<b>9</b>
1.4.1 KLINIK UND DIAGNOSTIK DER PH .....	11
1.4.2 PATHOLOGIE.....	12
1.4.3 HISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN .....	14
1.4.4 THERAPIE.....	15
<b>1.5 CHRONISCH OBSTRUKTIVE LUNGENERKRANKUNG.....</b>	<b>16</b>
1.5.1 PATHOGENESE .....	16
1.5.2 COPD ASSOZIIERTE PH UND DEREN THERAPIE .....	17
<b>1.6 IDIOPATHISCHE PULMONALARTERIELLE HYPERTONIE (IPAH) .....</b>	<b>17</b>
<b>1.7 DIE PULMONALE HYPERTONIE IM TIERMODELL .....</b>	<b>18</b>
<b>1.8 DER KOLONIE-STIMULIERENDER FAKTOR-1 REZEPTOR (CSF-1R) .....</b>	<b>19</b>
1.8.1 FUNKTIONSWEISE UND VORKOMMEN DES CSF-1R .....	20
1.8.2 DAS CSF-1R-SIGNAL UND DESSEN EINFLUSS AUF VERSCHIEDENE KRANKHEITEN .....	21
<b>1.9 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....</b>	<b>22</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 VERWENDETE GERÄTE.....</b>	<b>22</b>
2.1.1 VERWENDETE MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN .....	23
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR .....	26
2.1.3 ZUBEHÖRSETS UND ASSAYS .....	26
2.1.4 ANTIKÖRPER.....	27
2.1.5 SOFTWARE.....	27

<b>2.2</b>	<b>BEHANDLUNG DER VERSUCHSTIERE.....</b>	<b>28</b>
2.2.1	MAUS-MODELL .....	28
2.2.1.1	Chronisches Hypoxie-Maus-Modell.....	28
2.2.1.2	Rauch-Maus-Modell .....	29
2.2.2	MONOCROTALIN-RATTEN-MODELL .....	30
<b>2.3</b>	<b>BESCHREIBUNG DER PATIENTENPOPULATION .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>ZELLKULTUR .....</b>	<b>31</b>
2.4.1	ISOLATION VON PULMONALARTERIELLEN GLATTEN MUSKELZELLEN (PASCs) .....	31
2.4.2	ABLAUF DER ZELLKULTIVIERUNG .....	31
2.4.3	SPLITTEN DER ZELLEN .....	32
2.4.4	BEHANDLUNG HUMANER PASCs IN HYPOXIE .....	32
<b>2.5</b>	<b>FUNKTIONELLE TESTS.....</b>	<b>33</b>
2.5.1	MIGRATIONSASSAY .....	33
2.5.2	PROLIFERATIONSASSAY .....	33
<b>2.6</b>	<b>QUANTITATIVE ECHTZEIT-POLYMERASE-KETTENREAKTION (QPCR).....</b>	<b>34</b>
2.6.1	VERWENDETE PRIMER .....	34
2.6.2	RNA-ISOLIERUNG AUS ZELLEN UND HOMOGENAT.....	35
2.6.3	ABLAUF DER QPCR .....	36
2.6.4	AUSWERTUNG DER QPCR.....	37
<b>2.7</b>	<b>WESTERN BLOT ANALYSE (WB) .....</b>	<b>37</b>
2.7.1	PROTEINISOLIERUNG AUS ZELLEN .....	38
2.7.2	PROTEINISOLIERUNG AUS GEWEBEHOMOGENAT .....	38
2.7.3	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG.....	38
2.7.4	DURCHFÜHRUNG DER WB .....	38
2.7.5	POSITIV- UND NEGATIVKONTROLLE .....	40
2.7.6	AUSWERTUNG.....	41
<b>2.8</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMIE.....</b>	<b>42</b>
2.8.1	ANFERTIGUNG DER PRÄPARATE .....	43
2.8.2	DOPPELFÄRBUNG MIT ALPHA-SMOOTH-MUSCLE-ACTIN UND VON- WILLEBRAND-FAKTOR.....	43
2.8.3	CSF-1R-SPEZIFISCHE FÄRBUNG NACH ALKALISCHER-PHOSPHATASE- METHODE (AP-METHODE).....	44
2.8.4	POSITIV- UND NEGATIVKONTROLLEN .....	45

2.8.5	AUSWERTUNG DER PRÄPARATE.....	46
<b>2.9</b>	<b>STATISTIK .....</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>AUSWERTUNG DER QPCR .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2</b>	<b>AUSWERTUNG DER WESTERN BLOT ANALYSE.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3</b>	<b>AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG .....</b>	<b>54</b>
3.3.1	VALIDIERUNG DES ANTIKÖRPERS .....	54
3.3.2	LOKALISIERUNG DER ZIELSTRUKTUR MITTELS DOPPELFÄRBUNG.....	55
3.3.3	AUSWERTUNG DER CSF-1R-SPEZIFISCHEN FÄRBUNG .....	59
<b>3.4</b>	<b>FUNKTIONELLE ASSAYS .....</b>	<b>61</b>
3.4.1	AUSWERTUNG DES PROLIFERATIONSASSAYS .....	61
3.4.2	AUSWERTUNG DES MIGRATIONSASSAYS .....	62
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>EINORDNUNG DER ERGEBNISSE .....</b>	<b>65</b>
4.2.1	MÖGLICHER PATHOPHYSIOLOGISCHER CSF-1R-SIGNALWEG.....	69
<b>4.3</b>	<b>THERAPEUTISCHE ANSATZPUNKTE .....</b>	<b>73</b>
<b>4.4</b>	<b>SYSTEMKRITIK UND AUSBLICK .....</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>5.1</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>84</b>
<b>10</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>84</b>

<b>11 TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
<b>12 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>90</b>
<b>13 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>94</b>

# 1 Einleitung

Das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie (PH) beschreibt eine komplexe Erkrankung der Lungengefäße mit unterschiedlicher Genese. Alle Formen der PH haben eine Einengung der pulmonalen Gefäße insbesondere aufgrund einer pathologischen Wandverdickung gemeinsam. Diese erschwert den Blutfluss und erhöht die Belastung des rechten Ventrikels. Daher sinkt die Leistungsfähigkeit eines Patienten mit PH und Symptome wie Schwindel, Belastungsdyspnoe und Brustschmerzen treten auf <sup>4</sup>. Der progrediente Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) führt in der Folge zur Überlastung des rechten Ventrikels mit möglicher Todesfolge. Bei der PH handelt es sich folglich um eine fatale Erkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität <sup>5</sup>. Die derzeitige therapeutische Intervention kann das Fortschreiten der Krankheit zwar verlangsamen, aber nicht verhindern. Um das Überleben und die Lebensqualität von Patienten mit PH dauerhaft zu verbessern, sind daher neue Therapieansätze dringend erforderlich. Viele Formen der PH weisen Wandverdickungen in den Pulmonalarterien und -arteriolen mit starker Proliferation von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) auf. Dies lenkte im Vorfeld der Arbeit die Aufmerksamkeit auf proliferative Faktoren und deren Rezeptoren. Das Wissen um die Funktion, die Bedeutung und die potentielle Nutzung des Kolonie-stimulierenden Faktor-1 Rezeptors (CSF-1R) als Zielstruktur der Therapie bei verschiedenen zellproliferativen Erkrankungen machten diesen zu einem vielversprechenden Target. Jedoch war die CSF-1R-Expression in PASMCs bislang nicht beschrieben worden. Daher geht diese Arbeit der Frage nach, ob PASMCs den CSF-1R exprimieren und ob dieser Rezeptor eine funktionelle Bedeutung für PASMCs besitzt, um eventuell einen möglichen neuen Therapieansatz für die Behandlung der PH aufzuzeigen.

## 1.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Atemapparats

Die menschliche Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln, die in zwei Lungenlappen links und in drei Lungenlappen rechts unterteilt sind. Diese Lungenlappen sind wiederum in Lungensegmente unterteilt, die das Versorgungsgebiet einer Segmentarterie und des dazugehörigen Segmentbronchus beschreiben. Von diesen Lungensegmenten gibt es zehn im rechten und neun im linken Lungenlappen. Der menschliche Atemapparat besteht aus Nasopharynx, Oropharynx, Larynx, der Trachea,



dem sich verzweigenden Bronchialsystem und den Alveolen, in denen der Gasaustausch in der Lunge stattfindet <sup>6</sup>, wie in **Abbildung 1** dargestellt. Der Mensch besitzt circa 300 Millionen Alveolen mit einem Durchmesser von jeweils 0,3 mm. Dies ergibt eine Lungenoberfläche von etwa 120 m<sup>2</sup>, die für den Gasaustausch bedeutend ist <sup>7</sup>. Dabei wird der alveolären Luft durch das Blut in den Kapillaren ständig O<sub>2</sub> entzogen und CO<sub>2</sub> hinzugefügt. Um die Zusammensetzung der alveolären Atemluft konstant zu halten, muss diese daher permanent erneuert werden <sup>8</sup>. Dies geschieht über die Inspiration und die Expiration. Bei der Inspiration wird durch Anheben des Brustkorbs und Kontraktion der Zwerchfellmuskulatur ein Unterdruck relativ zum atmosphärischen Druck in den Alveolen erzeugt, wodurch Luft in den Alveolarraum gelangt. Bei der Expiration erschlafft die Zwerchfellmuskulatur und der Brustkorb senkt sich wieder. Dadurch wird ein intrapulmonaler Überdruck erzeugt und die Luft aus der Lunge an die Umgebung abgegeben <sup>7,8</sup>.

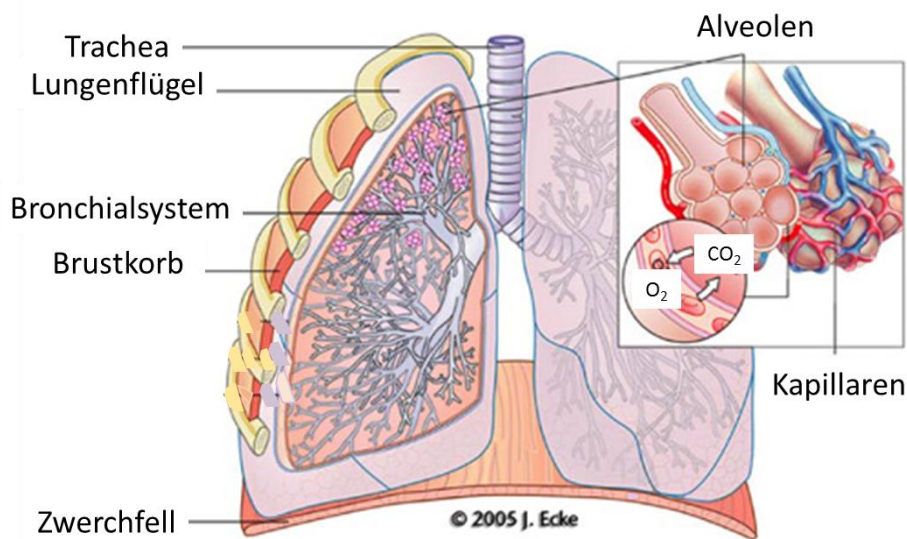


Abbildung 1 - **Schematische Darstellung der menschlichen Lunge** modifiziert nach J. Ecke <sup>2</sup>. Gezeigt werden die Trachea mit dem sich anschließenden Bronchialsystem innerhalb des Brustkorbes, sowie der O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Austausch zwischen Alveolen und Kapillaren.

## 1.2 Die Lungenperfusion und der menschliche Blutkreislauf

Im menschlichen Blutkreislauf führen die Arterien das Blut per definitionem vom Herzen weg und die Venen das Blut zum Herzen zurück. Sauerstoffarmes Blut gelangt über die Vena cava inferior und superior in den rechten Vorhof, von dort über den rechten Ventrikel in den Truncus pulmonalis und schließlich über die beiden

Pulmonalarterien in den arteriellen Teil des Lungenkreislaufs <sup>6</sup>. Dort besitzt das Blut einen O<sub>2</sub>-Partialdruck (P<sub>O<sub>2</sub></sub>) von ca. 40 mmHg und einen CO<sub>2</sub>-Partialdruck (P<sub>CO<sub>2</sub></sub>) von ca. 46 mmHg <sup>8</sup>. In den Lungenkapillaren findet der Gasaustausch per Diffusion über eine Diffusionsstrecke von ca. 1-2 µm statt, welche von Typ-1-Pneumozyten, Endothelzellen und deren gemeinsamer Basallamina gebildet wird <sup>9</sup>. Die treibende Kraft beim Gasaustausch sind die Partialdruckunterschiede. Die Partialdrücke im Blut gleichen sich während der Passage durch die Lungenkapillaren sehr rasch an die Partialdrücke in den Alveolen an, wodurch nach der Passage durch die Lungenkapillaren im mittlerweile sauerstoffreichen Blut der P<sub>O<sub>2</sub></sub> 100 mmHg und der P<sub>CO<sub>2</sub></sub> 40 mmHg beträgt <sup>8</sup>. Die hypoxische Vasokonstriktion sorgt beim lungengesunden Patienten durch eine Vasokonstriktion in den pulmonalen Widerstandsgefäßen dafür, dass nur gut belüftete Lungenareale auch gut perfundiert werden. Das Ventilations-Perfusions-Verhältnis wird dadurch optimiert. Über die Venae pulmonales gelangt das sauerstoffreiche Blut in den linken Vorhof, von dort in den linken Ventrikel und schließlich über die Aorta in den großen Körperkreislauf <sup>6</sup>. Dort beträgt der P<sub>O<sub>2</sub></sub> auch bei Gesunden allerdings meist nur noch 90 – 95 mmHg. Dazu tragen physiologisch der Zufluss sauerstoffarmen Blutes aus den Vasa privata der Lunge in die Venae pulmonales und Inhomogenitäten des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses bei. Der arterielle P<sub>O<sub>2</sub></sub> kann im Alter aber auch aufgrund von Lungenerkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH) auf unter 70 mmHg absinken <sup>10</sup>.

### 1.3 Der physiologische Gefäßaufbau

Das menschliche Gefäßsystem lässt sich in Arterien, Venen und der Endstrombahn mit Arteriolen, Kapillaren sowie Venolen untergliedern. Die Arterien zeigen in der Regel eine Dreischichtung mit Intima, Media und Adventitia, was in **Abbildung 2** schematisch zu sehen ist. Die Intima besteht aus einer Endothelzellschicht und deren Basalmembran. Darauf folgt die Tunica elastica interna und die Media, die vor allem von glatten Muskelzellen gebildet wird. Die Media reguliert mit ihren Muskelzellen über Vasodilatation bzw. -konstriktion die Gefäßweite und somit den Blutdruck und die Versorgung des nachfolgenden Gewebes. Die Adventitia als äußerste Schicht wird durch die Tunica elastica externa von der Media getrennt <sup>9</sup>. Sie bindet das Gefäß in die jeweilige Umgebung ein und enthält zudem Gefäße, Kollagenfasern und vegetative

Nerven. Die Venen haben grundsätzlich den gleichen Aufbau wie die Arterien. Sie unterscheiden sich von den Arterien lediglich durch die meist lockerer angelegten Bündel glatter Muskelzellen in der Media und das Fehlen der Tunica elastica interna. Die Gefäße der Endstrombahn zeichnen sich durch ihre sehr dünne oder fehlende Media und ihr kontinuierliches oder gar fenestriertes bis diskontinuierliches Endothel aus, was den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe insbesondere in den Kapillaren verschiedenster Organe auf unterschiedliche Weise ermöglicht <sup>9</sup>.

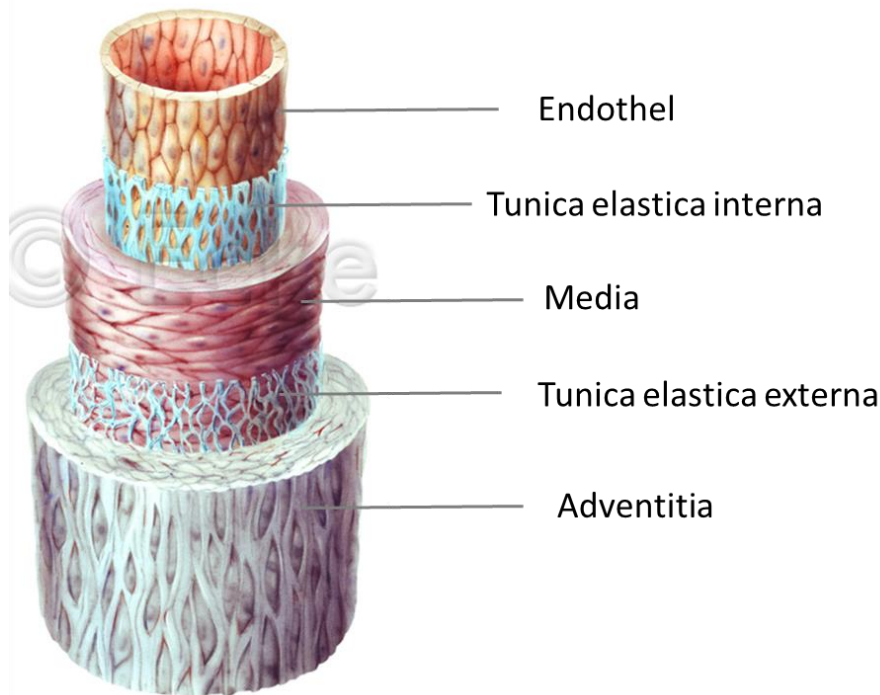


Abbildung 2 – **Schematischer Wandaufbau einer Arterie** modifiziert nach J. Ecke <sup>1</sup>. Zu sehen ist die typische Dreischichtung einer Arterie mit Endothel, Media und Adventitia, welche von der Tunica elastica interna und externa voneinander abgegrenzt werden.

#### 1.4 Allgemeines zur pulmonalen Hypertonie (PH)

Von einer pulmonalen Hypertonie spricht man per definitionem bei einer Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Mitteldrucks (mPAP) in Ruhe von über 25 mmHg beziehungsweise des systolischen PAP (sPAP) von über 50 mmHg <sup>4,11,12</sup>. Physiologisch liegt der mPAP bei etwa 10 mmHg und der sPAP bei etwa 20 mmHg <sup>10</sup>. Symptome der PH sind unter anderem Belastungsdyspnoe, Schwindel, verminderte Leistungsfähigkeit, Ödeme und Brustschmerzen <sup>4</sup>. Weltweit leiden bis zu 100 Millionen Menschen an PH <sup>13</sup> und die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit PH liegt nach Diagnosestellung ohne

Therapie bei unter 3 Jahren <sup>4</sup>. Bei Therapieerfolg liegt die 3-Jahres-Überlebensrate bei etwa 65-75% <sup>4</sup> und die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 50% <sup>14</sup>. Positiv beeinflusst wird die Krankheitsentwicklung von einem niedrigen mPAP und einer guten Kompensationsfähigkeit des Herzens <sup>3,4,10,15</sup>. Die Ursachen für die Entstehung der PH sind äußerst verschieden und dienen somit der Klassifikation der PH-Subtypen nach Nizza 2013 <sup>16,17</sup>:

## 1. Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)

### 1.1 Idiopathische PAH (IPAH)

### 1.2 Hereditäre PAH (FPAH)

#### 1.2.1 bone morphogenic protein 2 Rezeptor (BMP-2R)

#### 1.2.2 activin receptor-like kinase 1 (ALK-1), Endoglin, Smad9, Caveolin (CAV1)

#### 1.2.3 Unbekannt

### 1.3 Medikamenten- oder toxininduziert

### 1.4 Assoziiert mit

#### 1.4.1 Bindegewebserkrankung

#### 1.4.2 HIV-Infektion

#### 1.4.3 portaler Hypertension

#### 1.4.4 angeborenem Herzfehler

#### 1.4.5 Schistosomiasis

#### 1' Pulmonale venookklusive Erkrankung u./o. pulmonalkapilläre Hämangiomatose

#### 1'' Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)

## 2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankung

### 2.1 Linksventrikuläre systolische Dysfunktion

### 2.2 Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion

### 2.3 Klappenerkrankung

### 2.4 Kongenitale/erworbene Ein-/Ausflusstraktobstruktion des linken Herzens und kongenitale Kardiomyopathien

- 3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie
  - 3.1 Chronische obstruktive Lungenerkrankungen (COPD)
  - 3.2 Interstitielle Lungenerkrankung
  - 3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktivem/obstruktivem Muster
  - 3.4 Schlafbezogene Atemstörungen
  - 3.5 Alveoläre Hypoventilationssyndrome
  - 3.6 Chronischer Aufenthalt in großer Höhe
  - 3.7 Pulmonale Fehlentwicklungen
- 4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
- 5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen
  - 5.1 Hämatologische Erkrankungen: chronisch-hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
  - 5.2 Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Histiozytose
  - 5.3 Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheiten, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
  - 5.4 Andere: tumoröse Obstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz, segmentale PH

#### **1.4.1 Klinik und Diagnostik der PH**

Bei der PH wird zwischen einem akuten und einem chronischen Verlauf unterschieden<sup>4</sup>. Die häufigste Ursache für die akute PH ist die Lungenembolie<sup>4</sup>. Dabei löst sich ein Embolus aus dem venösen Stromgebiet und verschließt eine Lungenarterie. Der PAP steigt infolgedessen sehr rasch auf Werte bis zu 40 mmHg an<sup>10</sup>. Der rechte Ventrikel reagiert auf die erhöhte Nachlast mit Dilatation, Insuffizienz und Abnahme des Herzzeitvolumens. Dieser Vorgang kann schließlich zum rasch eintretenden kardiogenen Schock führen. Bei der chronischen PH dagegen passt sich der Körper des Erkrankten über lange Zeit an den langsam fortschreitenden Anstieg des PAP an<sup>3,10</sup>. In der Folge meint das Akronym PH die chronische Pulmonale Hypertonie. Daher sind die oben genannten Symptome anfangs nur diskret ausgeprägt und zudem sehr

unspezifisch, was eine frühe Diagnosestellung erschwert. Da es bei der PH aber zu irreversiblen Gefäßveränderungen kommt, verschlechtert sich die Prognose der PH durch die meist späte Erstdiagnose weiter <sup>4,11,18</sup>. Bei der Diagnostik sind gestaute Halsvenen, ein lauter zweiter Herzton über der Pulmonalklappe und insbesondere Zeichen einer Rechtsherzhypertrophie wegweisend. Die Echokardiographie, die MRT und die PET-CT lassen eine gute bildgebende Beurteilung des Auswurfs, der Wandstärke sowie des Volumens des rechten Ventrikels zu <sup>15</sup>. Zur weiteren Diagnostik gehören ein 6-Minuten-Geh-Test mit Blutgasanalyse sowie eine Dopplersonographie zur Abschätzung des sPAP. Bei idiopathischer PH oder nicht behandelbarer Grunderkrankung sollte eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung erfolgen, um eine PH sicher diagnostizieren zu können. PH-Patienten werden nach Diagnosestellung neben der oben gezeigten Nizza-Klassifikation in funktionelle Stadien der Klassen 1-4 eingeteilt, wobei insbesondere die Auswirkung der Krankheit auf den Alltag des Patienten berücksichtigt wird. In Klasse 1 zeigt der Patient keine Symptome. Ein Patient der Klasse 2 zeigt gelegentlich Schwindel und Kurzatmigkeit bei Bewegung. In Klasse 3 treten diese Beschwerden bei leichter Aktivität und in Klasse 4 bereits in Ruhe auf <sup>14,19</sup>.

#### **1.4.2 Pathologie**

Nach dem Ort der Manifestation wird bei der PH nach Nizza unter anderem zwischen der präkapillären, arteriellen und der postkapillären, venösen Form unterschieden. Letztere wird insbesondere mit Fehlfunktionen des linken Herzens in Verbindung gebracht und in dieser Arbeit nicht weiter behandelt. Der initiale Auslöser der PH ist unbekannt, doch spielen erworbene Infektionen wie die Schistosomiasis <sup>20</sup>, genetische Faktoren wie die Mutation des *bone morphogenic protein 2* Rezeptors (BMP-2R) <sup>21</sup> und epigenetische Faktoren eine große Rolle <sup>22</sup>. Die multifaktorielle Genese der PH zeigt sich zudem im Ausmaß der Erkrankung, welches bei gleichem Stimulus mild bis schwerwiegend sein kann <sup>23-25</sup>. Bei allen PH-Formen kann es jedoch durch chronische Hypoxie, Inflammation, Virusinfektion, mechanische Erweiterung oder Scherkräfte zu Endothelschäden kommen, die eine endotheliale Dysfunktion (ED) zur Folge haben können <sup>13,26,27</sup>. Aufgrund von ED kommt es zur verstärkten Freisetzung parakrin-wirksamer Faktoren, die unter anderem die Proliferation und Apoptoseresistenz von PASMCs fördern und zudem inflammatorische Zellen rekrutieren <sup>28,29</sup>. Bei der daraus

resultierenden Mediahypertrophie werden die PASMCs folglich von externen Faktoren stimuliert, weisen aber zudem selbst angeborene Veränderungen wie die BMP-2R-Mutation oder eine mitochondriale Dysfunktion auf. Diese Wandlung einer gesunden Pulmonalarterie zu einer bei PH pathologisch veränderten Pulmonalarterie ist in **Abbildung 3** schematisch dargestellt. Die BMP-2R-Mutation hat einen antiapoptotischen und die mitochondriale Dysfunktion über die Umstellung von oxidativer zu anaerober Energiegewinnung einen proliferativen Effekt auf die betroffenen Zellen <sup>30,31</sup>. Neben der Mediahypertrophie kann es bei der PH zu Neointimaformationen und obstruierenden Läsionen sowie verstärkter Vasokonstriktion, lokaler Inflammation und *in-situ* Thrombosen kommen <sup>13,26,27,32</sup>.

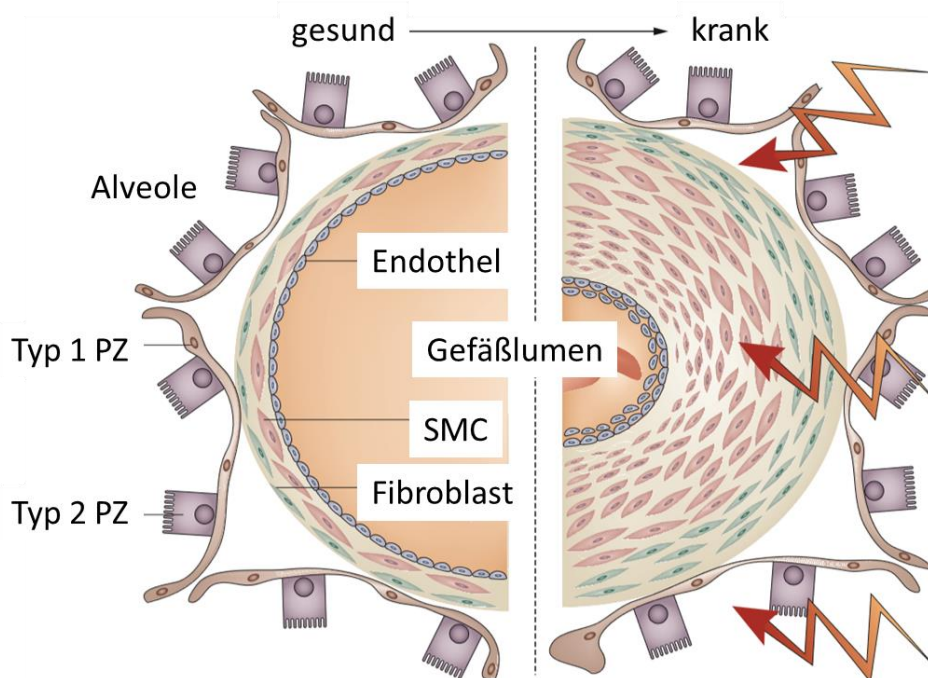


Abbildung 3 - **Veränderung einer gesunden Pulmonalarterie auf der linken Bildseite zu einer bei PH pathologisch veränderten Pulmonalarterie auf der rechten Bildseite.** Auf der rechten Seite sind insbesondere die Neointimaformation sowie die Mediahypertrophie, die zur Gefäßverengung und konsekutiv zur PH führt, zu erkennen. Abkürzungen: Typ 1 Pneumozyt (Typ 1 PZ), Typ 2 Pneumozyt (Typ 2 PZ). Modifiziert nach Schermuly et al. <sup>3</sup>.

Alle genannten Faktoren führen zu einer Abnahme der pulmonalvaskulären Compliance (PVC) und einer Zunahme des pulmonalvaskulären Widerstandes (PVR). Durch den progredienten Verlust der PVC kann der erhöhte PVR nicht mehr durch Gefäßerweiterung oder -rekrutierung ausgeglichen werden und folglich steigt der PAP bei konstantem kardialen Auswurf (cA) nach nachfolgender Formel:

$$\text{PAP} = \text{cA} \times (\text{PVR}_{\text{arteriell}} + \text{PVR}_{\text{kapillär}} + \text{PVR}_{\text{venös}}) \text{ nach Mandegar et al. (2004)}^{33}$$

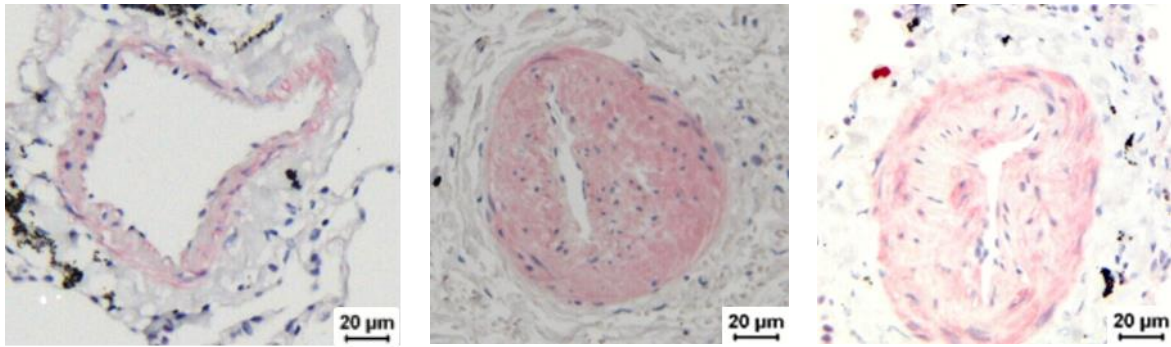
Um den cA konstant zu halten, muss der rechte Ventrikel bei fortschreitendem Anstieg des PAP mehr Arbeit leisten. Der rechte Ventrikel hypertrophiert und steigert seine Kontraktilität in der Folge<sup>15</sup>. Dieser Vorgang wird als ventrikuläres Remodeling bezeichnet, wobei experimentell eine adaptive und eine maladaptive Form unterschieden werden konnten. Beim adaptiven Remodeling kommt es zur konzentrischen Herzmuskelhypertrophie mit erhaltener systolischer und diastolischer Funktion. Die maladaptive Form zeigt eine exzentrische Hypertrophie mit eingeschränkter Herzfunktion<sup>34,35</sup>, die sehr rasch zum Rechtsherzversagen führen kann. Da das Rechtsherzversagen die häufigste Todesursache bei PAH darstellt, ist das Überleben eines PAH-Patienten maßgeblich von der Anpassungsfähigkeit seines rechten Ventrikels abhängig<sup>36,37</sup>. Aus diesem Grund nimmt die Rechtsherzbeurteilung eine wichtige Rolle in der Krankheitsversorgung der PAH ein<sup>38</sup>. Die rechtsventrikulären Dysfunktionen wie Herzmuskelhypertrophie und Trikuspidalklappen-Regurgitation bilden sich im Gegensatz zu den irreversiblen Veränderungen im pulmonalvaskulären Gefäßbett in vielen Fällen nach therapeutischer Intervention wie zum Beispiel einer Lungentransplantation zurück<sup>39,40</sup>.

### 1.4.3 Histologische Veränderungen

Physiologisch sind die Arterien im pulmonalen Kreislauf aufgrund des dort vorherrschenden niedrigen Blutdrucks dünnwandiger und weisen einen niedrigeren Muskeltonus als systemische Arterien auf (**Abbildung 4a**)<sup>41</sup>. In der Pathogenese der PH kommt es aus den oben genannten Gründen zur Mediahypertrophie durch exzessive PASMC-Proliferation (**Abbildung 4b**), zur Intimafibrosierung durch einwandernde Fibroblasten, zu Neointimaformationen (**Abbildung 4c**) und zu komplexen Läsionen. Unter diesen Läsionen stellen die plexiformen Läsionen einen histologischen Marker für die Schwere und die Progression der PH dar. Dabei kommt es durch autonome Proliferation von Endothelzellen zu fokalen Engstellen im pulmonalen Gefäßbett. An diesen Engstellen finden sich häufig Fibrinablagerungen und *in-situ* Thrombosen<sup>42,43</sup>. Zudem zeigt sich durch die Differenzierung von Perizyten zu glatten Muskelzellen (SMC) sowie die Einwanderung von Stammzellen und Fibrozyten an



physiologischerweise nicht-muskularisierten Arterien und Arteriolen eine unphysiologische Muskularisierung<sup>44-46</sup>.



a) Gesunde Pulmonalarterie                      b) Mediaproliferation bei COPD      c) Neointimaformation bei IPAH

Abbildung 4 – **Unterschiede zwischen einer gesunden, dünnwandigen Pulmonalarterie** in a) und einer bei PH pathologisch veränderten Pulmonalarterie durch Mediaproliferation in b) sowie durch Neointimaformation in c). Auf den Abbildungen zeigen die PASMCs der Gefäßmedia eine Rotfärbung gegen CSF-1R durch CSF-1R-Antikörper und die Zellkerne eine Blaufärbung durch Hämatoxylin. Die verwendeten Bilder a), b), c) in dieser Abbildung stammen aus eigenen Färbungen.

#### 1.4.4 Therapie

Bei der Therapie der diversen PH-Gruppen stehen die Behandlung der Grunderkrankung sowie der präventive Schutz des Atemsystems im Vordergrund. Präventiv wirken die Vermeidung körperlicher Überlastung und die Impfung gegen Pneumokokken oder Influenza-Viren. Nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie von 2010 liegt jedoch allein für die PAH-Gruppe 1 nach Nizza 2013 eine spezifische medikamentöse Therapie sowie ein Evidenz-basierter Behandlungsalgorithmus vor<sup>47</sup>. Dabei zielen die meisten Medikamente auf Funktionen der pulmonalen Endothelzellen ab, die bei der PH aufgrund der endothelialen Dysfunktion gestört sind. So verstärken Phosphodiesterase-5-Inhibitoren wie Sildenafil über Sauerstoffmonoxid (NO) sowie Prostazykline wie Iloprost die Vasodilatation. Zudem hemmen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wie Bosentan die Vasokonstriktion<sup>28,48</sup>. Bei chronischer Hypoxie ist außerdem eine Langzeitsauerstofftherapie indiziert. Bei konservativ nicht beherrschbaren Verläufen verbleibt die Lungen- beziehungsweise Herz-/Lungentransplantation als therapeutische Option<sup>4,49</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden insbesondere die Krankheitsbilder der COPD und der IPAH auf ihre CSF-1R-Expression hin untersucht und werden daher im Folgenden genauer beschrieben.

## 1.5 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

Die COPD beschreibt ein kombiniertes Krankheitsbild aus chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem. Die COPD ist die häufigste obstruktive Atemwegserkrankung, von der allein in Deutschland etwa 4% der Erwachsenen betroffen sind <sup>50</sup>. Es wird davon ausgegangen, dass die COPD in Zukunft zur dritthäufigsten Todesursache weltweit nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen und zerebrovaskulären Erkrankungen aufsteigen wird <sup>51-53</sup>.

### 1.5.1 Pathogenese

Die COPD ist eine Erkrankung der Atemwege, bei der es zur fortschreitenden Einschränkung der Atmung aufgrund von Destruktion des Lungenparenchyms und vermehrter Obstruktion in den Atemwegen kommt <sup>54</sup>. Diese Obstruktion führt zu einer Erhöhung des Atemwegswiderstands durch Abnahme der pulmonalvaskulären Compliance <sup>54</sup> sowie Schleimablagerungen und Inflammation in den Bronchien. Die Ursachen für die Entstehung dieser Lungenerkrankung sind multifaktoriell: So spielen unter anderem die Inhalation von Zigarettenrauch, Staubpartikeln und chemischen Stoffen wie Isocyanaten, aber auch Infektionen der Lunge und genetische Determination eine wichtige Rolle. Für Patienten mit COPD ist vor allem die Expiration erschwert, da die kleinen Bronchien aufgrund der fehlenden elastischen Retraktionskräfte früh kollabieren. Aus diesem Grund kann der COPD-Patient die eingeatmete Luft nicht vollständig abatmen und das in der Lunge verbleibende Luftvolumen, das sogenannte Residualvolumen steigt stetig an. Die Lunge dehnt sich aus und erweitert den knöchernen Thorax, was die Atemmechanik weiter verschlechtert <sup>50</sup>. Durch die verschlechterte Atmung kommt es zu einer chronischen alveolären Hypoxie <sup>55</sup>, die neben chronischer Inflammation, genetischer Prädisposition und insbesondere den toxischen Effekten von Zigarettenrauch zur Entstehung einer COPD assoziierten PH führen kann <sup>54-57</sup>. Denn die chronische alveoläre Hypoxie hat eine chronische hypoxische Vasokonstriktion der präkapillären Pulmonalarteriolen zur Folge. Somit führt die chronisch alveoläre Hypoxie zu Veränderungen im Aufbau der Lungengefäße, die durch Mediahypertrophie und verstärkter Muskularisierung von pulmonalarteriellen Gefäßen gekennzeichnet ist. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass

eine PH bei COPD dem Lungenemphysem vorausgehen kann <sup>58,59</sup>, was die Bedeutung der PH bei COPD weiter verdeutlicht.

### **1.5.2 COPD assoziierte PH und deren Therapie**

Die PH ist eine der wichtigsten Komorbiditäten bei der COPD mit einer hohen Prävalenz besonders im fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung <sup>56</sup>. So leiden laut Ghofrani et al. etwa ein Drittel der Patienten mit COPD an einer PH und bis zu 91% aller Patienten mit COPD an einer belastungsabhängigen PH <sup>60</sup>. Die COPD assoziierte PH ist langsam fortschreitend und zeichnet sich durch eine Erhöhung des PAP und des pulmonal vaskulären Widerstandes aus, wobei der kardiaale Auswurf in der Regel nicht verändert ist <sup>56,60</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die PH einen negativen Einfluss auf die Prognose von Patienten mit COPD hat <sup>60</sup>. Dem frühzeitigen Erkennen und der Behandlung der COPD assoziierten PH kommt demnach eine wichtige Bedeutung zu. Die Diagnosestellung einer PH ist jedoch schwierig. Die Doppler-Echokardiographie ist das beste nicht-invasive Verfahren, wobei sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität niedrig sind <sup>60</sup>. Dagegen weist die Rechtsherz-Katheterisierung eine hohe Sensitivität und Spezifität auf, ist jedoch invasiv und daher nicht ohne genaue Indikation durchzuführen <sup>4,60</sup>. Bei der Therapie der COPD assoziierten PH ist das Meiden inhalativer Noxen, insbesondere strikter Verzicht auf das Tabakrauchen maßgeblich. Die wichtigsten medikamentösen Therapieoptionen sind die Bronchodilatation mittels Anticholinergika sowie  $\beta_2$ -Mimetika und die Langzeitsauerstofftherapie <sup>61</sup>, die durch Aufhebung der hypoxischen Vasokonstriktion die Ventilation und Perfusion in der Lunge verbessern <sup>60</sup>.

### **1.6 Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH)**

Bei der IPAH zeigen sich die gleichen Symptome wie bei den anderen PH-Subtypen, jedoch ist der Grund für die Manifestation der Erkrankung unbekannt und es handelt sich zudem um eine sehr schwere Verlaufsform der PH <sup>3</sup>. Veränderungen am BMP-2R werden mit dieser Erkrankung in Verbindung gebracht <sup>62,63</sup>. Die IPAH ist eine sehr seltene Erkrankung. Sie betrifft laut dem Wexner Medical Center der Ohio State University ca. 1-3 Patienten pro eine Millionen Patienten im Jahr. Die IPAH ist

allerdings noch heute kaum zu behandeln und durch eine hohe Mortalität gekennzeichnet. So haben Patienten mit IPAH ohne Therapie eine Überlebenschance für ein Jahr von 68%, für drei Jahre von 48% und für fünf Jahre von 34% <sup>64</sup>. Als Subtyp der PAH entspricht die Therapie der in Punkt 1.4.4 beschriebenen. Die Pathologie der IPAH besteht aus der vermehrten Vasokonstriktion, vaskulärem Remodeling und *in-situ* Thrombosen. Da bei dieser Erkrankung das vaskuläre Remodeling fast ausschließlich im arteriellen Teil der Lungengefäße stattfindet, eignet sich die IPAH besonders gut zur Forschung an pulmonalarteriellem Remodeling <sup>23</sup>. Histologisch auffallend sind bei der IPAH die Mediahypertrophie, die konzentrisch-laminare Intimafibrosierung, *in-situ* Thrombosen sowie plexiforme Läsionen (**Abbildung 5**) <sup>11,54</sup>.

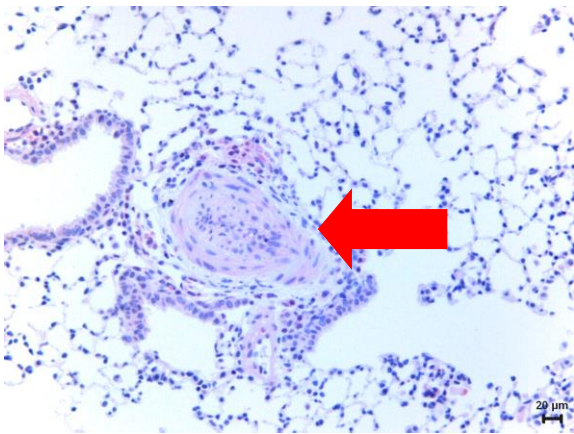


Abbildung 5 – **Mediahypertrophie mit Neointima bei einer Pulmonalarterie.** Besonders die für die PH pathognomonische starke Verdickung der Gefäßmedia sowie die nahezu vollständige Okklusion des Gefäßlumens durch die Neointima ist in diesem Bild gut zu erkennen <sup>60,65</sup>. Auf der Abbildung zeigen die PSMCs der Gefäßmedia eine Rotfärbung gegen CSF-1R durch CSF-1R-Antikörper und die Zellkerne eine Blaufärbung durch Hämatoxylin. Das verwendete Bild in dieser Abbildung stammt aus eigenen Färbungen.

## 1.7 Die pulmonale Hypertonie im Tiermodell

Es gibt verschiedene etablierte Tiermodelle, die die Pathologie der PH beim Menschen möglichst akkurat versuchen nachzustellen. Mögliche Unterschiede in der Pathophysiologie bei Mäusen beziehungsweise Ratten müssen bei der Übertragung der experimentell gewonnenen Ergebnisse auf den menschlichen Organismus berücksichtigt werden <sup>3,66</sup>. Die PH induziert durch chronische Hypoxie ist bei Maus, Ratte und Mensch sehr ähnlich <sup>67</sup>. Zudem ist diese Form der PH wohl sowohl bei Mäusen und Ratten, als

auch bei Menschen nach Reexposition in Normoxie reversibel<sup>67,68</sup>. Die Behandlung von Ratten mit Monocrotalin (MCT) ruft eine sehr starke Form der PH hervor, die in wesentlichen Aspekten Gemeinsamkeiten zur IPAH beim Menschen zeigt. Denn anders als bei PH durch chronische Hypoxie, bei der es aufgrund einer physiologischen Reaktion auf die Hypoxie zur Erkrankung kommt, beruht die Pathogenese bei MCT auf einer inflammatorischen Reaktion auf einen toxischen Metaboliten. MCT, ein Alkaloid aus der Pflanze *Crotalaria spectabilis*<sup>66</sup>, wird subcutan injiziert und in der Leber zu MCT-Pyrrol oxidiert, welches aufgrund seiner Toxizität zu schweren pulmonalvaskulären Veränderung führt<sup>69-71</sup>. Der für die Lungentoxizität verantwortliche Mechanismus ist jedoch unbekannt<sup>70</sup>. Als Folge auf die Inflammation kommt es zu Neointimaformationen, Mediahypertrophie und zum pulmonalvaskulären Remodeling, also dem typischen Erscheinungsbild, das der IPAH beim Menschen sehr ähnlich ist<sup>11</sup>. Tabakrauch-exponierte Mäuse bilden insbesondere Lungenemphyseme aus und zeigen eine verstärkte Muskularisierung kleiner Arteriolen, was vermehrt zu einer leichten Form der PH mit möglicher Rechtsherzhypertrophie führt<sup>72</sup>. Somit ist das Tabakrauch-Modell am ehesten mit der COPD beim Menschen vergleichbar<sup>55</sup>. Außerdem sind ein Großteil der COPD-Patienten Zigarettenraucher und folglich wie die Tabakrauch-exponierte Mäuse chronisch Zigarettenrauch ausgesetzt<sup>52</sup>.

Alle genannten Modelle zeigen Veränderungen insbesondere in der Gefäßwand kleiner Lungenarteriolen. Dabei kommt es durch Zellproliferation insbesondere der PASMCs in den Lungengefäßwänden zur Entstehung und Etablierung der PH-Erkrankung. Daher wurde in dieser Arbeit mit dem Kolonie-stimulierenden Faktor-1 Rezeptor (CSF-1R) ein Target gewählt, das bereits für die Entstehung und Progression anderer proliferativer Erkrankungen bedeutsam ist und dort bereits diagnostisch und therapeutisch genutzt wird.

## **1.8 Der Kolonie-stimulierende Faktor-1 Rezeptor (CSF-1R)**

In dieser Arbeit wurde der CSF-1R auf seine Expression und Funktionalität in PASMCs untersucht und wird daher im Folgenden genauer beschrieben.

### 1.8.1 Funktionsweise und Vorkommen des CSF-1R

Der Kolonie-stimulierende Faktor-1 (CSF-1), auch bekannt als Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), ist ursprünglich nach seiner Fähigkeit benannt worden, entwickelte Makrophagenkolonien aus dem Knochenmark zu mobilisieren<sup>62</sup>. Der CSF-1 ist dabei hochspezifisch für den zu diesem Liganden gehörenden Rezeptor<sup>73</sup>. Dieser wurde folglich CSF-1R genannt. Er wird auch als c-fms-Rezeptor bezeichnet, da das c-fms-Protoonkogen für den CSF-1R codiert. Der CSF-1R besteht aus einer ligandenbindenden extrazellulären Domäne, einem membran-durchspannenden Mittelstück und einem intrazellulären Teil mit Tyrosinkinase-Aktivität. Neben dem CSF-1 konnte zudem das Interleukin-34 (IL-34) als weiterer Ligand des CSF-1R identifiziert werden<sup>74</sup>. Nach der Ligandenbindung kommt es zur Rezeptordimerisierung, anschließend zur Autophosphorylierung der intrazellulären Anteile und schließlich zur Aktivierung verschiedener zytoplasmatischer Signalproteine mittels Phosphorylierung<sup>75,76</sup>. Über diese Aktivierung beeinflusst das CSF-1-/CSF-1R-Signal die Differenzierung, Proliferation und das Überleben verschiedener Zelltypen<sup>77-80</sup>. Dieses Signal wird mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose ausbalanciert, wodurch insbesondere der Aktivierungszustand einer Zelle durch CSF-1 begrenzt bleibt<sup>74,81</sup>. Das Vorkommen des CSF-1R ist unter anderem bei Osteoklasten und Makrophagen sowie bei der Plazentafunktion und Laktation in Drüsenepithelzellen physiologisch<sup>78,82-84</sup>. Die CSF-1R-Expression bei Zelltypen, die diesen Rezeptor physiologisch nicht exprimieren, führt zu teils unkontrollierter Differenzierung, Proliferation und Apoptoseresistenz<sup>77</sup>. Man nimmt an, dass diese unphysiologische Expression unter anderem vom *platelet derived growth factor* (PDGF) induziert wird<sup>85</sup>. Eine CSF-1R-Expression im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen ist bei Mamma-<sup>75</sup>, Lungen- sowie Ovarialkarzinom<sup>86</sup>, Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM)<sup>82,87</sup>, arteriosklerotischen Neointima-Zellen<sup>84,85</sup> und Glioblastoma multiforme (GM)<sup>88</sup> bekannt. Auch vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) von Mäusen<sup>84</sup> und Ratten<sup>89</sup> sowie humane VSMCs<sup>85</sup> exprimieren den CSF-1R unter bestimmten Bedingungen. Zudem wird eine veränderte CSF-1R-Expression mit erhöhter Asthma-Anfälligkeit in Verbindung gebracht<sup>90</sup>. Daher wird dieser Rezeptor auch therapeutisch und prognostisch genutzt. Dabei ist beispielsweise eine erhöhte CSF-1R-Expression bei bestimmten Formen des Bronchialkarzinoms mit einem schlechteren Outcome und einer erhöhten Malignität vergesellschaftet<sup>75,91,92</sup>.

## 1.8.2 Das CSF-1R-Signal und dessen Einfluss auf verschiedene Krankheiten

Entartete Zellen, Endothelzellen sowie Monozyten können CSF-1 sekretieren und der daraus resultierende erhöhte CSF-1-Spiegel im Patientenblut ist mit einer schlechten Prognose beziehungsweise einer erhöhten Metastasierungsneigung des Tumors vergesellschaftet <sup>75,87,93,94</sup>. Man geht davon aus, dass sich entartete Zellen in ihrem Wachstum einerseits autokrin über CSF-1 stimulieren und diese Zellen andererseits parakrin die Infiltration von TAMs fördern <sup>75</sup>. TAMs verstärken über Wachstumsfaktoren und Zytokine im entarteten Gewebe das Einwandern von Stammzellen und die Angiogenese zusätzlich <sup>82,87,95</sup>. Die Bedeutung der TAMs in entartetem Gewebe zeigte eine Studie, in der bei Patienten mit GM durch eine spezifische CSF-1R-Inhibierung an TAMs eine erhöhte Überlebensrate und eine Tumorregression erreicht werden konnte <sup>88</sup>. TAMs besitzen darüber hinaus die Fähigkeit sich in Myofibroblasten umzuwandeln und könnten daher zusätzlich bei der Entstehung von Neointima-Formationen bei Arteriosklerose oder PAH eine Rolle spielen <sup>96,97</sup>. Das Ausmaß von Neointima-Formationen korreliert aber nicht zwangsläufig mit dem Vorkommen inflammatorischer Zellen <sup>98,99</sup>. Um die Pathogenese solcher Neointima-Formationen besser zu verstehen, sind auch VSMCs auf ihr Ansprechen auf CSF-1 untersucht worden. Dieser Zelltyp ist in seiner Reifung und seinem Überleben anders als Monozyten nicht von CSF-1 abhängig <sup>100</sup>. Unter Stressbedingungen wie beispielsweise Inflammation oder Hypertonie scheint CSF-1 jedoch das Überleben, das Wachstum und die Migration von VSMCs zu fördern <sup>84</sup>. Die Signalweiterleitung des aktivierten CSF-1R führt über die Src Familie Kinase (SFK) und das Mitogen-aktivierte Protein (MAP) sowie die Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK) zu vermehrter Proliferation und über PI3K/Akt zu höheren Überlebensraten von VSMCs <sup>101</sup>. Dieses Signal wird durch den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) verstärkt <sup>84</sup>, was die Verringerung von SMC-Proliferation durch TNF- $\alpha$ -Inhibierung bei Transplantat-assoziiierter Arteriosklerose erklärt <sup>102,103</sup>.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Sowohl bei diversen Tumorentitäten<sup>75,86</sup> als auch bei bestimmten Formen der Arteriosklerose<sup>84,85</sup> zeigte sich, dass der CSF-1/CSF-1R-Signalweg für die Pathologie dieser Erkrankungen von Bedeutung und zudem therapeutisch nutzbar ist. Wichtig für die Pathogenese und Therapierbarkeit war hierbei die Expression des CSF-1R durch verschiedene Tumorzellen beziehungsweise entarteter VSMCs<sup>84</sup>. Bei der PH sind ebenfalls entartetes Zellwachstum insbesondere der PSMCs sowie eine zunehmende Gefäßverengung im Pulmonalsystem überaus bedeutsam für die Entstehung, Manifestation und Progredienz der Erkrankung<sup>30</sup>. Somit ging diese Arbeit der Frage nach, ob auch PSMCs den CSF-1R exprimieren. Im Anschluss wurde die mögliche Funktion des CSF-1/CSF-1R-Signalwegs für PSMCs untersucht. Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit Lungengewebe und PSMCs von Mäusen, Ratten und humanen Proben qualitativ und quantitativ mittels qPCR, WB und IHC auf die Expression des CSF-1R hin untersucht sowie die funktionelle Bedeutung dieses Rezeptors für PSMCs mittels Migrations- und Proliferationsassays geprüft.

## 2 Material und Methoden

Im Folgenden werden zuerst die verwendeten Geräte und danach das Gewinnen der verwendeten Proben von Mäusen, Ratten und Lungenpatienten aufgezählt und beschrieben.

### 2.1 Verwendete Geräte

Brutschrank	Memmert, Schwabach
Cellgard Class II Sterilbank	Integra Biosciences, Fernwald
Consort E835 Elektrophorese	Sigma-Aldrich, Steinheim
CP 1000 Filmentwickler	Agfa, Mortsel, Belgien
DMIL Mikroskop	Leica, Wetzlar



Heizplatte HI1220	Leica, Wetzlar
Hera cell 150 Brutschrank	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Homogenizer precells 24	Peqlab, Erlangen
Leica DM6000B Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Mettler Toledo PL 303 Substanzwaage	Mettler Toledo, Schweiz
Microtom RM2255	Leica, Wetzlar
Mini Plate Spinner MPS 1000	Labnet, Edison, NJ, USA
Molecular Imager ChemiDoc XRS+	Bio-Rad, München
MX3000P	Stratagen, Kirkland, WA, USA
PX1 PCR Plate Sealer	Bio-Rad, München
Rauchexpositionssystem	Firma Burghart, Tabaktechnik, Wedel, Deutschland
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore, Schwalbach
Rotina 420R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Spectrophotometer ND-1000 NanoDrop	Wilmington, DE, USA
Tpersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen
Universal 320R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Vacunsafe comfort	Integra Biosciences, Fernwald
VERSAmax lunable microplate reader	Molecular Devices, Ismaning
VWR digital heatblock	Watts, CA, USA
Wasserbad HI1210	Leica, Wetzlar

### **2.1.1 Verwendete Materialien und Chemikalien**

2,5% Normal Horse Serum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
2-Mercaptoethanol 99 p.a.	Roth, Karlsruhe

3R4F Research Zigaretten	Lexington, Kentucky, USA
Antikörper-Diluent	Zytomed, Berlin
AP-Polymer	Zytomed, Berlin
aqua dest.	Millipore, Schwalbach
Blocking Solution	Zytomed, Berlin
Citrate Buffer 20x pH=6,0	Invitrogen, Frederick, MD, USA
CSF-1	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen
ECL plus	Amersham, Freiburg
Eisenpartikel (Eisen-II, III-Oxid, 98 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol 70 %, 96 % und 100 %	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
Gelhalterungen für Western Blot	Bio-Rad, München
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	invitrogen, Frederick, MD, USA
iScript reaction mix	Bio-Rad, München
iScript reverse Transkriptase	Bio-Rad, München
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München
Laemmlli Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
LDS	lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methylgrün	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Micro tube	Sarstedt, Nümbrecht
Micro-Schraubröhren 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mouse CSF-1R Human Cells Transfected Lysat	biobyte, San Francisco, CA, USA

Monocrotalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Multiplate PCR Plates	Bio-Rad, München
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Promega, Mannheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Optically Clear Heat Seal	Bio-Rad, München
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Pertex©	Medite, Burgdorf
Polyvinylidenfluorid-Membran	Pall Corporation, Dreieich
Postblock	Zytomed, Berlin
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad, München
Proteinase	Dako Real, Glostrup, Denmark
QIAshredder Röhrchen	Qiagen, Hilden
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNase-free mini tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Rodent Block M	Biocare Medical, Concord, CA, USA
Rodent M	Biocare Medical, Concord, CA, USA
Super Frost Ultra Plus Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
TissueTek©	Sakura Finetek, Staufen
Tris-buffered saline Puffer	Zytomed, Berlin
Trypsin	invitrogen, Frederick, MD, USA
Tween© 20	AppliChem, Darmstadt
UltraCruz strahlungssensitiver Film	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA
Western Blot Kammern	Bio-Rad, München

Xylol

Roth, Karlsruhe

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Falcons	Corning Science, Mexico
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Medium 199 (M199)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
PBS	PAN-Biotech, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAN-Biotech, Aidenbach
Serologische Pipetten 5, 10, 25, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg
Trypsin/EDTA (1x)	PAN-Biotech, Aidenbach
Zellkulturplatten	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale Culture-Inserts	ibiTreat, Ibi, Matinsried
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen

### 2.1.3 Zubehörsatz und Assays

BrdU, colorimetric Proliferationsassay	Roche, Mannheim
DAB Substrat Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DC Protein Assay	Bio-Rad, München
ImmPRESS REAGENT Anti-Rabbit Ig Peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Positivkontrolle - Mouse CSF-1R Human Cells Transfected Lysat	Biorbyt, San Francisco, CA, USA
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad, München

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
VIP Peroxidase Substrat Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Warp Red	Biocare Medical, Concord, CA, USA

#### **2.1.4 Antikörper**

Alpha-Aktin A2547	Smooth Muscle Actin Maus, monoklonal; Sigma, USA
anti-Rabbit IgG HRP conjugat W4018	Promega, Madison, WI, USA
CSF-1R PAB 12674	Abnova, Taipeh, Taiwan
CSF-1R ab59231	Abcam, Cambridge, UK
CSF-1R sc-692	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA
CSF-1R ABIN498117	antikoerper-online.de, Aachen
MM HRP Polymer MM602L	Biocare Medical, Concord, CA, USA
vWF-Antikörper Ig-Fraktion, Kaninchen, polyklonal, A0082	Dako, Glostrop, Dänemark
$\beta$ -Aktin-Antikörper (Maus, monoklonal), A531	Sigma-Aldrich, USA

#### **2.1.5 Software**

Freeware-Software „Primer 3“	Metabion GmbH, Martinsried
ImageJ-Software	Oracle, Redwood Shores, CA, USA
MxPro	Stratagen, La Jolla, CA, USA
Qwin V3 Software	Leica, Wetzlar

## 2.2 Behandlung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen bei 20-23°C, 40-70% Luftfeuchtigkeit und einem Tag- zu Nachtrhythmus von 12h zu 12h in Polycarbonat-Käfigen gehalten. In den Käfigen befanden sich Einstreu, Nistmaterial und Versteckbehausungen. Die Anzahl an Versuchstieren pro Käfig richtete sich nach den standardisierten Haltungsbedingungen. Die Zufuhr von Wasser (Leitungswasser) und Altromin 1324 Futter (Altromin Spezialfutter, Lage) erfolgte *ad libitum*. Die verwendeten Proben der vorliegenden Arbeit stammten aus den in der Folge beschriebenen Tiermodellen. Die Gewinnung der Proben aus den Tierexperimenten erfolgte unter der Genehmigung des Regierungspräsidium Gießen mit den Geschäftszeichen GI 20/10 45/2013 für das Rauch-Maus-Modell, GI 20/10 76/2013 für das chronische Hypoxie-Maus-Modell und GI 20/10 39/2009 für das Monocrotalin-Ratten-Modell.

### 2.2.1 Maus-Modell

Es wurden C57BL/6J Wildtyp Mäuse verwendet, welche von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden.

#### 2.2.1.1 Chronisches Hypoxie-Maus-Modell

Das Protokoll und die Durchführung des chronischen Hypoxie-Maus-Modells von und nach Christine Veith <sup>104</sup>. Die C57BL/6J Mäuse waren zu Versuchsbeginn circa sechs Wochen alt und wogen 22-30 g. In der Studiengruppe wurden die Mäuse in Zuchtkammern unter hypoxischen Bedingungen bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion ( $FiO_2$ ) von 0,10 gehalten, während die Mäuse der Kontrollgruppe unter Normoxie bei einer  $FiO_2$  von 0,21 gehalten wurden. In beiden Kammern herrschten normobare Bedingungen auf einer Höhe von 159 m über Normalhöhennull. Nach 21 Tagen wurden die Mäuse mit 1000 U/kg Körpergewicht (KG) antikoaguliert und anschließend mit einer letalen intraperitonealen Dosis von 125  $\mu$ g/g KG des Analgetikums Ketamin (Ketaminhydrochlorid; Pharmacia, Erlangen) und 25  $\mu$ g/g KG des Anästhetikums Xylocain (Lidocainhydrochlorid 2%; Astra Zeneca, Wedel) getötet. Per Tracheotomie wurde eine Kanüle in der Trachea platziert, der Thorax eröffnet und

die Lunge über einen pulmonalarteriellen Katheter mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült. Die NaCl-Lösung konnte über eine Öffnung im linken Ventrikel abfließen. Sobald sich kein Blut mehr in der abfließenden Lösung befand, wurde 50°C warmes TissueTek (Sakura Finetek, Staufen) über die Trachealkanüle in die Lunge eingebracht. Schließlich wurde die Trachea abgebunden, die Lunge entnommen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

#### 2.2.1.2 Rauch-Maus-Modell

Das Protokoll und die Durchführung des Rauch-Maus-Modells von und nach Alexandra Pichl <sup>72</sup>. Die C57BL/6J Mäuse waren zu Versuchsbeginn acht bis zehn Wochen alt und wogen ca. 20 g. Sie wurden randomisiert in eine Studiengruppe und eine Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Mäuse in der Studiengruppe wurden etwa acht Monate lang für sechs Stunden pro Tag und an fünf Tagen pro Woche in einer Rauchkammer beraucht und die Mäuse in der Kontrollgruppe wurden für die gleichen Zeitintervalle lediglich der Umgebungsluft mit 21% Sauerstoff ausgesetzt. Auf diese Weise konnten unspezifische Effekte wie Zellalterung, die unabhängig vom Zigarettenrauch auftraten, kontrolliert werden. Es wurden standardisierte 3R4F-Forschungszigaretten (Kentucky Tobacco Research and Development Centre, Lexington, KY, USA) verwendet und mit diesen Zigaretten über einen kommerziellen Rauchgenerator eine konstante Partikelkonzentration von 140mg/m<sup>3</sup> in der Rauchkammer erzeugt. Der erzeugte Rauch wurde mit Frischluft verdünnt, sodass der Wert der maximalen Arbeitsplatz-Konzentration (MAK-Wert) für Kohlenstoffmonoxid von 35mg/m<sup>3</sup> in der Rauchkammer nicht erreicht wurde. Der MAK-Wert gibt die Konzentration eines Stoffes in der Atemluft an bis zu der bei maximal 40h Exposition pro Woche keine Gesundheitsschäden zu erwarten sind. Somit ging bei diesem Versuch keine Gefährdung der Mäuse durch erhöhte Kohlenmonoxidexposition aus. Die Tötung der Mäuse fand nach etwa acht Monaten auf dieselbe Art und Weise statt wie bereits bei dem chronischen Hypoxie-Maus-Modell beschrieben.

### **2.2.2 Monocrotalin-Ratten-Modell**

Das Protokoll und die Durchführung des Monocrotalin-Ratten-Modells von und nach Florian Veit <sup>71</sup>. Es wurden Sprague-Dawley Ratten verwendet. Die Ratten waren zu Versuchsbeginn 12 Wochen alt und wogen 300-350 g. Sie wurden in eine Studiengruppe, die mit Monocrotalin (MCT; Sigma- Aldrich, Steinheim) behandelt wurde, und eine Kontrollgruppe aufgeteilt, die lediglich mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (NaCl; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) behandelt wurde. Das Alkaloid MCT wurde mittels 1M Salzsäure (HCL; Sigma-Aldrich, Steinheim) und 1M Natriumhydroxid (NaOH; Sigma-Aldrich, Steinheim) auf einen pH von 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das Gewicht der Ratten ermittelt. Nach einer Isofluranbetäubung wurde 60mg pro kg Körpergewicht MCT subkutan in die Nackenfalte der Ratten der Studiengruppe injiziert. Die Ratten der Kontrollgruppe erhielte eine subkutane NaCl-Injektion in die Nackenfalte. Im Anschluss an die Injektion wurden alle Ratten für 14 Tage mit dem Breitbandantibiotikum Baytril 2,5% (Bayer AG, Leverkusen) behandelt, um neben der MCT-Inflammation weitere Infektionen bei den Versuchstieren zu verhindern. Die Erhebung der Versuchsdaten begann fünf Wochen nach der Injektion.

### **2.3 Beschreibung der Patientenpopulation**

Die Proben des untersuchten humanen Lungengewebes stammten von 15 IPAH-Patienten (9 Frauen, 5 Männer, 1 keine Angabe (k.A.); Alter im Durchschnitt  $32,5 \pm 19,0$  Jahre), 16 COPD-Patienten (10 Männer, 6 Frauen; Alter im Durchschnitt  $61,4 \pm 7,0$  Jahre) und von 15 Donoren (7 Frauen, 6 Männer, 2 k.A.; Alter im Durchschnitt  $40,4 \pm 16,0$  Jahre). Die Patienten aus der Gruppe der COPD- und der IPAH-Patienten befanden sich zum Entnahmezeitpunkt der Lungenbiopsie bereits im fortgeschrittenen Stadium der jeweiligen Lungenerkrankung. Die Lungen wurden unmittelbar nach Explantation in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder innerhalb von 30 Minuten nach Explantation in 4%igem Paraformaldehyd konserviert. Die Verwendung des humanen Materials wurde von der Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin mit Schreiben vom 01.07.2015 und dem Aktenzeichen 10/06 genehmigt.



## **2.4 Zellkultur**

Es wurden PASMCs aus MCT-behandelten Ratten kultiviert, um diese im Anschluss mittels Western Blot Analyse (WB) auf Proteinebene beziehungsweise mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) auf RNA-Ebene auf ihre CSF-1R-Expression hin zu untersuchen. Ferner wurden PASMCs aus Mäusen kultiviert, um funktionelle Tests durchzuführen.

### **2.4.1 Isolation von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs)**

Nach der Tötung der jeweiligen Versuchstiere wurde vor Entnahme der Lungenflügel aus dem Thorax das pulmonale Gefäßsystem von den Lungenarterien aus gespült. In der Spüllösung befanden sich Eisenpartikel mit einer bestimmten Größe, sodass diese nicht durch die Lungenkapillaren passten und somit präkapillär, arteriell hängen blieben. Nach Zerkleinerung des Lungengewebes konnten so die mit Eisenpartikeln beladenen Pulmonalarteriensegmente vom übrigen Gewebe magnetisch getrennt werden. Im Anschluss konnten diese Segmente durch Kollagenasebehandlung von restlichem Bindegewebe sowie durch Auswaschen von den Eisenpartikeln gereinigt und schließlich als isolierte arterielle Gefäßstücke kultiviert werden<sup>71,104,105</sup>. Die Isolation von PASMCs wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe durchgeführt.

### **2.4.2 Ablauf der Zellkultivierung**

Die Zellen wurden auf 100mm Zellkulturplatten (Greiner Bio-one, Frickenhausen) ausgesät und mit 37°C-warmen Nährmedium (Medium 199, Gibco, lifetechnologies, Darmstadt) bedeckt, das mit 10% *fetal bovine serum* (FCS) (Sigma-Aldrich, Steinheim), um das Zellwachstum zu beschleunigen, und mit 1% Pen Strep (5,000 Units/ml Penicillin, 5,000 µg/ml Streptomycin, Sigma-Aldrich, Steinheim), um Bakterienkontamination zu verhindern, versetzt war. Über Nacht wurden die Zellen im Brutschrank Hera cell 150 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37,1°C und 5,0% CO<sub>2</sub> belassen. Jeden Tag wurde das Zellwachstum unter dem Mikroskop DMIL (Leica, Wetzlar) beurteilt und bei Bedarf das Nährmedium gewechselt. Kontaminierte Proben wurden verworfen. Nach drei bis sieben Tagen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von über 80% lysiert. Sämtliche Schritte mit Ausnahme der Beurteilung

unter dem Mikroskop fanden unter der Sterilbank Cellgard Class II (Integra Biosciences, Fernwald) statt.

### **2.4.3 Splitten der Zellen**

Um die Verteilung der Zellen auf den Zellkulturplatten zu verbessern, wurden die Zellen auf einer neuen Platte verteilt. Dieser Vorgang wird als Splitten bezeichnet. Dabei wurde das Nährmedium abgesaugt (Vacusafe comfort, Integra Biosciences, Fernwald) und die Zellen mit *Phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen, um Zellüberreste zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen auf den 100mm Zellkulturplatten für eine Minute bei 37°C in 4ml warmen Trypsin inkubiert und das Ablösen der Zellen von der Platte mikroskopisch überprüft. Dann wurde durch die Zugabe von FCS die Trypsinwirkung gestoppt und die Zellkulturplatte wiederum mikroskopisch auf verbliebene Zellen überprüft. Die Zellsuspension wurde in Falcons (Corning Science, Mexico) überführt und bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert (Rotina 420R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1ml Nährmedium mehrfach resuspendiert, um die Zellen im Medium zu verteilen. Schließlich wurde die Zellsuspension mit weiteren 9ml Nährmedium auf neuen 100mm Zellkulturplatten ausgesät.

### **2.4.4 Behandlung humaner PSMCs in Hypoxie**

Die Behandlung humaner PSMCs entsprach der oben beschriebenen Zellbehandlung. Jedoch wurden die humanen PSMCs vor den durchgeführten Untersuchungen für 72 Stunden in einer Hypoxie-Kammer mit einer Sauerstofffraktion von 0,10 gehalten (HOX), während die Mäuse der Kontrollgruppe (NOX) unter Normoxie bei einer Sauerstofffraktion von 0,21 gehalten wurden. Dies diente dazu, mögliche Auswirkungen der Hypoxie auf die CSF-1R-Expression humaner PSMCs untersuchen zu können.

## **2.5 Funktionelle Tests**

Es wurden Maus PSMCs mit CSF-1 (Sigma-Aldrich, Steinheim), dem Liganden des CSF-1R, stimuliert, um die Auswirkungen der Rezeptor-Liganden-Bindung auf die Zellen zu untersuchen. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit CSF-1, aber ansonsten gleichbehandelt wurden.

### **2.5.1 Migrationsassay**

Beim Migrationsassay, auch *wound healing assay* genannt, wurden die Auswirkungen von CSF-1 auf die Zellmigration von Maus PSMCs untersucht. Die Zellen wurden dabei in zwei durch einen Silikoneinsatz getrennten Kompartimenten einer 35mm Zellkulturschale (Culture-Inserts, 35mm low wall; ibiTreat, Ibidi, Matinsried) ausgesät und mit dem Nährmedium smooth muscle cell growth medium 2, welches mit Normocin und 2% FCS versetzt war, bedeckt. Die Zellen proliferierten bei täglicher mikroskopischer Kontrolle und Mediumwechsel bei Bedarf bis eine Konfluenz von etwa 90% erreicht war. Danach wurden die Zellen mit 50 ng/μl CSF-1 behandelt. Anschließend wurde der Silikoneinsatz entfernt und die Zellen konnten fortan in den unbesiedelten Spalt zwischen beiden Kompartimenten einwachsen. Über einen Zeitraum von 12h wurde die Migration der CSF-1-behandelten Zellen in den Spalt beobachtet und mit der Migration der unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Dazu wurden nach jeweils 60 Minuten Bilder an derselben Stelle des Spaltes gemacht und die Migration über die Berechnung der jeweiligen zellfreien Fläche ermittelt. Die Ermittlung der Daten wurde mit der ImageJ-Software (Oracle, CA, USA) durchgeführt.

### **2.5.2 Proliferationsassay**

Bei dem Proliferationsassay wurden die Auswirkungen der CSF-1-Stimulation auf die Proliferation von Maus PSMCs untersucht. Es wurde der Cell Proliferation ELISA (BrdU, colorimetric; Roche, Mannheim) verwendet. Dabei wurde der Proliferationsmarker Bromdesoxyuridin (BrdU) während der Zellteilung in die Zell-DNA eingebaut. Somit konnte von der Stärke des BrdU-Signals auf die DNA-Syntheserate der PSMCs rückgeschlossen werden. Die Durchführung erfolgte nach

den Vorgaben des Herstellers. Es wurden wiederum die Ergebnisse der CSF-1-behandelten Zellen mit denen der Placebo-behandelten Zellen verglichen.

## 2.6 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Bei der qPCR wurde die Expression der CSF-1R-mRNA von Mäusen, Ratten und humanen Proben quantitativ ermittelt. Dies gelang durch Strahlendetektion während der Amplifikation der Nukleinsäuren.

### 2.6.1 Verwendete Primer

Die benutzten Primer wurden mit Hilfe der Freeware-Software „Primer 3“<sup>106</sup> erstellt und von Metabion GmbH (Martinsried) bezogen. Die Primer waren alle Intron überspannend und ihre Schmelztemperatur lag zwischen 61 und 63°C. Die Primer waren bei Lieferung gefriergetrocknet und wurden einer 100µM Ausgangslösung entsprechend gelöst. Vor Beginn der PCR-Analyse wurden die Primer im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. In dieser Arbeit sind folgende Primer verwendet worden:

CSF-1R-Gen	Primersequenzen
Ratte	F: 5'- GGCGGTGACCACTGAGATTGT – 3' R: 5'- CTGGGCCACTAGGCTCGATG – 3'
Human	F: 5'- GGGTGGCAGGAAGGTGATGT – 3' R: 5'- CATCAACGCTGCTGGCTGAG – 3'
Maus	F: 5'- GCTCACGCTATCCCCTGGAG – 3' R: 5'- CTAGGCTCGATGACAGGGGC – 3'

Tabelle 1 - Verwendete CSF-1R-Primer in der qPCR für Ratte, Mensch und Maus. Abkürzungen: vorwärts (F); rückwärts (R); Guanin (G); Cytosin (C); Thymin (T); Adenin (A).

Referenzgen	Primersequenzen
Ratte (HPRT)	F: 5'- CCCTCAGTCCCAGCGTCGTGA – 3' R: 5'- CCCTTCAGCACACAGAGGGCC – 3'
Humanes Homogenat (B2M)	F: 5'- GCCGTGTGAACCATGTGACT – 3' R: 5'- GCAAGCAAGCAGAATTTGGA – 3'
Humane PSMCs (PBGD)	F: 5'- CCCACGCGAATCACTCTCAT – 3' R: 5'- TGTCTGGTAACGGCAATGCG – 3'
Hypoxie-exponierte Maus (HPRT)	F: 5'- GCTGACCTGCTGGATTACAT – 3' R: 5'- TTGGGGCTGTACTGCTTAAC – 3'
Tabakrauch-exponierte Maus (PBGD)	F: 5'- GGGAACCAGCTCTCTGAGGA – 3' R: 5'- GAATTCCTGCAGCTCATCCA – 3'

Tabelle 2 - **Verwendete Primer der Referenzgene in der qPCR für die Modelle der MCT-behandelten Ratte, Hypoxie- und Tabakrauch-exponierter Maus sowie humanen Proben.** Abkürzungen: vorwärts (F); rückwärts (R); Guanin (G); Cytosin (C); Thymin (T); Adenin (A).

## 2.6.2 RNA-Isolierung aus Zellen und Homogenat

Die Zellen wurden wie beim Protokoll der Proteinisolation mit PBS gewaschen, jedoch in RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) im Verhältnis 1:100 (990µl RLT, 10µl 2-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)) von den Zellkulturplatten gekratzt und in RNase-free mini tubes (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert. Der RLT-Buffer schützt die RNA, indem er die Zellmembran lysiert und den Abbau der RNA durch RNasen verhindert. Die RNA-Isolierung bei Homogenat lief im Wesentlichen wie bei der Proteinisolation aus Homogenat ab. Es wurde lediglich statt *cell lysis buffer* 330µl RLT-Puffer gemischt mit 2-Mercaptoethanol pro Probe verwendet und zu Beginn der Isolierung in QIAshredder Röhrchen bei 140000g für 2 Minuten zentrifugiert, um weitere überflüssige Zell- beziehungsweise Gewebsbestandteile zu entfernen. Anschließend wurde die RNA der Proben aus Zellen und Homogenat gleichbehandelt und nach dem

Protokoll des RNeasy Mini Kit isoliert. Dabei wurden zuerst 300µl des RLT-Proben-Gemischs mit 300µl 70% Ethanol gemischt und alles nach mehrmaligem Resuspendieren auf RNeasy Mini Spin Säulen pipettiert. Im Anschluss wurde die RNA mit RW-1-Buffer und zweimal mit RPE-Puffer versetzt. Es wurde zwischen jedem Schritt bei 8000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im letzten Schritt wurde zur Elution der RNA RNase freies Wasser (Qiagen, Hilden) auf die Säulen gegeben und die RNA durch weiteres Zentrifugieren in einem RNase free mini tube aufgefangen. Die RNA-Proben wurden direkt auf Eis gelegt und mit einem Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) wurde die RNA-Konzentration gemessen.

### **2.6.3 Ablauf der qPCR**

Zu Anfang wurde die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dabei wurde das iScript cDNA Synthese Kit (Bio-Rad, München) benutzt. Es wurde aus jeder Probe eine aus der RNA-Konzentration errechnete Menge entnommen und diese mit RNase freiem Wasser, 4µl 5x iScript reaction mix und 1µl iScript reverse Transkriptase (beide Bio-Rad, München) gemischt und dann im Thermocycler Tpersonal (Biometra, Göttingen) in cDNA umgeschrieben. Der Ablauf der qPCR folgte dem Reaktionsprotokoll des Herstellers Bio-Rad. Die 20µl der cDNA wurden im Anschluss mit 80µl RNase freiem Wasser verdünnt, um genügend cDNA-Probe für verschiedene qPCRs vorrätig zu haben. Danach wurden in jedes Well einer Multiplate PCR Plate (Bio-Rad, München) 2µl Probe, 10µl iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München), 7µl RNase freies Wasser und 1µl Primer aus einer Stammlösung pipettiert. SYBR Green ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der doppelsträngige DNA bindet und als DNA-SYBR-Komplex ein spezifisches, messbares Fluoreszenzsignal abgibt <sup>107</sup>. Die Stammlösung setzt sich aus Vorwärts- und Rückwärtsprimern des artspezifischen CSF-1R-Primers (Metabion, Planegg/Steinkirchen) sowie RNase freiem Wasser im Verhältnis 1:1:8 zusammen. Für Proben von Ratten-, Maus-, und Menschenlungen wurde außerdem eine zweite Stammlösung mit dem jeweils passenden Referenz-Gen hergestellt, die als Standard diente <sup>108</sup>. Die Auswahl der passenden Referenz-Gene beruhte auf stabilen Werten in vorangegangenen Versuchen. So wurde bei humanen HOX-NOX-PASMCs und Rauch-Maus-Homogenat PBGD, bei Human-Homogenat B2M und bei MCT-Ratten-Homogenat sowie MCT-Ratten-PASMCs und Hypoxie-

Maus-Homogenat HPRT verwendet. Es wurden Doppelproben hergestellt, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Zudem konnte durch non-template Kontrollen, die keine cDNA enthielten, eine unspezifische Genamplifizierung ausgeschlossen werden. Schließlich wurde die Platte mit einer Folie bedeckt (Optically Clear Heat Seal, Bio-Rad, München) und mit dem PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad, München) luftdicht verschlossen. Die Platte wurde ein letztes Mal zentrifugiert (Mini Plate Spinner MPS 1000, Labnet, Edison, NJ, USA), um Luftblasen aufzulösen, die bei der Messung der Genamplifizierung gestört hätten. Zuletzt wurden die cDNA-Proben im MX3000P (Stratagen, Kirkland, WA, USA) amplifiziert und die spezifischen Fluoreszenzsignale der DNA-SYBR-Komplexe gemessen. Dieses Signal wurde während der exponentiellen Phase der Amplifikation der DNA gemessen und mithilfe von bekannten Standards quantifiziert <sup>107</sup>. Die Messergebnisse wurden mit dem Programm MxPro (Stratagen, USA) ausgewertet.

#### **2.6.4 Auswertung der qPCR**

Der Auswertung der qPCR wurde die Zyklenanzahl zugrunde gelegt, bei der jede einzelne Probe eine vorher festgelegte Schwelle (0,1) für das PCR-Signal erreicht. Diese Schwelle liegt stets im exponentiellen Bereich, da dort am besten auf die ursprüngliche RNA-Expression rückgeschlossen werden kann. Bei der Ergebnisberechnung wurde die Zyklenanzahl des Ziel-Gens von der Anzahl eines ubiquitär vorkommenden, unabhängigen Referenz-Gens abgezogen. Daher kann das Ergebnis (delta CT) auch negativ sein.

#### **2.7 Western Blot Analyse (WB)**

Zur Bestimmung der Proteinexpression wurde die WB angewendet, bei dem die Proteine elektrophoretisch nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt und anschließend als Banden auf einem lichtsensitiven Film sichtbar wurden.

### 2.7.1 Proteinisolierung aus Zellen

Die Zellkulturplatten (Greiner Bio-one, Frickenhausen) mit den zu untersuchenden PASMCs wurden auf Eis gestellt und dreimal mit PBS (PAN-Biotech, Aidenbach) gewaschen, welches wiederum abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gemisch aus 1µl PMSF, 900µl cell lysis buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton, 2,5mM Natriumpyrophosphat, 1mM beta-Glycerophosphat, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1µg/ml Leupeptin) und 100µl aqua dest. für ein bis zwei Minuten inkubiert und schließlich von den Kulturplatten gekratzt und zusammen mit dem cell lysis buffer in 1,5ml Micro tube (Sarstedt, Nümbrecht) aufbewahrt.

### 2.7.2 Proteinisolierung aus Gewebehomogenat

Lungengewebsstücke wurden in mit etwa 20 Keramikkügelchen befüllten Micro-Schraubröhren 2ml (Sarstedt, Nümbrecht) mit 200µl cell lysis buffer inkubiert. Die Integrität des Gewebes wurde dann im Homogenizer precells 24 (Peqlab, Erlangen) bei 6800 Umdrehungen pro Sekunde für 30 Sekunden zerstört, sodass die Proteinantigene für nachfolgende Versuche zugänglich gemacht werden konnten.

### 2.7.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die notwendige Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das *detergent compatible* Protein Assay (Bio-Rad, München) verwendet, um die Proteinexpression unter verschiedenen Bedingungen und in verschiedenen Proben quantifizieren zu können.

### 2.7.4 Durchführung der WB

Die zu untersuchenden Proben wurden mit jeweils gleicher Proteinmenge, zudem mit SDS (lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA), 2-Mercaptoethanol 99 p.a. (Roth, Karlsruhe) zum Auftrennen der Disulfidbrücken und *cell lysis puffer* in Micro tubes gemischt. Dann wurden die Proben bei 96°C für 10 Minuten erhitzt, um die Proteinkomplexe zu denaturieren (VWR digital heatblock, Watts, USA). Anschließend wurden die Proben für eine Minute auf Eis gestellt und zuletzt bei 4000 Umdrehungen



zentrifugiert (Hettich Zentrifugen Universal 320R, Tuttlingen). Die Kammern (Bio-Rad, München) wurden mit Lämmli-Puffer (250mM Tris, 1,9mM Glycin, 1% SDS und aqua dest. im Verhältnis 1:10) befüllt und die 11% SDS Polyacrylamidgele in die Gelhalterungen (Bio-Rad, München) hineingestellt. Ohne Beladung der Gele wurde die Elektrophorese (Consort E835, Sigma-Aldrich, USA) für 10 Minuten gestartet, um die Moleküle im Gel in Richtung Anode auszurichten. Anschließend wurden die Geltaschen der sodium dodecyl sulfat (SDS) Gele mit gleichen Proteinmengen beladen und die Elektrophorese bei 120V, 400mA und 150W für zwei Stunden durchgeführt. Eine Geltasche wurde zudem mit einem Marker beladen (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-Rad, München), der farblich markierte Proteine mit standardisierten Molekülmassen enthielt und somit für einen Referenzwert für die untersuchten Proben sorgte. Das SDS sorgte als anionisches Detergenz für die Aufhebung hydrophober Wechselwirkungen innerhalb der Proteinstruktur und lässt das Protein in eine linearisierte Form übergehen<sup>109</sup>. Im SDS Gel wurden zudem die Ladungsunterschiede zwischen den verschiedenen Proteinen durch die stark negative Ladung des SDS aufgehoben und somit fand eine Auftrennung hauptsächlich nach der Molekularmasse statt, wobei kleine Proteine im Gel schneller und große Proteine langsamer wanderten<sup>109</sup>. Im Anschluss wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine in Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Pall Corporation, Dreieich) übertragen. Es wurde nach dem semi-dry Verfahren geblottet, das bei 100V, 400mA und 150W für 1:15h lief. Danach wurden restliche Proteinbindungsstellen in 6% Milch (6g fettarmes Milchpulver, 100ml Waschpuffer einfach, 0,1% Tween 20) abgesättigt. Dann wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA) im Verhältnis 1:500 (10µl c-Fms/CSF1-R sc-692, 5ml 6% Milch) inkubiert und am nächsten Tag fünf Mal für jeweils 10 Minuten in Waschpuffer einfach gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (Promega, Madison, WI, USA), an den eine Peroxidase gekoppelt ist, im Verhältnis 1:5000 (5µl anti-Rabbit IgG HRP conjugat, 25ml 6% Milch) bei Raumtemperatur (RT) für eine Stunde inkubiert und ein weiteres Mal für dreimal 15 Minuten im Waschpuffer einfach gewaschen. Bei der Entwicklung wurde die Membran mit ECL plus (Amersham, Freiburg) inkubiert. Die Oxidation des ECL durch die Antikörper-gekoppelten Peroxidasen erzeugte eine Chemilumineszenz, die mit einem lichtsensitiven Film (UltraCruz, Santa Cruz Biotech., CA, USA) erfasst wurde<sup>109</sup>. Zuletzt wurde dieser Film im Entwickler (CP 1000, Agfa, Mortsel, Belgien) entwickelt,

um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Um die einzelnen Proteinbanden miteinander vergleichen zu können, wurde die Intensität der Bande jeder einzelnen Probe mit der Intensität der dazugehörigen  $\beta$ -Aktin-Bande verrechnet.  $\beta$ -Aktin wurde als Standard verwendet, da jede Zelle  $\beta$ -Aktin exprimiert und es somit proportional zur aufgetragenen Menge an Probe vorhanden ist. Somit konnte die Proteinkonzentration auf  $\beta$ -Aktin normiert werden. Um die  $\beta$ -Aktin-Bande sichtbar zu machen, wurde die Membran für 1h bei RT in stripping-Lösung (90ml aqua. dest, 10ml Glycin, 2ml HCl rauchend) inkubiert, kurz gewaschen und mit dem  $\beta$ -Aktin-Antikörper (Maus, polyklonal; Sigma-Aldrich, USA) im Verhältnis 1:50000 (1 $\mu$ l Antikörper, 50ml 6% Milch) für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem anti-Maus-Antikörper (Promega, USA) im Verhältnis 1:5000 (1 $\mu$ l Antikörper, 5ml 6% Milch) bei RT inkubiert, gewaschen und in hausgemachtem ECL (1000 $\mu$ l Lösung A, 100 $\mu$ l Lösung B, 0,3 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wiederum inkubiert und die  $\beta$ -Aktin-Banden wurden auf dem lichtsensitiven Film bei der Entwicklung sichtbar.

### 2.7.5 Positiv- und Negativkontrolle

Zur Validierung der CSF-1R-spezifischen Banden wurde der Literaturwert von ca. 160 kDa (**roter Kasten in Abbildung 6**) und zudem eine Positivkontrolle (**grüne Kästen in Abbildung 6**) verwendet<sup>110,111</sup>. Die Positivkontrolle wurde nach den Angaben des Herstellers aufgetragen und wies eine Molekülmasse von ca. 110 kDa auf, da es sich hierbei laut Hersteller vor allem um den rekombinanten, unprozessierten CSF-1R handelt. Für die Negativkontrolle wurde die auf der linken Seite in **Abbildung 6** gezeigte WB Membran erneut in stripping-Lösung inkubiert, um die dort sichtbare spezifische CSF-1R Antikörperbindung zu lösen. Als nächstes wurde dieselbe Membran mit einem Gemisch aus CSF-1R-Antikörper-spezifischen *blocking peptide* und dem Primärantikörper inkubiert. In diesem Gemisch wurde nach Herstellerangaben der verwendete Primärantikörper mit dem zehnfachen Gewichtsüberschuss an *blocking peptide* über Nacht inkubiert, um alle spezifischen Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Die WB Membran auf der rechten Seite in **Abbildung 6** zeigt eine deutlich sichtbare Abnahme der Bandenintensität der markierten CSF-1R-spezifischen Banden im Vergleich zur ungeblockten WB Membran auf der linken Seite in **Abbildung 6**. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Primärantikörper spezifisch an den CSF-1R bindet.

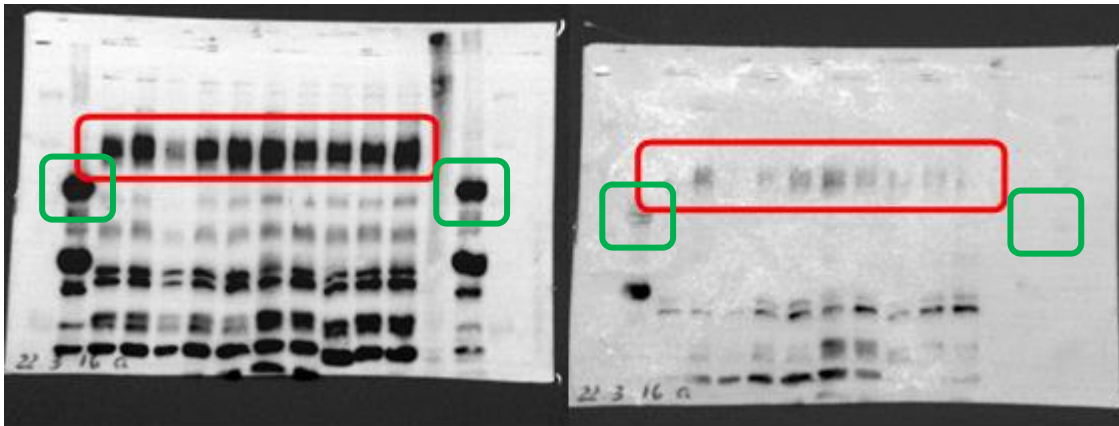


Abbildung 6 – **Western Blot Membranen von Hypoxie-exponierten Mäusen.** Die WB Membran auf der linken Seite zeigt CSF-1R-spezifischen Banden. Die WB Membran auf der rechten Seite zeigt dieselbe Membran nach Inkubation mit einem Gemisch aus CSF-1R-Antikörper-spezifischen *blocking peptide* und dem Primärantikörper. Rot markiert sind die CSF-1R-spezifischen Banden mit einer Molekülmasse von ca. 160 kDa. Grün markiert ist die CSF-1R-spezifische Positivkontrolle mit einer Molekülmasse von ca. 110 kDa.

### 2.7.6 Auswertung

Für die Auswertung wurden die Filme mit dem Molekular Imager ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, München) und der dazugehörigen Image Lab Software digitalisiert und mit ImageJ (Java) die Bandenintensität bestimmt. Für das Ergebnis wurde die Intensität der CSF-1R-Bande durch die Intensität der  $\beta$ -Aktin-Bande dividiert. Die folgenden zwei Abbildungen zeigen exemplarisch einen CSF-1R markierten Western Blot (**Abbildung 7**) sowie einen  $\beta$ -Aktin markierten Western Blot (**Abbildung 8**).

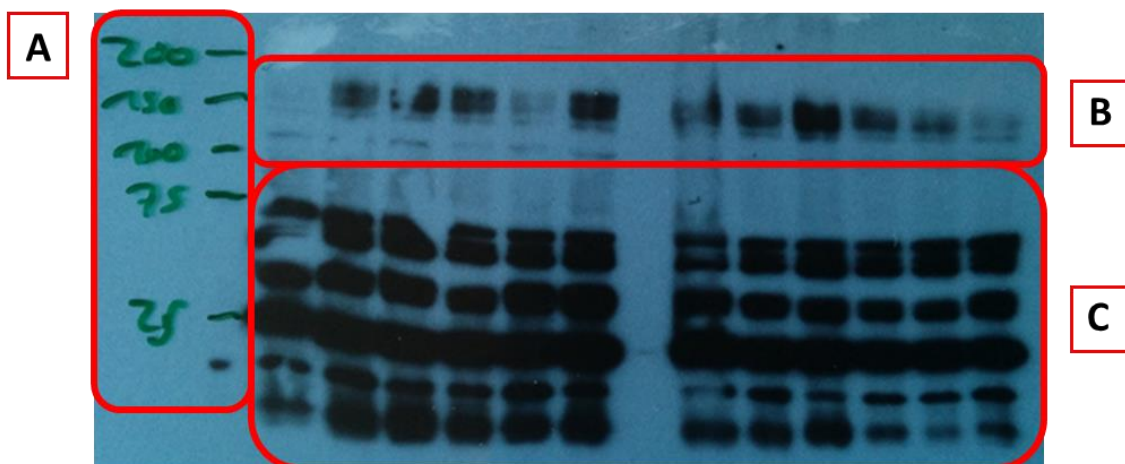


Abbildung 7 - **Exemplarische Darstellung eines Western Blots mit CSF-1R-Antikörper markierten Banden.** **A:** Spalte für verwendeten Marker mit farblich markierten Proteinen mit standardisierten Molekülmassen in kDa als Referenzwert für die untersuchten Proben. **B:** Zeile mit CSF-1R spezifischen Banden mit einer Molekülmasse von ca. 160 kDa. **C:** Zeilen mit unspezifischen Banden aufgrund der Polyklonalität des verwendeten CSF-1R-Antikörpers.

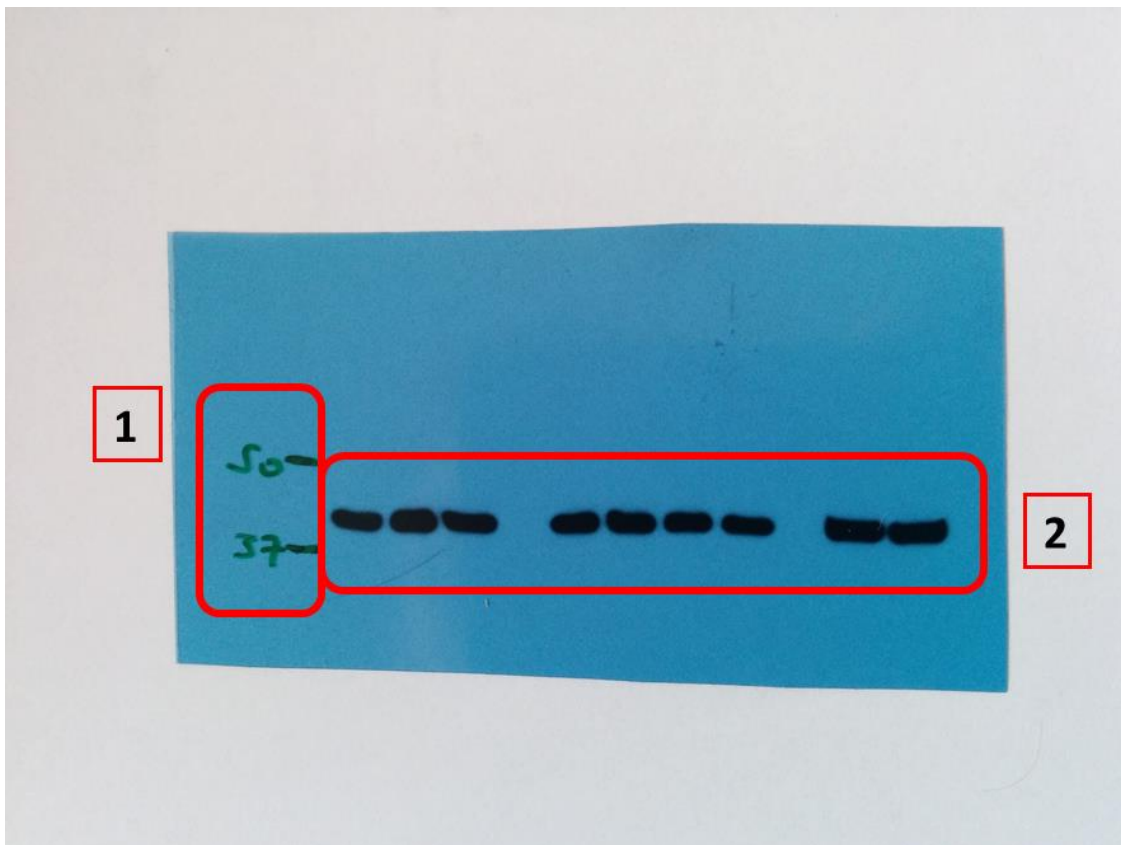


Abbildung 8 - Exemplarische Darstellung eines Western Blots mit  $\beta$ -Aktin-Antikörper markierten Banden. **1:** Spalte für verwendeten Marker mit farblich markierten Proteinen mit standardisierten Molekülmassen in kDa als Referenzwert für die untersuchten Proben. **2:** Zeile mit  $\beta$ -Aktin spezifischen Banden mit einer Molekülmasse von ca. 42 kDa.

## 2.8 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie (IHC) wurde der CSF-1R mit einem spezifischen Antikörper angefärbt, um die Expression des Rezeptors zwischen Studien- und Kontrollgruppe zu vergleichen. Hierzu wurden Gewebeschnitte von Hypoxie-Mäusen und Monocrotalin-Ratten sowie die dazugehörigen unbehandelten Kontrollgruppen lichtmikroskopisch beurteilt. Dieses sogenannte Intensity Scoring wurde auch an Lungenpräparaten von IPAH und COPD Patienten durchgeführt und mit Patientenlungen verglichen, die weder eine COPD noch eine IPAH aufwiesen.

### **2.8.1 Anfertigung der Präparate**

Die Paraffinblöcke wurde auf eine Kühlplatte gelegt und anschließend 3µm dicke Schnitte mit dem Microtom (Leica RM2255, Wetzlar) angefertigt. Diese Schnitte wurde in ein 40°C warmes Wasserbad (Leica HI1210, Wetzlar) gelegt und mit Super Frost Ultra Plus Objektträgern (Langenbrinck, Emmendingen) aufgenommen. Anschließend wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten, welche fortan als Präparate bezeichnet werden, für einige Stunden auf eine Heizplatte (Leica HI1220, Wetzlar) gestellt und über Nacht im Brutschrank (Memmert, Schwabach) bei 37°C getrocknet. Es wurden Serienschnitte angefertigt, um die Lokalisierung der CSF-1R-Färbung mit der bekannten Lokalisierung der alpha-smooth-muscle-aktin-Färbung ( $\alpha$ -sma) an glatten Muskelzellen und von-Willebrand-Faktor-Färbung (vWF) am vaskulären Endothel vergleichen zu können.

### **2.8.2 Doppelfärbung mit Alpha-smooth-muscle-actin und von-Willebrand-Faktor**

Bei der Doppelfärbung wurde das Paraffin bei 58°C für 60 Minuten von den Präparaten gelöst und anschließend mit Xylol (Roth, Karlsruhe) abgewaschen. Die Präparate wurden anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und für 20 Minuten in einem 3%-igen Gemisch aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt) und Methanol, reinst. inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Die Präparate wurden erst mit PBS-Puffer (80g NaCl, 2g KCl, 11,5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 900ml aqua dest.) bei RT und dann mit Trypsin (invitrogen, Frederick, MD, USA) bei 37°C für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert, um die Antigene freizulegen. Danach wurde erneut mit PBS gewaschen, sowie die Präparate mit 10%igem bovinen Serum-Albumin (BSA) für 20 Minuten bei RT beschichtet, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde durch Rodent Block M (Biocare Medical, Concord, CA, USA) für 30 Minuten bei RT endogenes IgG blockiert<sup>112</sup>. Es wurde mit PBS gewaschen und die Präparate dann mit dem Primärantikörper gegen Alpha-Aktin (Smooth Muscle Actin Maus, monoklonal; Sigma, USA) im Verhältnis 1:800 (1µl Antikörper, 799µl BSA 10%) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Es wurde wiederum mit PBS gewaschen und durch Beschichtung mit dem MM HRP Polymer (Biocare Medical, Concord, CA, USA) konnte der Peroxidase gekoppelte

Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden <sup>113</sup>. Schließlich konnte durch das VIP Peroxidase Substrat Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eine lila Färbung der glatten Muskelzellen erzielt werden. Bei der Färbung des vWFs wurden die Präparate mit PBS gewaschen, für 20 Minuten bei RT mit BSA 10% inkubiert, erneut mit PBS gewaschen und dann mit 2,5% Normal Horse Serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 20 Minuten bei RT inkubiert. Das Serum wurde anschließend lediglich dekantiert und die Präparate mit vWF-Antikörper (Ig-Fraktion, Kaninchen, polyklonal; Dako, Glostrup, Dänemark) bei 37°C im Verhältnis 1:1200 mit BSA 10% für 30 Minuten inkubiert. Es wurde erneut mit PBS gewaschen, die Präparate mit dem Sekundärantikörper ImmPRESS REAGENT Anti-Rabbit Ig Peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 30 Minuten bei RT inkubiert und dann ein letztes Mal in PBS gewaschen. Mit dem DAB Substrat Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) wurde eine braune Färbung der Endothelzellen erzielt. Schließlich wurden beide Färbungen mit Methylgrün (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) gegengefärbt, die Präparate wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, in Xylol getaucht und mit Pertex© (Medite, Burgdorf) eingedeckt.

### **2.8.3 CSF-1R-spezifische Färbung nach Alkalischer-Phosphatase-Methode (AP-Methode)**

Die Präparate wurden zu Beginn bei der CSF-1R-spezifischen Färbung nach demselben Schema wie bei der Doppelfärbung bei 58°C erwärmt, in Xylol getaucht und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dann wurden die Präparate in Küvetten gefüllt mit 95ml aqua dest. (Millipore, Schwalbach) und 5ml Citrate Buffer 20x pH=6,0 (invitrogen, Frederick, MD, USA) in einem Kocher für 20 Minuten gekocht, darin anschließend 10 Minuten warmgehalten und schließlich aus dem Kocher genommen und 30 Minuten runtergekühlt. Danach wurden die Präparate in *Tris-buffered saline* Puffer (TBS) (Zytomed, Berlin) gewaschen, da das bei der Doppelfärbung benutzte PBS als anorganisches Phosphat bei der AP-Methode die alkalische Phosphatase kompetitiv hemmen kann <sup>114</sup>. Nachdem für 15 Minuten Proteinase (Dako Real, Glostrup, Denmark) auf die Gewebeschnitte wirkte, wurden diese mit TBS gewaschen, mit BSA 10% die unspezifischen Bindungsstellen besetzt, erneut mit TBS gewaschen und dann das Maus- und das Rattengewebe mit Rodent M (Biocare Medical, Concord, CA, USA) für 30 Minuten bei RT und das humane Gewebe mit Blocking Solution (Zytomed, Berlin) für

5 Minuten bei RT inkubiert. Ab diesem Schritt fanden sämtliche Schritte in getrennten Gefäßen statt. Im Anschluss wurden die Präparate mit TBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem CSF-1R-Antikörper ABIN498117 (antikoerper-online.de, Aachen) inkubiert. Bei den humanen Proben wurde der Antikörper im Verhältnis 1:100 und bei Maus- sowie Rattenproben im Verhältnis 1:50 mit Antikörper-Diluent (Zytomed, Berlin) verdünnt. Am nächsten Tag wurden alle Präparate für zwei Stunden bei RT in TBS gewaschen, lediglich die humanen Schnitte wurden nach 30 Minuten in TBS für 20 Minuten mit Postblock (Zytomed, Berlin) inkubiert und anschließend weiter in TBS gewaschen. Danach wurden die Präparate mit AP-Polymer (Zytomed, Berlin) für 30 Minuten bei RT beschichtet. Bei diesem Schritt banden die Sekundärantikörper mit der kovalent gebundenen alkalischen Phosphatase an die Primärantikörper und sorgten somit bei der Entwicklung mit Warp Red (Biocare Medical, Concord, CA, USA) für eine spezifische Rotfärbung des CSF-1R. Danach wurden die Präparate mit Hämatoxylin (invitrogen, Frederick, MD, USA) gegengefärbt, was die Präparat-typische Blaufärbung der Zellkerne zur Folge hatte. In aqua dest. wurde diese Reaktion abgestoppt und anschließend wurden die Präparate in TBS belassen bis sich das Gewebe bläulich färbte. Nach einem weiteren Waschschrift in aqua dest. wurden die Gewebe durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, in Xylol getaucht und schließlich in Pertex© eingedeckt.

#### **2.8.4 Positiv- und Negativkontrollen**

Die Gewinnung von Positiv- und Negativkontrollen erfolgte zusammen mit den oben genannten Antikörperfärbungen. Die Präparate wurden exakt gleichbehandelt, jedoch wurden die Negativkontrollen nicht über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert, sondern in TBS-Puffer belassen. Auf diese Weise konnte eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers als unwahrscheinlich betrachtet werden. Bei den Positivkontrollen wurden Darm-, Milz- oder Tonsillengewebe immunhistochemisch gefärbt. Da dort nach Angaben des Herstellers des verwendeten ABIN498117 anti-CSF-1R-Antikörpers eine hohe Expression des Rezeptors aufgrund der zu erwartenden hohen Anzahl an CSF-1R-positiven Monozyten erwartet werden konnte.

### 2.8.5 Auswertung der Präparate

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate fand an dem Lichtmikroskop Leica DM6000B (Leica, Wetzlar) unter 20facher Vergrößerung statt. Jede Messung fand unter nahezu gleichen, in **Tabelle 1** und **Tabelle 2** abgebildeten Grundeinstellungen und verblindet statt, um Fehler zu minimieren.

Vorschau	Belichtungszeit	45,9ms
	Verstärkung	1,0x
	Farbsättigung	1,50x

Tabelle 3 - Standardisierte Grundeinstellung von Belichtungszeit, Verstärkung und Farbsättigung für das verwendete Lichtmikroskop.

Display	Intensität	19
	Aperturblende	38
	Feldblende	33

Tabelle 4 - Standardisierte Grundeinstellung von Intensität, Aperturblende und Feldblende für das verwendete Lichtmikroskop.

Hierbei wurde die Gewebefärbung des CSF-1R lichtmikroskopisch detektiert und mittels der speziellen, halbautomatischen Software *Qwin V3* (Leica, Wetzlar) morphometrisch quantifiziert. Bei dieser relativen Quantifizierung der CSF-1R-Expression wird die Farbintensität und die gefärbte Fläche zu einem *Score Value* Wert in Prozent (%) verrechnet<sup>115</sup>. Somit konnte über die *Score Value* die CSF-1R-Expression auf pulmpathologisch veränderten humanen Lungen, Rattenlungen und Mäuselungen mit den entsprechenden Kontrollen verglichen werden. Zu Beginn der Messung eines jeden Präparates wurde ein Weißabgleich durchgeführt (**Abbildung 9**), um die Messwerte auf die unspezifische Hintergrundfärbung zu normieren.



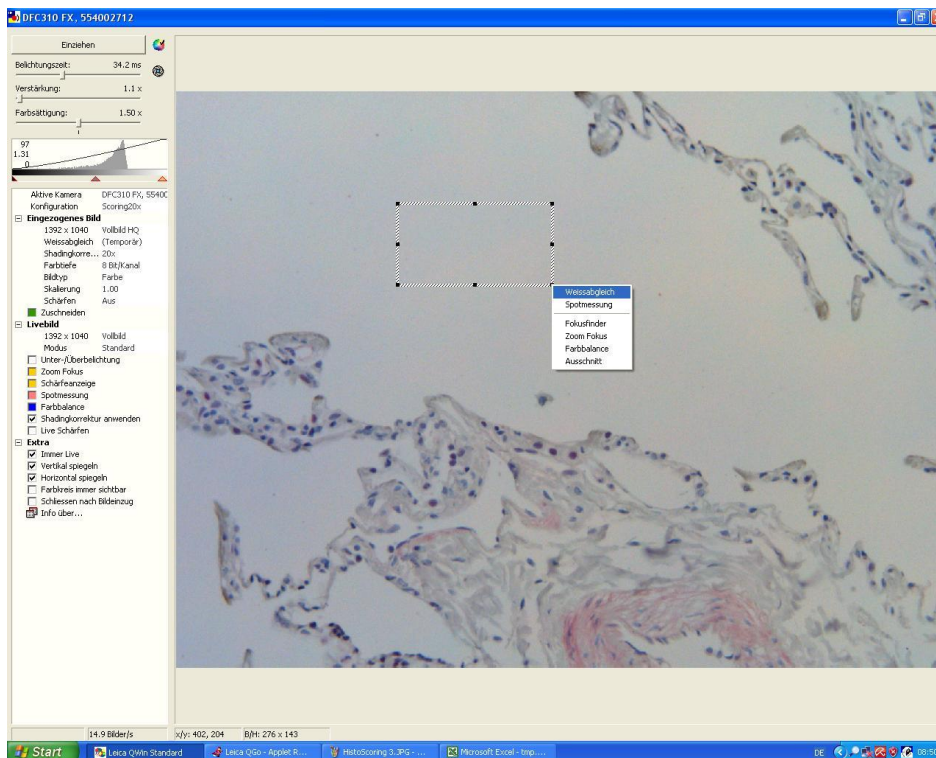


Abbildung 9 - Weißabgleich zur Normierung der Messwerte auf unspezifische Hintergrundfärbung.

Ebenfalls zu Beginn jeder Messung wurde als Referenz für alle Messwerte diejenige Stelle im Präparat ausgewählt, die die höchste Farbintensität in der CSF-1R-spezifischen Rotfärbung besaß (Abbildung 10).

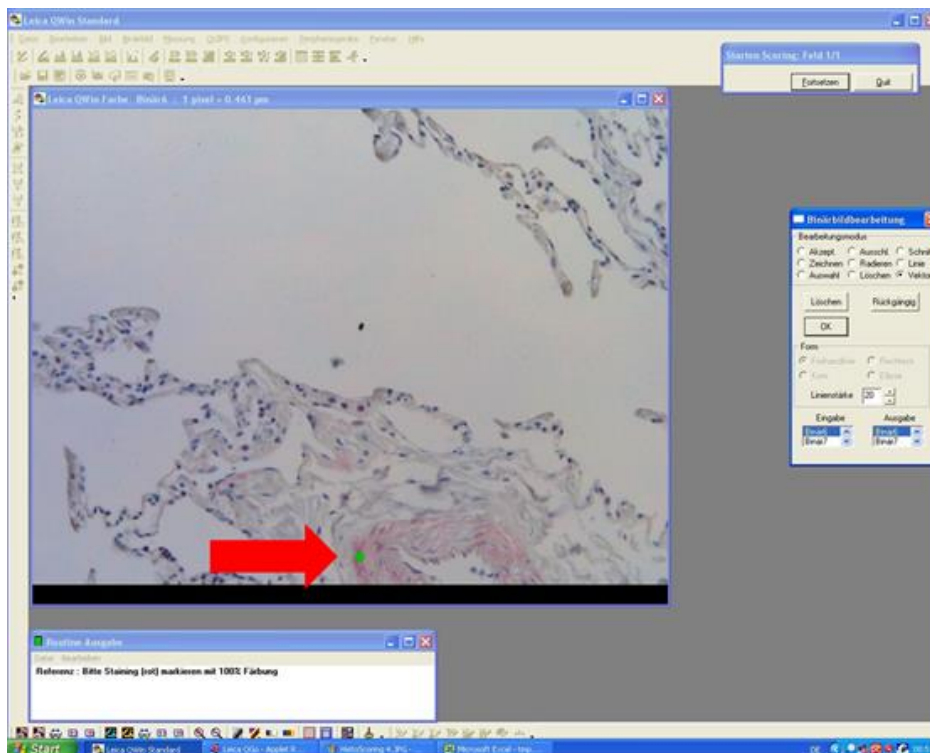


Abbildung 10 - Höchste Farbintensität in der CSF-1R-spezifischen Rotfärbung als Referenz für alle Messwerte.

Im Anschluss wurde jedes Präparat abschnittsweise mit dem Lichtmikroskop *in toto* erfasst. Exemplarisch zeigt **Abbildung 11** einen Präparatausschnitt, in dem die durch *Qwin V3* detektierte CSF-1R-spezifischen Rotfärbung durch türkisfarbene Umrandung zu sehen ist.

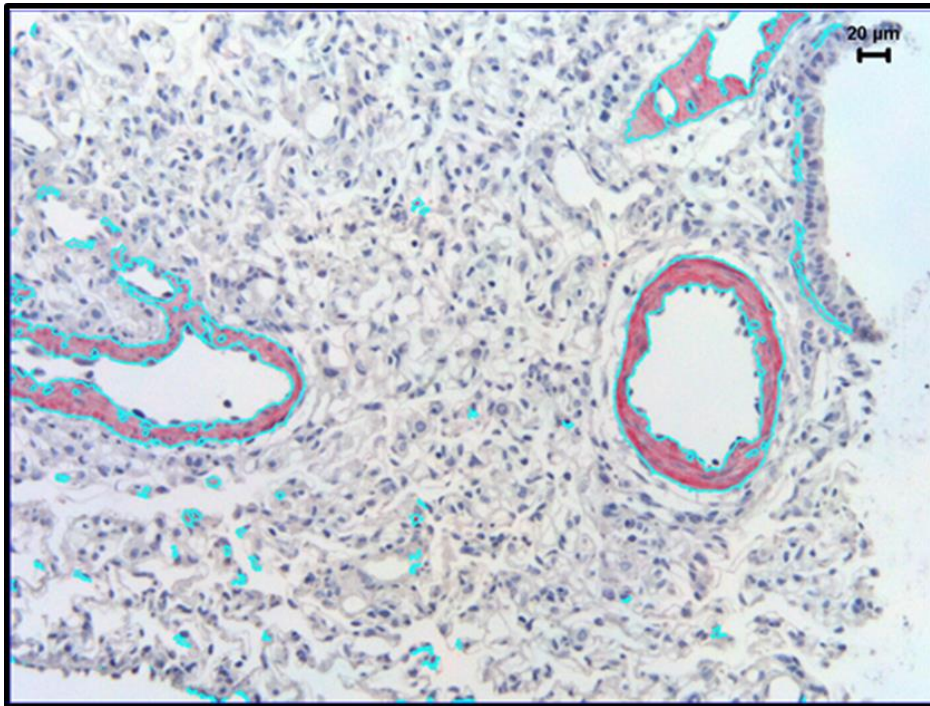


Abbildung 11 - Markierung der relevanten, durch *Qwin V3* detektierten CSF-1R-spezifischen Rotfärbung durch türkisfarbene Umrandung.

Die ermittelten Werte aus jedem Präparatausschnitt wurden von der Software in das in **Abbildung 12** gezeigte Tabellendokument übertragen. Es werden darin vier verschiedene Messwerte aufgelistet, die ebenfalls in **Abbildung 12** zu sehen sind und im Folgenden erklärt werden: **A)** Der **Scoring** Wert gibt die gemessene Intensität der Färbung an; **B)** Beim **Scoring %** Wert wird die gemessene Farbeintensität (*Scoring*) mit dem in **Abbildung 10** beschriebenen Referenzwert ins Verhältnis gesetzt und nach folgender Formel berechnet:  $(Scoring \times 100) / \text{Referenzwert}$ . Somit gibt der **Scoring %** Wert die relative Farbeintensität an; **C)** Die **Score Value %** berechnet sich nach der Formel  $Scoring \% \times (Area \% / 100)$ . Folglich entspricht die **Score Value %** der relativen Farbeintensität CSF-1R-spezifisch gefärbter Zellen normiert auf die gefärbte Gesamtfläche und die Gesamtfläche des Präparats. Somit kann bei einem signifikanten Anstieg der **Score Value %** auf eine signifikante Hochregulation der CSF-1R-Expression in den Zellen rückgeschlossen werden. Daher wurde die **Score Value %** der

einzelnen Präparate für die Auswertung der IHC verwendet; **D) Area %** gibt die im gesamten Präparat gemessene Fläche der CSF-1R-spezifischen Färbung in Bezug auf die Gesamtfläche des Präparates an ((gefärbte Gesamtfläche x 100) / Gesamtfläche des Präparates).

The screenshot shows an Excel spreadsheet titled 'Microsoft Excel - M\_150124\_084622.xls'. The main data table is as follows:

Scoring, single phase					
Lisca QWin		Date:			
		Time:			
		User:			
		Mass-Nr.:			
Reference:	Intensity Mean [0..255]	Scoring %	Score Value %	Area %	
	<b>42.6</b>	<b>61.76</b>	<b>1.78</b>	<b>2.88</b>	
Sum	65.228906	0.01410	0.558		
Mean	42.61	0.00705	0.279		
Single results					
Image	Intensity Mean [0..255]	Area [µm²]	Intensity Sum (Area mm² * IntensityMean)	Intensity %	Area %
1	48.878	3676.72705100	0.160	70.581	1.196535
2	36.352	10424.39746100	0.379	52.345	5.725838

Abbildung 12 – Tabellendokument der Software Qwin V3. Es werden vier verschiedene Messwerte aufgelistet: A) Scoring B) Scoring % C) Score Value % D) Area %.

## 2.9 Statistik

Sämtliche Daten sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Es wurde für die statistische Datenanalyse der ungepaarte Student-t-Test verwendet. So konnten zwei Gruppen miteinander verglichen werden. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als signifikant angesehen und mit einem „\*“ gekennzeichnet. Eine Varianzanalyse (analysis of variance = ANOVA) wurde für die statistische Analyse mehrerer Gruppen verwendet. Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden mit „\*“, solche mit  $p < 0,01$  mit „\*\*“ gekennzeichnet. Die Anzahl der verschiedenen Messungen wird mit „n = X“ angegeben.

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob PSMCs von Ratten, Mäusen und Menschen den CSF-1R exprimieren und welchen funktionellen Einfluss die Stimulation dieses Rezeptors auf die PSMCs hat. Die Überprüfung der Expression des CSF-1R fand auf RNA-Ebene mittels qPCR, auf Proteinebene mittels WB und auf Lungengewebeschnitten mittels IHC statt. Bei der qPCR wurde die Expression der CSF-1R-mRNA quantitativ bestimmt. Dazu wurde die RNA in cDNA umgeschrieben, die cDNA amplifiziert und schließlich die Höhe der Expression mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt. Die mRNA wird in die für ein Protein kodierende Aminosäuresequenz eines Polypeptids translatiert und so ein Protein gebildet. Somit gibt die RNA-Expression Auskunft über die mögliche Proteinexpression. Es sind für die CSF-1R-Expression jedoch auch Fälle bekannt, in denen die RNA-Expression nicht mit der Proteinexpression übereinstimmte<sup>87</sup>. Nachdem durch qPCR die CSF-1R-mRNA-Expression in PSMCs und Lungengewebe von Maus, Ratte und Mensch analysiert wurde, folgte der Nachweis der Proteinexpression mittels WB - hierzu wurden ebenfalls Lungengewebe und PSMCs von Maus, Ratte und Mensch verwendet. Da sich durch die qPCR sowie durch die WB eine CSF-1R-Expression in PSMCs und im Lungengewebe von Ratten, Mäuse und Menschen zeigen ließ, folgte die Auswertung der immunhistochemischen CSF-1R-Färbung zur Lokalisation und Quantifizierung der Expression. Der verwendete *Score Value* Wert setzt sich aus der relativen Färbeintensität, also der aktuell gemessenen Färbeintensität pro Bildausschnitt normiert auf die maximale Färbeintensität im jeweiligen Präparat, und der angefärbten Fläche pro Bildausschnitt in Prozent nach folgender Formel zusammen: relative Färbeintensität x (angefärbte Fläche/100). Somit werden, wie in **Abbildung 9 bis Abbildung 12** gezeigt, in der immunhistochemischen Auswertung der CSF-1R-Expression sowohl die relative Intensität als auch die Fläche der CSF-1R-spezifischen Rotfärbung berücksichtigt. Zur Einschätzung der Funktionalität des CSF-1R wurden PSMCs mit CSF-1 stimuliert und mittels spezifischer Assays deren Proliferations- und Migrationsverhalten ermittelt.

#### 3.1 Auswertung der qPCR

Die Analyse der mRNA-Expression zeigte das Vorhandensein der CSF-1R-mRNA in Lungen- bzw. PSMC-Proben von MCT-behandelten Ratten (**Abbildung 13**),

Tabakrauch-exponierten Mäusen (**Abbildung 14 links**), Hypoxie-exponierten Mäusen (**Abbildung 14 rechts**) sowie Hypoxie-exponierten humanen PASMCs (**Abbildung 15 rechts**). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Placebo-behandelten Kontrolle gezeigt werden. Auch im Homogenat von COPD- und IPAH-Patienten konnte im Vergleich zu lungengesunden Donoren (**Abbildung 15 links**) kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die CSF-1R-RNA-Expression gezeigt werden.

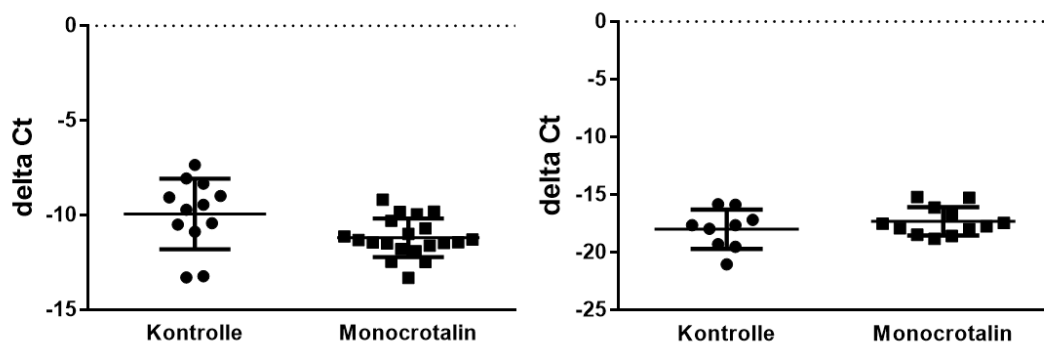


Abbildung 13 – **CSF-1R-mRNA-Expression in MCT-behandelten Ratten.** *Links Homogenat:* Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression von unbehandelten (Kontrolle) mit MCT-behandelten Ratten mittels qPCR. Normierung der delta Ct-Werte auf HPRT; n = 12 (Kontrolle), n = 20 (MCT). Nicht signifikant. *Rechts PASMCs:* Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression in PASMCs isoliert von unbehandelten (Kontrolle) und MCT-behandelten Ratten mittels qPCR. Normierung der delta Ct-Werte auf HPRT; n = 9 (Kontrolle), n = 12 (MCT). Nicht signifikant.

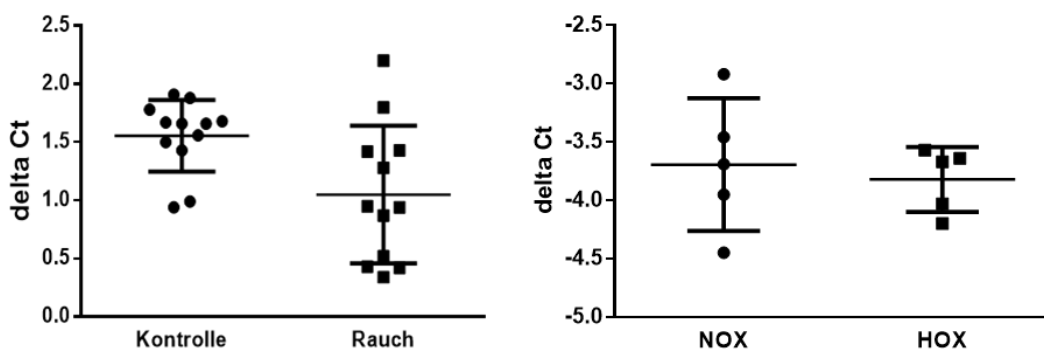


Abbildung 14 – *Links CSF-1R-mRNA-Expression in Tabakrauch-exponierten Mäusen:* Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression von unbehandelten (Kontrolle) mit Tabakrauch-exponierten Mäusen (Rauch) mittels qPCR. Normierung der delta Ct-Werte auf PBGD; n = 12 pro Gruppe. Nicht signifikant. *Rechts CSF-1R-mRNA-Expression in Hypoxie-exponierten Mäusen:* Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression von Normoxie-behandelten (NOX) mit unter Hypoxie gehaltenen Mäusen (HOX) mittels qPCR. Normierung der delta Ct-Werte auf HPRT; n = 5 (NOX), n = 5 (HOX). Nicht signifikant.

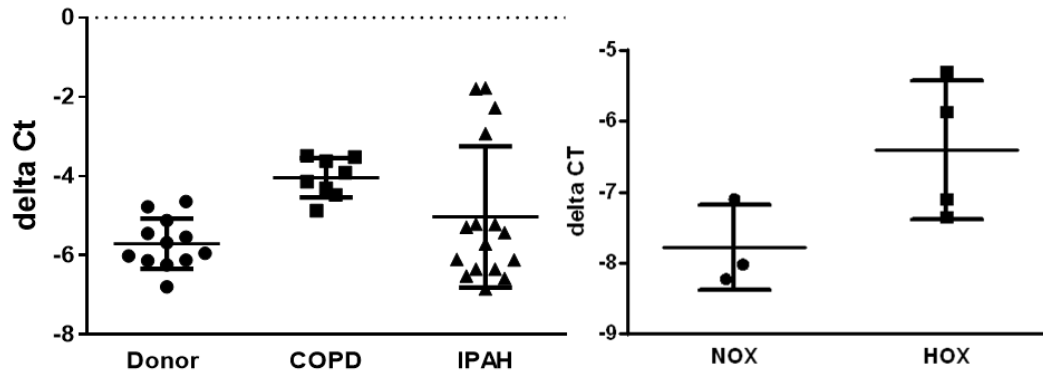


Abbildung 15 – *Links* CSF-1R-mRNA-Expression in Humanen Proben von COPD- und IPAH-Patienten sowie Donoren: Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression von lungengesunden Donoren mit COPD- sowie IPAH-Patienten mittels qPCR. Normierung der delta Ct-Werte auf B2M; n = 12 (Donor), n = 8 (COPD), n = 16 (IPAH). Nicht signifikant. *Rechts* CSF-1R-mRNA-Expression in Hypoxie-exponierten humanen PSMCs: Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression von unbehandelten (NOX) mit Hypoxie-exponierten humanen PSMCs. Normierung der delta Ct-Werte auf PBGD; n = 3 (NOX), n = 4 (HOX). Nicht signifikant.

### 3.2 Auswertung der Western Blot Analyse

Die CSF-1R-Proteinexpression konnte in allen untersuchten Lungen- bzw. PSMC-Proben von MCT-behandelten Ratten (**Abbildung 16**), Tabakrauch-exponierten Mäusen (**Abbildung 17 links**), Hypoxie-exponierten Mäusen (**Abbildung 17 rechts**), Hypoxie-exponierten humanen PSMCs (**Abbildung 19**) sowie deren jeweiligen Placebo-behandelten Kontrollen die Expression des CSF-1R gezeigt werden; ebenso im Homogenat von COPD- und IPAH-Patienten (**Abbildung 18**) sowie lungengesunden Donoren. Insbesondere für PSMCs (**Abbildung 16 rechts** und **Abbildung 19**) war die Expression des CSF-1R zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Quantitativ zeigte sich in der WB allein bei PSMCs von MCT-behandelten Ratten (**Abbildung 16 rechts**) eine signifikant erhöhte CSF-1R-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Bei allen anderen bereits aufgezählten untersuchten Versuchsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in der WB.

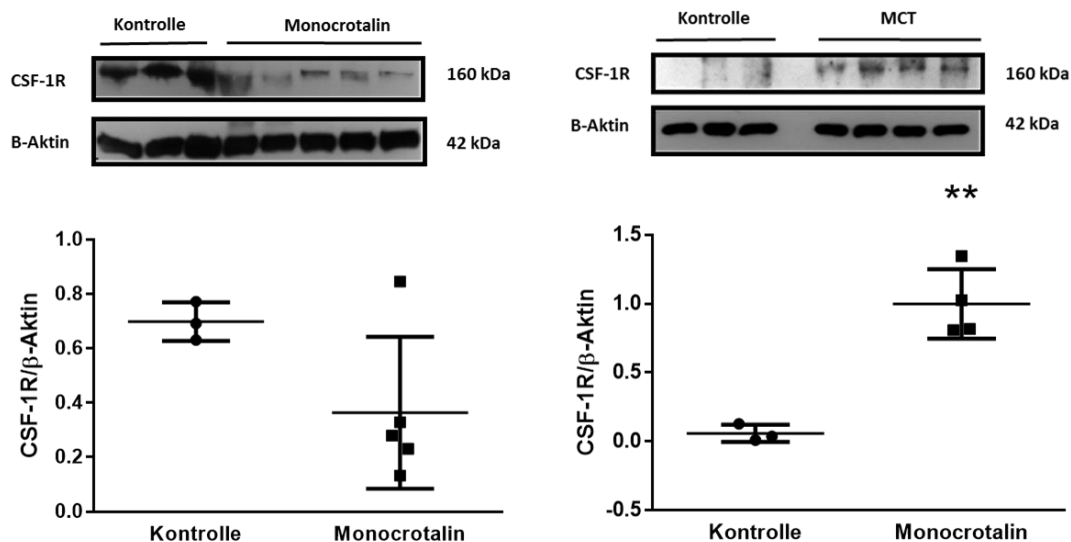


Abbildung 16 – **CSF-1R-Proteinexpression in MCT-behandelten Ratten.** *Links Homogenat:* Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse; n = 3 (Kontrolle), n = 5 (MCT). Normierung der Proteinkonzentration auf  $\beta$ -Aktin. Nicht signifikant. *Rechts PSMCs:* Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse. Normierung der Proteinkonzentration auf  $\beta$ -Aktin; n = 3 (Kontrolle), n = 4 (MCT). „\*\*\*“ Signifikant ( $p < 0,01$ ).

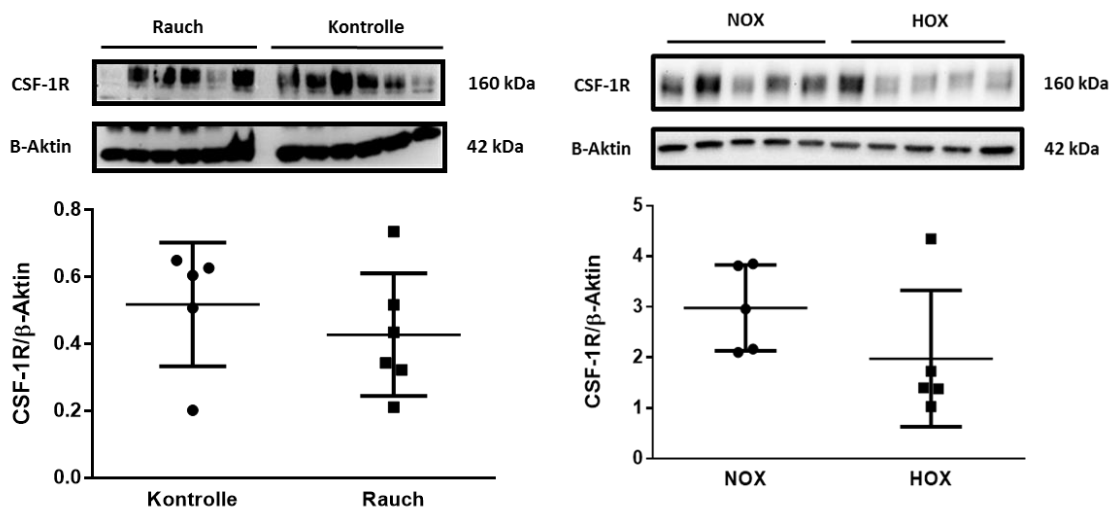


Abbildung 17 – *Links CSF-1R-Proteinexpression in Tabakrauch-exponierten Mäusen:* Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse. Normierung der Proteinkonzentration auf  $\beta$ -Aktin; n = 6 (Kontrolle), n = 6 (Rauch). Nicht signifikant. *Rechts CSF-1R-Proteinexpression in Hypoxie-exponierten Mäusen:* Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse. Normierung der Proteinkonzentration auf  $\beta$ -Aktin; n = 5 (NOX), n = 5 (HOX). Nicht signifikant.



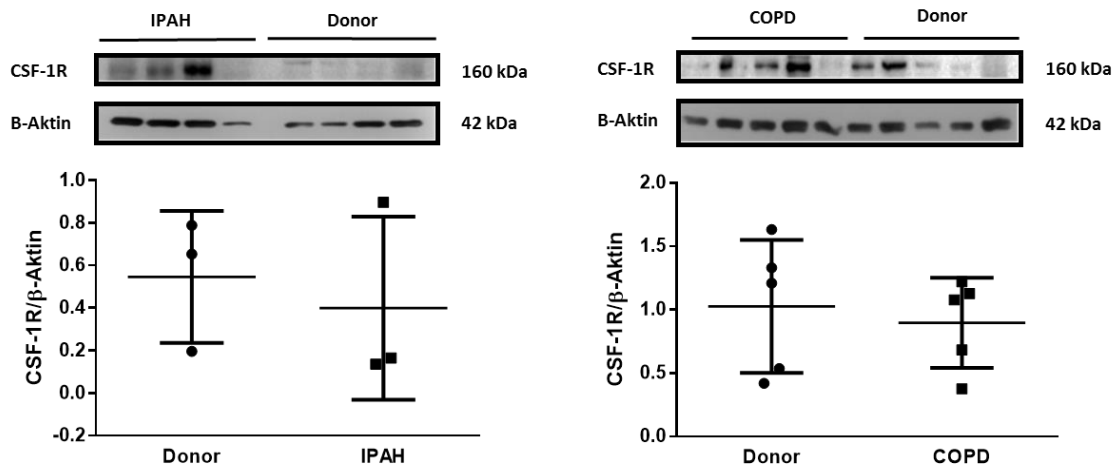


Abbildung 18 - **CSF-1R-Proteinexpression in Humanen Proben von COPD- und IPAH-Patienten sowie Donoren**: Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse. Normierung der Proteinkonzentration auf  $\beta$ -Aktin; *links* n = 3 (IPAH), n = 3 (Donor). Nicht signifikant – bei Ausschluss der vierten Probe von links (IPAH) und der zweiten Probe von rechts (Donor) aufgrund von nicht detektierbarem CSF-1R-Signal in der Densitometrie. *Rechts* n = 5 (IPAH), n = 5 (Donor). Nicht signifikant.

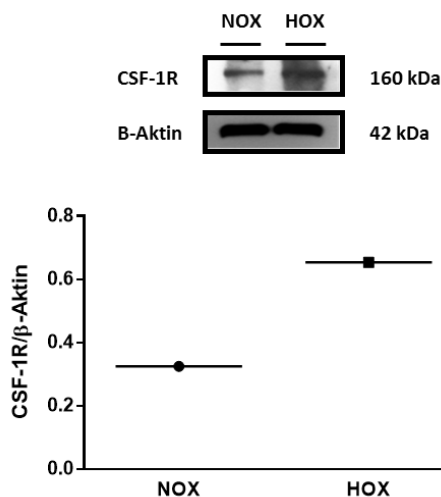


Abbildung 19 - **Hypoxie-exponierte humane PASMCs**: Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse. Normierung der Proteinkonzentration auf  $\beta$ -Aktin; n = 1 (NOX), n = 1 (HOX). Nicht signifikant.

### 3.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

#### 3.3.1 Validierung des Antikörpers

Um eine unspezifische Rotfärbung der Präparate durch eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers bei der IHC auszuschließen, wurden Negativkontrollen angefertigt.



Dabei wurde lediglich der Schritt der Inkubation mit dem Primärantikörper durch eine TBS-Puffer-Inkubation ersetzt. Da es auf den Negativkontrollen von humanen Proben (**Abbildung 20**), Maus (**Abbildung 21**) und Ratte (**Abbildung 22**) zu keiner Rotfärbung kam, konnte von einer Spezifität des Sekundärantikörpers für den Primärantikörper ausgegangen werden. In den Positivkontrollen wurden Gewebeschnitte aus Organen CSF-1R-spezifisch angefärbt, in denen sich laut Herstellerangabe eine Vielzahl von CSF-1R positiven Zellen finden; Milz in **Abbildung 23** und **Abbildung 25**, Darm in **Abbildung 24**. Somit wurde die vom Hersteller angegebene Spezifität für CSF-1R positive Zellen validiert.

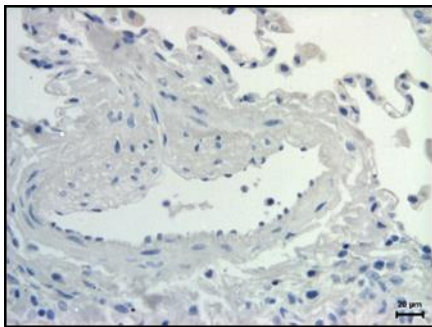


Abbildung 20 - Negativkontrolle human. Keine Rotfärbung.

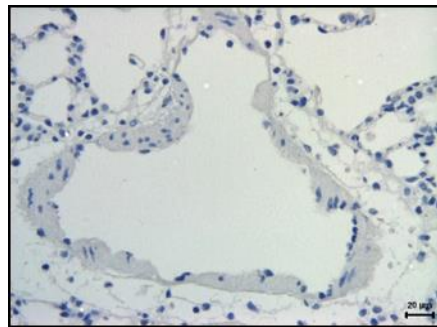


Abbildung 21 - Negativkontrolle Ratte. Keine Rotfärbung.

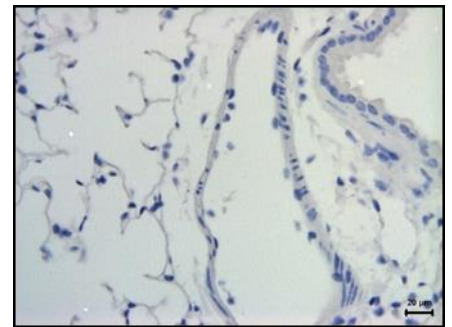


Abbildung 22 - Negativkontrolle Maus. Keine Rotfärbung.

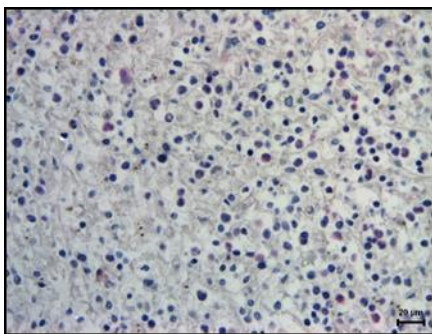


Abbildung 23 - Positivkontrolle human Milz. Mutmaßlich sind insbesondere die CSF-1R-exprimierenden Monozyten rot gefärbt.

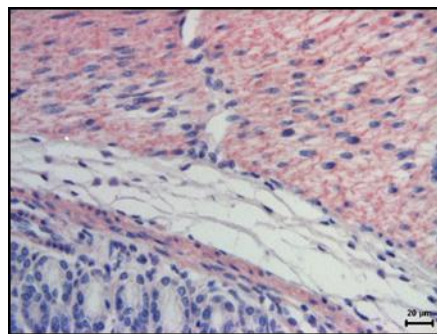


Abbildung 24 - Positivkontrolle Maus Darm. Rotfärbung in der Muskelschicht der Darmwand.

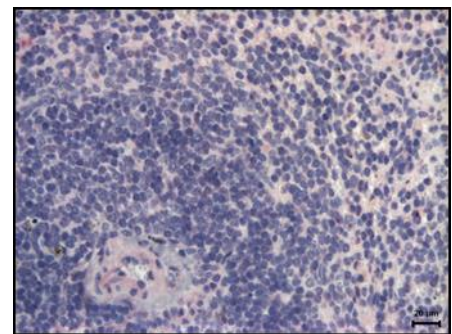


Abbildung 25 - Positivkontrolle Maus Milz. Mutmaßlich sind insbesondere die CSF-1R-exprimierenden Monozyten rot gefärbt.

### 3.3.2 Lokalisierung der Zielstruktur mittels Doppelfärbung

Um die Lokalisation der CSF-1R-spezifischen Rotfärbung beurteilen zu können, wurde die standardisierte Doppelfärbung mit der CSF-1R-spezifischen Färbung verglichen. Bei der sogenannten Doppelfärbung wurden  $\alpha$ -smooth-muscle-actin ( $\alpha$ -sma) und von-

Willebrand-Faktor (vWF) spezifisch angefärbt. Wie in **Abbildung 26 rechts** zu sehen, ist dabei  $\alpha$ -sma für glatte Muskelzellen spezifisch blauviolett angefärbt und vWF vor allem am Endothel exprimiert spezifisch braun.

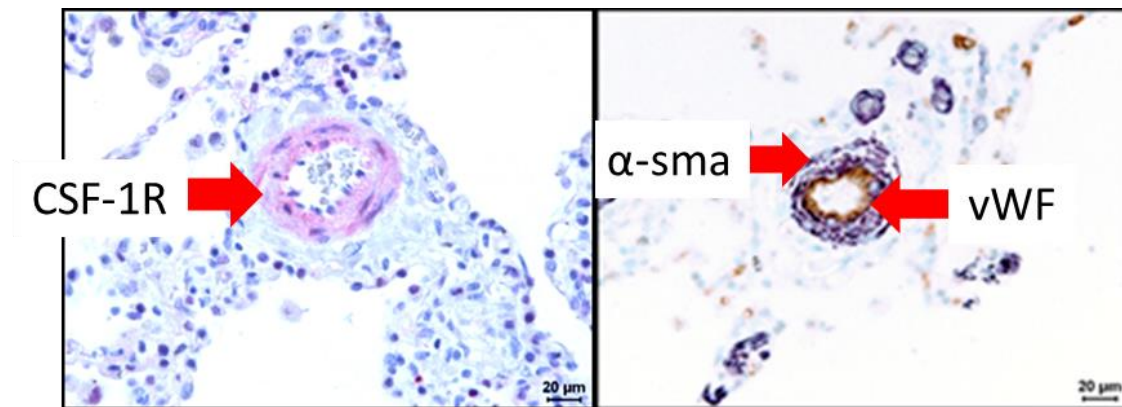


Abbildung 26 – **CSF-1R-Expression in pulmonalen Gefäßen in aufeinander folgenden Serienschnitten:** *Links* Exemplarisches Bild einer CSF-1R-spezifischen Rotfärbung. *Rechts* Exemplarisches Bild einer Doppelfärbung mit vWF-spezifischer Braunfärbung am Endothel und  $\alpha$ -sma-spezifischer Blauviolett färbung an glatten Muskelzellen.

Es wurden jeweils zwei aufeinander folgende Serienschnitte verwendet, von denen der eine Schnitt mit der Doppelfärbung und der andere Schnitt mit der CSF-1R-spezifischen Methode angefärbt wurde. Durch das Aufsuchen desselben Gefäßes in den zwei verschiedenen angefärbten Serienschnitten (**Abbildung 26**) war es möglich, die unterschiedlichen Färbungen zu vergleichen und somit die CSF-1R-spezifische Rotfärbung im Bereich der  $\alpha$ -sma-positiven PASMCs lokalisieren zu können. Auf diese Weise konnte die CSF-1R-spezifische Rotfärbung an PASMCs validiert werden. In der Folge (**Abbildung 27 bis Abbildung 35**) werden die aufeinander folgenden Serienschnitte des jeweiligen Versuchsmodells nebeneinander dargestellt. Dabei handelt es sich stets auf der linken Seite der Abbildung um die CSF-1R- und auf der rechten Seite um die  $\alpha$ -sma/vWF-spezifische Färbung desselben Gefäßes in aufeinander folgenden Serienschnitten. Somit konnte für jedes einzelne in dieser Arbeit verwendete Versuchsmodell die CSF-1R-Färbung im Bereich der PASMCs lokalisiert und somit validiert werden.

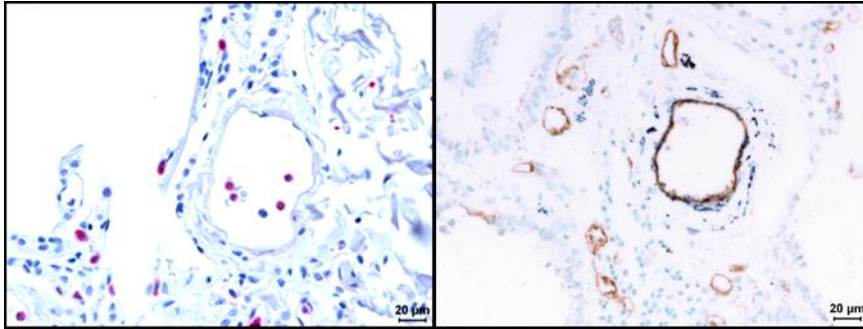


Abbildung 27 - Donor human: *links* CSF-1R, *rechts*  $\alpha$ -sma/vWF.

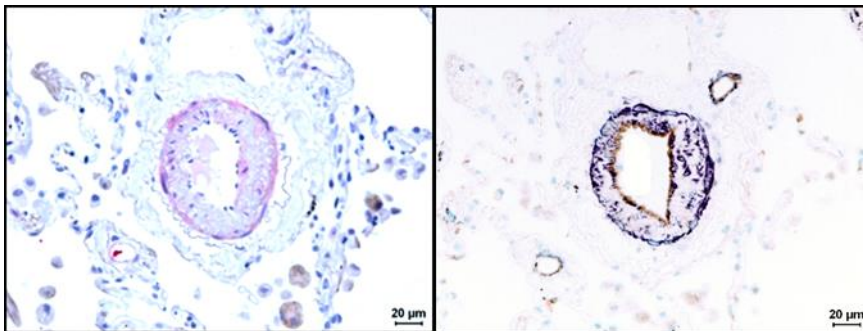


Abbildung 28 - COPD human: *links* CSF-1R, *rechts*  $\alpha$ -sma/vWF.

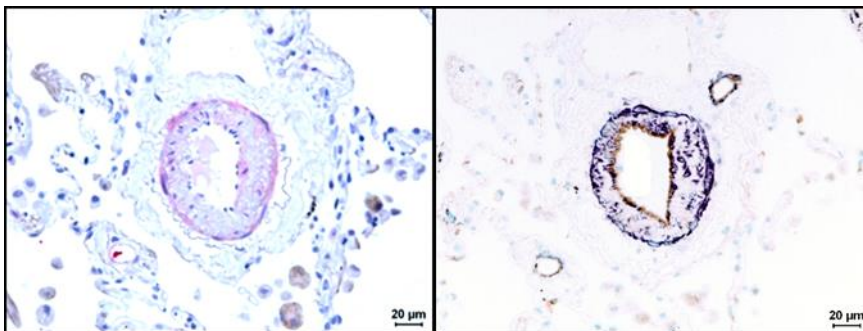


Abbildung 29 - IPAH human: *links* CSF-1R, *rechts*  $\alpha$ -sma/vWF.

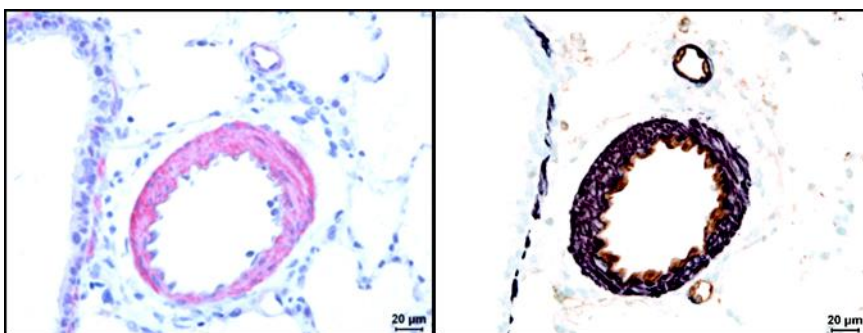


Abbildung 30 - MCT-behandelte Ratte: *links* CSF-1R, *rechts*  $\alpha$ -sma/vWF.



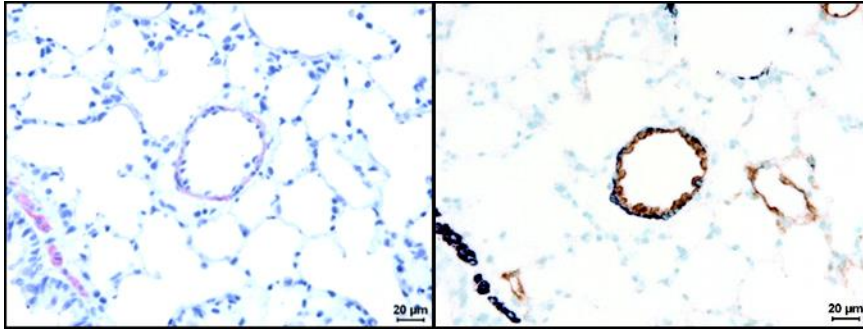


Abbildung 31 - unbehandelte Kontrolle Ratte: *links* CSF-1R, *rechts*  $\alpha$ -sma/vWF.

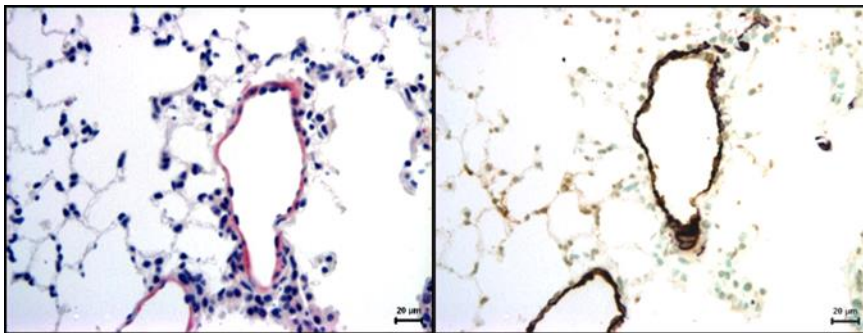


Abbildung 32 - Hypoxie-exponierte Maus: *links* CSF-1R, *rechts*  $\alpha$ -sma/vWF.

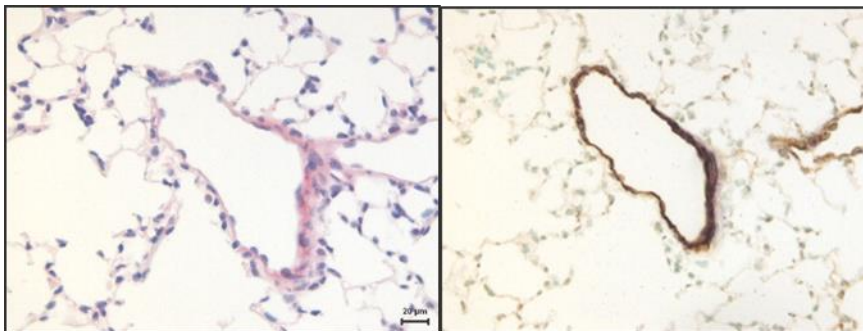


Abbildung 33 - Normoxie-exponierte Maus: *links* CSF-1R, *rechts*  $\alpha$ -sma/vWF.

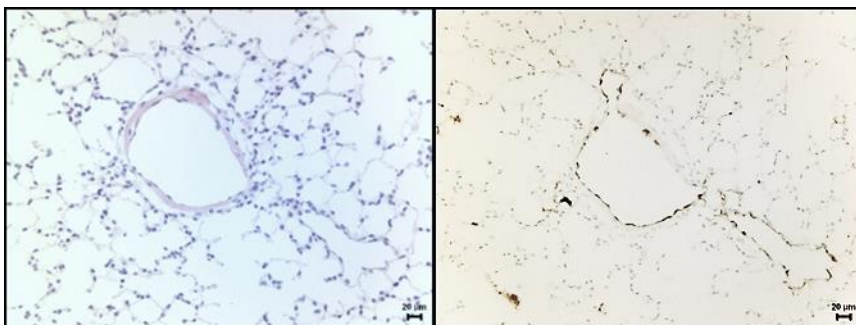


Abbildung 34 – Tabakrauch-exponierte Maus: *links* CSF-1R, *rechts*  $\alpha$ -sma/vWF.

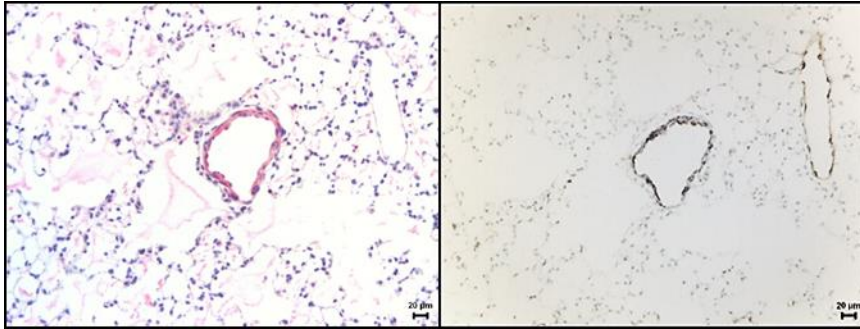


Abbildung 35 – Kontrolle zur Tabakrauch-exponierten Maus: *links* CSF-1R, *rechts*  $\alpha$ -sma/vWF.

### 3.3.3 Auswertung der CSF-1R-spezifischen Färbung

Die Quantifizierung der Gewebefärbungen zeigte signifikant erhöhte CSF-1R-Expressionen bei MCT-behandelten Ratten im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrolle (**Abbildung 36**) sowie bei COPD- und IPAH-Patienten im Vergleich zu lungengesunden Donoren (**Abbildung 39**). Tabakrauch-exponierte (**Abbildung 37**) und Hypoxie-exponierte Mäuse (**Abbildung 38**) zeigten keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die CSF-1R-Expression im Vergleich zu den jeweiligen Placebo-behandelten bzw. Normoxie-exponierten Kontrollen.

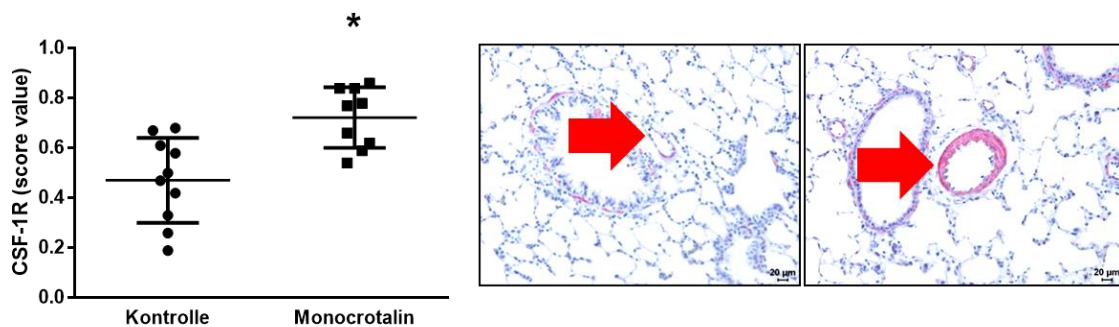


Abbildung 36 - **MCT-behandelte Ratten**: Morphometrische Quantifizierung der CSF-1R-Expression der immunhistochemisch rot angefärbten Präparate; n = 10 (Kontrolle), n = 10 (MCT). „\*“ Signifikant ( $p < 0,05$ ). **Bilder**: *Links* Pulmonales Gefäß einer Placebo-behandelten Ratte. *Rechts* Pulmonales Gefäß einer MCT-behandelten Ratte.

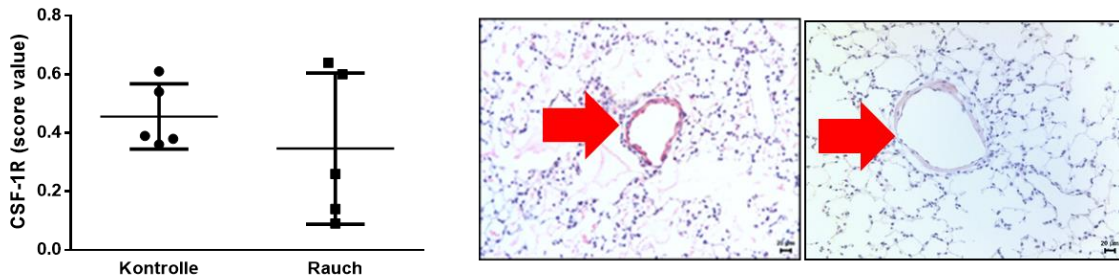


Abbildung 37 - **Tabakrauch-exponierte Mäuse**: Morphometrische Quantifizierung der CSF-1R-Expression der immunhistochemisch rot angefärbten Präparate; n = 5 (Kontrolle), n = 5 (Rauch). Nicht signifikant. **Bilder**: *Links* Pulmonales Gefäß einer Placebo-behandelten Kontrollmaus. *Rechts* Pulmonales Gefäß einer Tabakrauch-exponierten Maus.

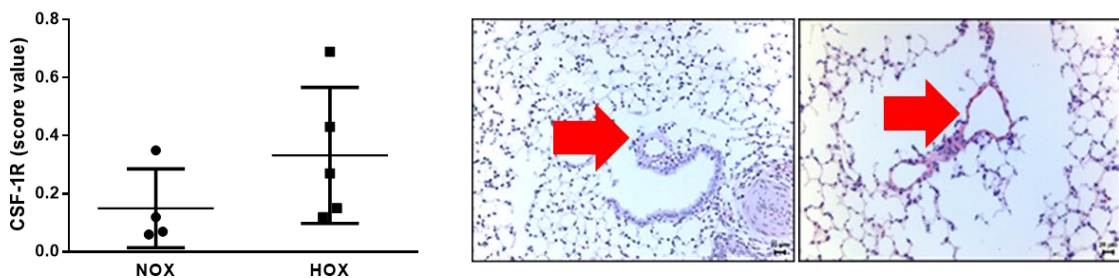


Abbildung 38 - **Hypoxie-exponierte Mäuse**: Morphometrische Quantifizierung der immunhistochemisch rot angefärbten Präparate; n = 5 (NOX), n = 5 (HOX). Nicht signifikant. **Bilder**: *Links* Pulmonales Gefäß einer Normoxie-exponierten Maus. *Rechts* Pulmonales Gefäß einer Hypoxie-exponierten Maus.

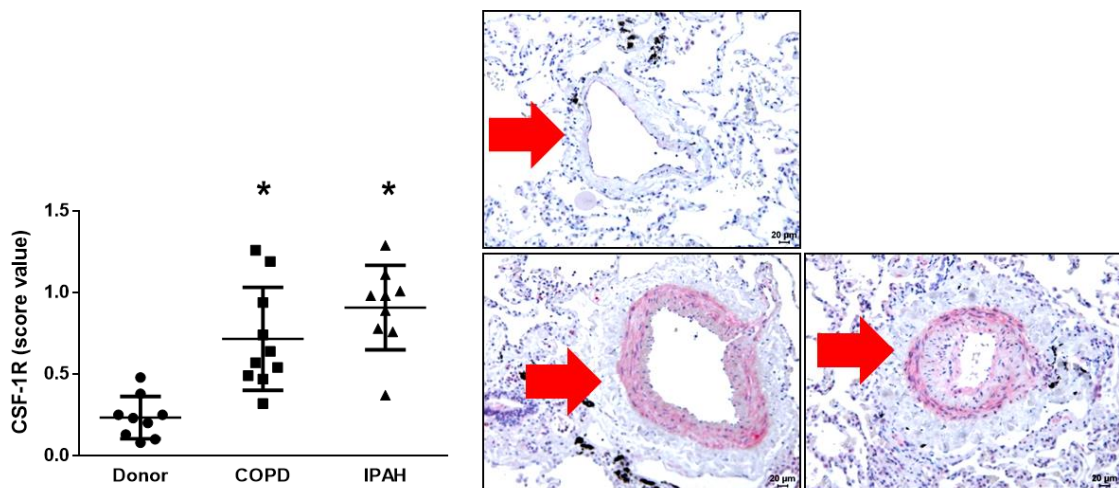


Abbildung 39 - **Humane Proben von COPD- und IPAH-Patienten und Donoren**: Morphometrische Quantifizierung der CSF-1R-Expression der immunhistochemisch rot angefärbten Präparate; n = 10 (Donor), n = 10 (COPD), n = 10 (IPAH). COPD- und IPAH-Gruppe zeigen „\*\*\*“ signifikant erhöhte CSF-1R-Expression im Vergleich zu lungengesunden Donoren ( $p < 0,05$ ). **Bilder**: *Oben* Pulmonales Gefäß eines lungengesunden Donoren. *Unten links* Pulmonales Gefäß eines COPD-Patienten. *Unten rechts* Pulmonales Gefäß eines IPAH-Patienten.

### 3.4 Funktionelle Assays

Nachdem die Expression des CSF-1R mittels qPCR, WB und IHC gezeigt werden konnte, wurden der Einfluss des CSF-1R auf die Funktion der Maus-PASMCs untersucht.

#### 3.4.1 Auswertung des Proliferationsassays

Im Proliferationsassay wurden aus Mäusen isolierte PASMCs in der Versuchsgruppe mit 10ng/ $\mu$ l CSF-1 bzw. 100ng/ $\mu$ l CSF-1 stimuliert und in der Kontrollgruppe lediglich mit NaCl behandelt. Im Anschluss wurde die Proliferation nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen. Bei der Stimulation der PASMCs mit 10ng/ $\mu$ l CSF-1 sowie 100ng/ $\mu$ l CSF-1 zeigten sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu keinem Zeitpunkt des Versuchs Unterschiede im Proliferationsverhalten (**Abbildung 40**).

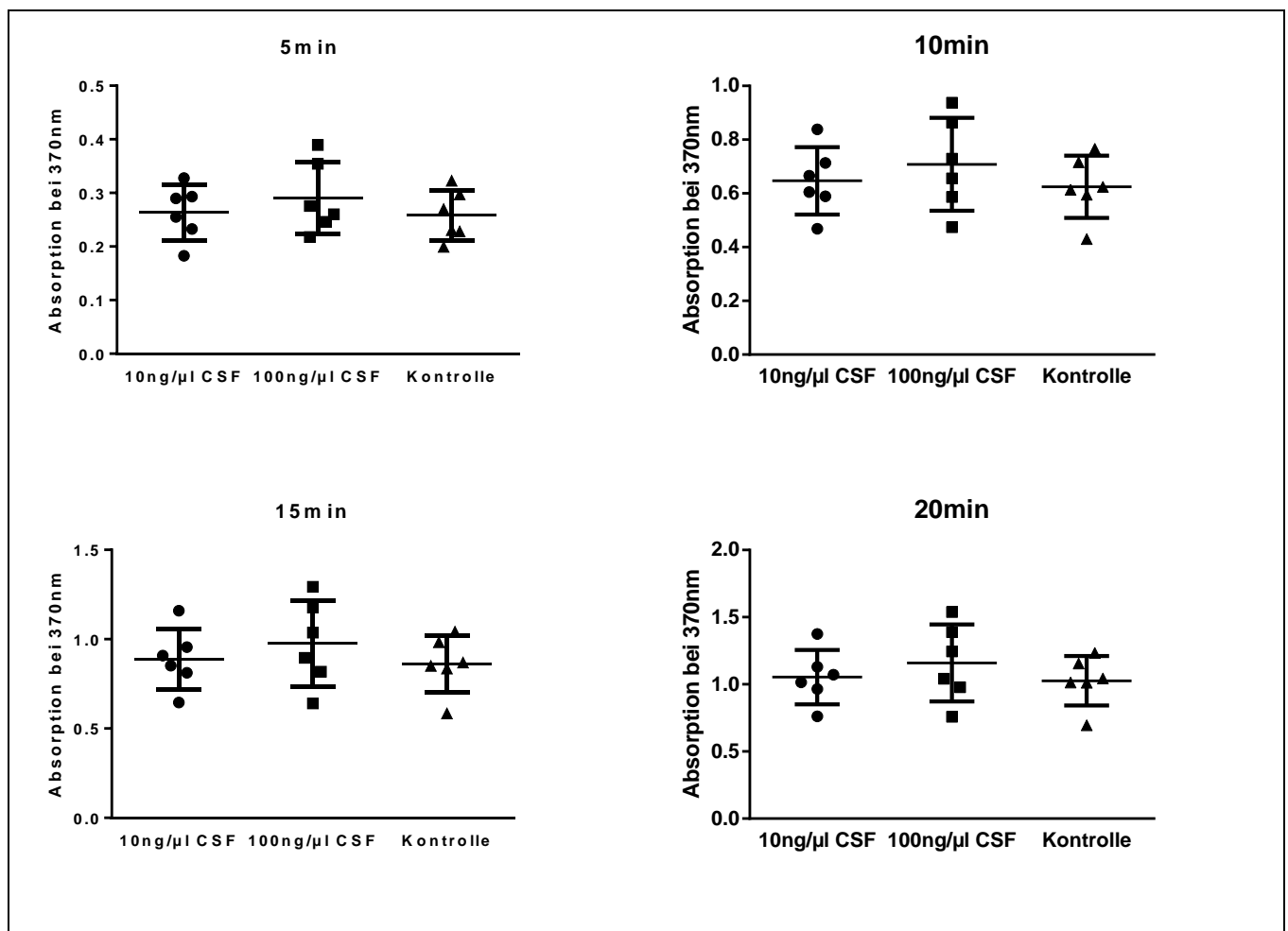


Abbildung 40 – Einfluss der CSF-1-Stimulation auf die DNA-Syntheserate bei murinen PASMCs. Die PASMCs wurden mit 10ng/ $\mu$ l CSF-1 bzw. mit 100ng/ $\mu$ l CSF-1 und als Kontrolle mit NaCl stimuliert. Auswertung des Proliferationsassays nach 5, 10, 15 und 20 Minuten.

### 3.4.2 Auswertung des Migrationsassays

Im Migrationsassay (**Abbildung 42 bis Abbildung 47**) wurden PAMSCs von Mäusen in der Versuchsgruppe mit 50 ng/μl CSF-1 stimuliert und in der Kontrollgruppe lediglich mit NaCl behandelt. Um die Wirkung der CSF-1-Stimulation beurteilen zu können, wurde der Zeitpunkt nach 3 Stunden als Ausgangswert verwendet und die anschließenden Messungen nach 6 bzw. 12 Stunden zwischen stimulierten und unstimulierten PAMSCs miteinander verglichen. Es zeigte sich dabei nach sechs Stunden bei mit 50 ng/μl CSF-1 stimulierten Zellen ein signifikanter Unterschied im Migrationsverhalten im Vergleich zur NaCl-behandelten Kontrolle (**Abbildung 41**). Nach 12 Stunden war noch immer ein erkennbarer, jedoch nicht signifikanter Unterschied bei den stimulierten PAMSCs im Vergleich zur mit NaCl-behandelten Kontrolle zu sehen (**Abbildung 41**).

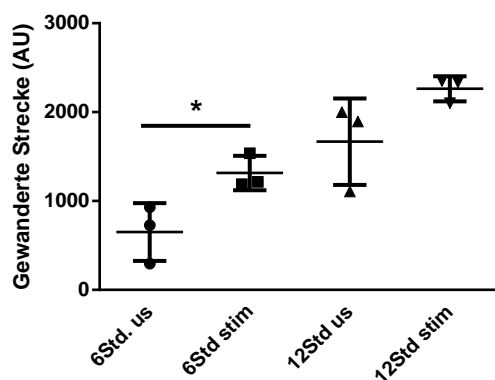


Abbildung 41 - Einfluss der CSF-1-Stimulation auf die Migrationsrate bei murinen PAMSCs. Vergleich von CSF-1 stimulierten Maus PAMSCs (stim) mit Placebo (NaCl)-behandelten Maus PAMSCs (us) nach 6 und 12 Stunden (Std.). „\*“ Signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

Im Folgenden sind das Einwandern der Zellen in den Migrationsspalt im Vergleich auf der linken Seite die Placebo-behandelten Probe nach 3 (**Abbildung 42**), 6 (**Abbildung 44**), 12 Stunden (**Abbildung 46**) und in der rechten Spalte die CSF-1-stimulierte Probe ebenfalls nach 3 (**Abbildung 43**), 6 (**Abbildung 45**) und 12 Stunden (**Abbildung 47**) zu sehen.



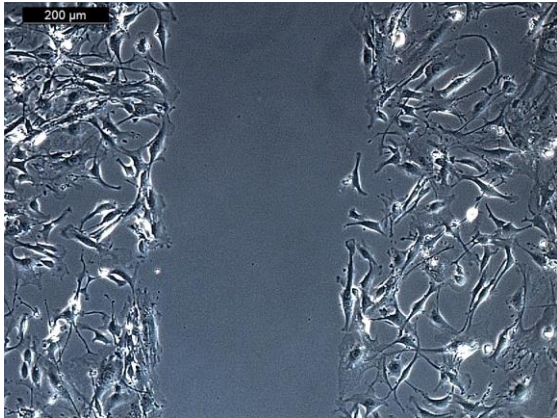


Abbildung 42 - Unstimuliert nach 3h.

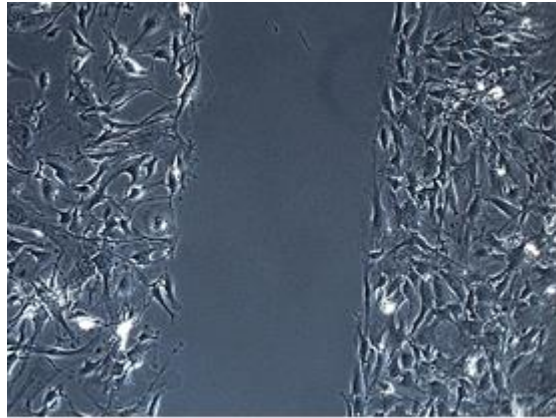


Abbildung 43 - Stimuliert mit CSF-1 nach 3h.

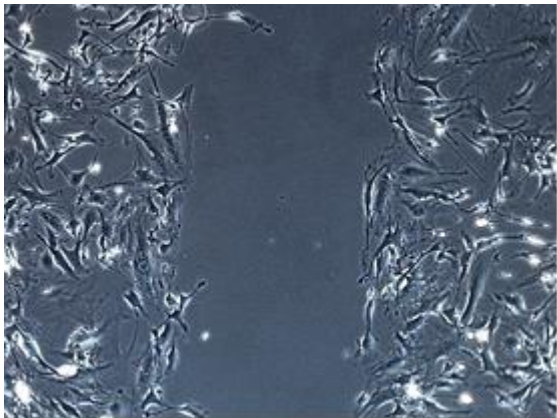


Abbildung 44 - Unstimuliert nach 6h.

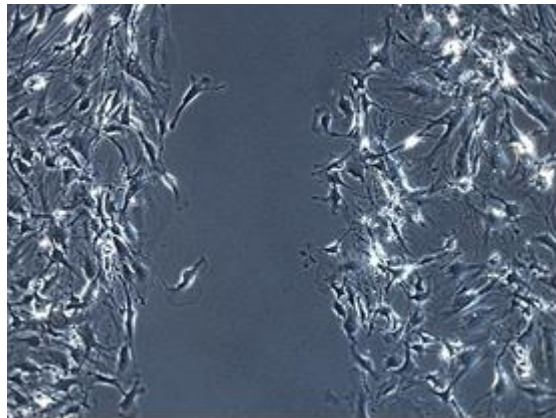


Abbildung 45 - Stimuliert mit CSF-1 nach 6h.

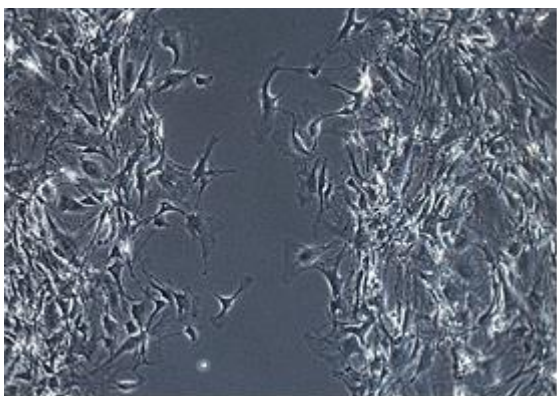


Abbildung 46 - Unstimuliert nach 12h.

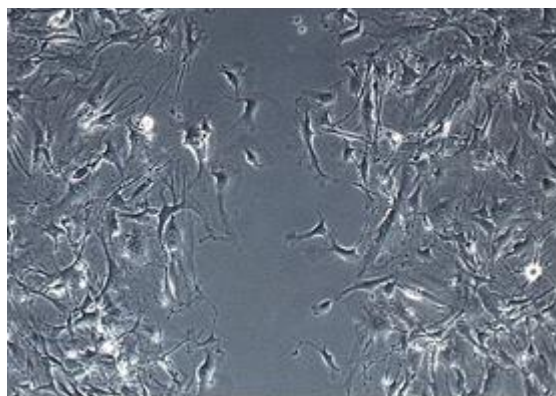


Abbildung 47 - Stimuliert mit CSF-1 nach 12h.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob PSMCs von Ratten, Mäusen und humanen Proben den CSF-1R exprimieren und welche funktionelle Bedeutung dieser Rezeptor für diese Zellen hat. Als pathophysiologische Versuchsmodelle wurden Tabakrauch-exponierte Mäuse, MCT-behandelte Ratten, Hypoxie-exponierte Mäuse, Hypoxie-exponierte humane PSMCs sowie humane Proben von IPAH- und COPD-Patienten und deren jeweilige Kontrollgruppen auf die Expression des CSF-1R hin untersucht. Die Expression des CSF-1R konnte auf RNA-, Protein- und histologischer Ebene durch qPCR, WB sowie IHC qualitativ in Lungengewebe, Homogenat und PSMCs nachgewiesen werden. Insbesondere für PSMCs war deren Expression des CSF-1R zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Zudem konnten die genannten Modelle durch die Quantifizierung der CSF-1R-Expression untereinander verglichen werden. Somit sind Rückschlüsse auf die potentielle Bedeutung dieses Rezeptors für die Pathogenese der PH und dessen Signalwege möglich. Bei den Lungenproben von COPD- und IPAH-Patienten und MCT-behandelten Ratten zeigte sich in der IHC aller drei genannten Modelle eine signifikant erhöhte CSF-1R-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Kein Unterschied zeigte sich dagegen im Homogenat dieser Proben in der qPCR und der WB. Auch bei den PSMCs von MCT-behandelten Ratten zeigte sich in der WB eine signifikant erhöhte CSF-1R-Expression im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrolle, kein Unterschied zeigte sich in der qPCR selbiger PSMCs. Bei den untersuchten Tiermodellen mit Ausbildung einer PH wie Tabakrauch- und Hypoxie-exponierten Mäusen sowie bei den Hypoxie-exponierten humanen PSMCs zeigte sich in keiner der Untersuchungsmethoden - qPCR, WB und IHC - ein signifikanter Unterschied in der CSF-1R-Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Im Zuge der funktionellen Analysen konnte eine signifikante Steigerung im Migrationsverhalten der PSMCs von Mäusen durch die Aktivierung des CSF-1R durch dessen Rezeptor-spezifischen Liganden CSF-1 gezeigt werden. Im Proliferationsverhalten der PSMCs von Mäusen zeigten sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu keinem Zeitpunkt des Versuchs signifikante Unterschiede. Die aufgeführten Ergebnisse sind tabellarisch in **Tabelle 5** zusammengefasst:

	qPCR	WB	IHC
Hypoxie-exponierte humane PSMCs	ns	ns	
Lungengewebe von IPAH-Patienten	ns	ns	erhöht
Lungengewebe von COPD-Patienten	ns	ns	erhöht
PSMCs von MCT-behandelten Ratten	ns	erhöht	
Lungengewebe von MCT-behandelten Ratten	ns	ns	erhöht
Lungengewebe von Tabakrauch-exponierten Mäusen	ns	ns	ns
Lungengewebe von Hypoxie-exponierten Mäusen	ns	ns	ns

Tabelle 5 - Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit untersuchten Modelle und deren CSF-1R-Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle in qPCR, WB, IHC; erhöht = signifikant verstärkte CSF-1R-Expression; ns = kein signifikanter Unterschied in der CSF-1R-Expression; IHC bei PSMCs nicht durchführbar.

## 4.2 Einordnung der Ergebnisse

Um den Zielfragen dieser Arbeit nachzugehen, wurden alle im Labor verwendeten und in **Tabelle 5** genannten Modelle auf die CSF-1R-Expression im Lungengewebe sowie speziell in den PSMCs hin untersucht. Die Bedeutung der PSMCs wird in der Literatur als maßgeblich für die Entstehung und Manifestation der PH beschrieben <sup>116</sup>. Die pathologische Steigerung von Proliferation und Migration sowie die Unterdrückung der Apoptose insbesondere bei PSMCs sind für die Pathogenese dieser Lungenerkrankung wichtig <sup>77-80</sup>. Die Förderung ebendieser dysfunktionalen Zelleigenschaften wurde für den CSF-1R bereits bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) in VSMCs und bei diversen Tumorentitäten wie Mamma-,

Bronchial- und Ovarialkarzinom sowie Glioblastoma multiforme beschrieben<sup>84-88</sup>. Glatte Muskelzellen wie VSMCs oder PSMCs sind laut Literatur zwar physiologisch in ihrer Reifung und ihrem Überleben nicht von der CSF-1R-Stimulation durch CSF-1 abhängig<sup>100</sup>. Jedoch scheint eine Stimulation des CSF-1R durch CSF-1, in dieser Arbeit durch den Migrationsassay nachgewiesen, diverse Zelleigenschaften wie die Migration dieses Zelltyps zu beeinflussen. Die Bedeutung dieses Rezeptors scheint aber aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit für die verschiedenen Modelle unterschiedlich zu sein. Somit wird im nachfolgenden Teil mit Rücksicht auf die Unterschiede in Pathogenese, Pathognomie und Therapierbarkeit zwischen den verschiedenen Modellen versucht, Ähnlichkeiten und Unterschiede in Bezug auf die CSF-1R-Expression zwischen den Modellen zu erläutern und somit die Ergebnisse einzuordnen:

Die **COPD-assoziierte PH und IPAH** sind sich histologisch sehr ähnlich, so zeigen beide eine deutliche Mediahypertrophie und Intimaproliferation. Insgesamt ist das Ausmaß der PH bei IPAH-Patienten aber meist gravierender als bei COPD-Patienten, welche im Krankheitsverlauf eher eine milde PH entwickeln. Auch in der Ätiologie der Erkrankungen zeigen sich Unterschiede. Neben Mutationen im BMP-2R-Gen<sup>63</sup> ist die Ursache für die Entstehung der IPAH in der Regel unbekannt, dagegen kann bei der COPD die Entwicklung der PH neben kongenitaler Vulnerabilität zum einen auf die chronische hypoxische Vasokonstriktion als Folge der Lungenzerstörung und der damit verbundenen chronischen alveolären Hypoxie zurückgeführt werden<sup>21,117,118</sup>. Zum anderen scheint die COPD assoziierte PH bereits im sehr frühen Stadium der COPD aufgrund von Inflammation und endothelialer Dysfunktion zu entstehen, folglich also auch Hypoxie unabhängig<sup>119</sup>. Da die Ergebnisse bei COPD und IPAH eine im Vergleich zur Kontrolle jeweils signifikant erhöhte CSF-1R-Expression in der IHC zeigten, scheinen sowohl multifaktorielle Lungenerkrankungen wie die COPD als auch schwere PH-Formen wie die IPAH bei der CSF-1R-Expression von Bedeutung zu sein. In der qPCR und WB der humanen Proben zeigte sich kein Unterschied in der CSF-1R-Expression von IPAH und COPD zu lungengesunden Donoren. Dies könnte aber durch den möglichen Verlust der Proteinstruktur dieses Rezeptors beim Herstellen des Homogenats für qPCR und WB zu erklären sein, bleibt aber letztlich unklar.

Die **PH bei Hypoxie-exponierten Mäusen** entwickelt sich unter anderem durch Genregulation des Hypoxie-induzierten Faktors unter Hypoxie, einen Umbau der

Lungengefäße als Folge der chronischen hypoxischen Vasokonstriktion und vermehrte Scherkräfte<sup>120</sup>. So steigt wie bei COPD- und IPAH-Patienten der PAP und es können eine Rechtsherzhypertrophie und weitere typische PH-Zeichen folgen<sup>121</sup>. Das Gefäßremodeling ist jedoch bei den Mäusen im Vergleich zur PH beim Menschen deutlich geringer ausgeprägt, es entwickelt sich folglich eine eher milde PH-Form<sup>122</sup>. PH typische Adventitiaverdickungen und Fibrose zeigen sich bei Hypoxie-exponierten Mäusen eher proximal. Zudem finden sich keine irreversiblen plexiformen Läsionen, ebenso ist die PH unter Normoxie reversibel<sup>121,122</sup>. Diese Unterschiede sind vor allem dadurch zu erklären, dass die PH beim Menschen meist auf eine multifaktorielle Genese zurückzuführen ist, während beim experimentellen Modell der Hypoxie-exponierten Mäuse hauptsächlich die Hypoxie für die Krankheitsentstehung verantwortlich ist. Somit zeigte sich bei der relativ milden Form der PH bei den Hypoxie-exponierten Mäusen und auch bei Hypoxie-exponierten humanen PASMCs kein Unterschied in der CSF-1R-Expression in qPCR, WB und IHC im Vergleich zur durchgehend Normoxie-exponierten Kontrolle. Bei multifaktoriellen (COPD) und schweren (IPAH) PH-Formen dagegen ergab sich eine signifikant verstärkte CSF-1R-Expression in der IHC im Vergleich zur lungengesunde Kontrolle.

Bei **MCT-behandelten Ratten** ist die PH nach therapeutischer Intervention im Gegensatz zur PH bei Menschen reversibel<sup>123</sup>. Im Unterschied zu Hypoxie-exponierten Mäusen kommt es hier zu keiner hypoxischen Vasokonstriktion. Das vaskuläre Remodeling wird durch einen unbekanntem Wirkmechanismus des in der Leber umgesetzten und systemisch wirksamen MCT-Pyrrol getriggert und von einer massiven Monozytenmigration in die Gefäßwände begleitet<sup>124</sup>. Somit sind auch neben den gewünschten Gefäßveränderungen an pulmonalarteriellen Gefäßen Nebenwirkungen wie zusätzliches Remodeling an pulmonalvenösen Gefäßen sowie starke Leber- und Nierenschäden zu berücksichtigen<sup>125,126</sup>. Insgesamt kommt die MCT-induzierte PH, eine ebenfalls schwere und progrediente PH-Form, der humanen IPAH-Erkrankung am nächsten, was sich in dieser Arbeit zudem anhand der ebenfalls im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrolle signifikant erhöhten CSF-1R-Expression in der IHC von MCT-behandelten Rattenlungen sowie in der WB von PASMCs selbiger Ratten zeigte. Darüber hinaus sind die Veränderungen in den Pulmonalarterien bei COPD und MCT-behandelten Ratten vor allem durch externe Stimuli getriggert und in der Folge tumorähnlich, da die Gefäßzellen nach initialer Schädigung entarten und durch

ungehemmtes Wachstum die Erkrankung verschlimmern<sup>67,71</sup>. Dies könnte die verstärkte CSF-1R-Expression bei COPD, IPAH und MCT-induzierter PH weitergehend erklären, da der untersuchte Rezeptor bislang insbesondere für seine Bedeutung bei verschiedenen Tumoren bekannt ist. Keine Unterschiede im Expressionsverhalten des CSF-1R zeigten sich dagegen sowohl auf mRNA-Ebene in PSMCs isoliert aus MCT-behandelten Ratten als auch im Gewebehomogenat auf mRNA- und Proteinebene der Tiere. Dies könnte einerseits an dem bereits weiter oben diskutierten Verlust der Proteinstruktur bei der Herstellung des Homogenats liegen, insbesondere da sich in PSMCs isoliert aus MCT-behandelten Ratten eine signifikant erhöhte CSF-1R-Expression zeigt, während die Rezeptorexpression im Gewebehomogenat dieser Tiere im Vergleich zur Kontrolle unverändert ist. Andererseits wäre es denkbar, dass die verstärkte CSF-1R-Expression bei MCT-behandelten Ratten vor allem in den PSMCs stattfindet und dieser Unterschied bei Betrachtung des gesamten Lungengewebes im Homogenat nicht mehr detektierbar ist, da die Menge an PSMCs in Bezug auf das gesamte Lungengewebe zu gering ist. Eine weitere mögliche Erklärung für die uneinheitliche CSF-1R-Expression bei den Untersuchungen der MCT-behandelten PSMCs wäre, dass die CSF-1R-mRNA möglicherweise weniger stabil als das dazugehörige CSF-1R-Protein ist und sich darum bereits wieder auf dem Niveau der Kontrollgruppe befindet während die Proteinexpression noch signifikant erhöht ist. Außerdem ist die Abweichung von Protein- zu mRNA-Expression des CSF-1R bereits in der Literatur beschrieben worden<sup>87</sup>.

Bei **Tabakrauch-exponierten Mäusen** kommt es zum Emphysem, zum Gefäßumbau und zur Rechtsherzhypertrophie wie es unter anderem auch bei der COPD-assoziierten PH der Fall ist<sup>72</sup>. Die Veränderungen sind jedoch im Vergleich zur Pathologie beim Menschen bei den Tabakrauch-exponierten Mäusen weniger ausgeprägt<sup>72</sup>. Trotz der großen Ähnlichkeiten der humanen COPD-Erkrankung und der Tabakrauch-induzierten COPD in Mäusen zeigen letztere eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe unveränderte CSF-1R-Expression auf RNA-, Protein- und histologischer Ebene. Letztlich bleibt der Grund für die unveränderte Rezeptor-Expression der Tabakrauch-exponierten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe unklar, da bei diesem Mausmodell auch die Gefäßmuskularisierung und die Monozytenmigration erhöht ist und folglich eine ebenso erhöhte CSF-1R-Expression bei den Tabakrauch-exponierten Mäusen zu

erwarten gewesen wäre <sup>58</sup>. Allerdings ist die Tabakrauch-induzierte PH wie die Hypoxie-induzierte PH bei Mäusen eine milde Form dieser Lungenerkrankung, vergleichbar mit dem GOLD-II-Stadium bei COPD <sup>72</sup>. Dieser milde Verlauf und die Abnahme des PAPs bei Tabakrauch-exponierten Mäusen könnte eine Erklärung für die unveränderte CSF-1R-Expression zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in diesem Mausmodell im Unterschied zur teils signifikant erhöhten Expression des CSF-1R bei multifaktoriellen und schweren PH-Formen wie in COPD und IPAH sowie im MCT-Ratten-Modell sein. Die drei Letztgenannten haben außerdem im Gegensatz zum Modell der Tabakrauch-exponierten Mäuse alle eine Zunahme des PAPs zur Folge <sup>72</sup>.

Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit noch keinen eindeutigen Schluss zulassen und zudem die besprochenen, denkbaren methodischen Schwierigkeiten und ihr Einfluss auf die Ergebnisse noch nicht abschließend zu beurteilen sind, so konnte dennoch gezeigt werden, dass die Expression des CSF-1R bei multifaktoriellen Lungenerkrankungen wie die COPD sowie bei schweren Verlaufsformen der PH wie bei IPAH-Patienten und MCT-behandelten Ratten tendenziell erhöht ist. Bei mildereren, unifaktoriellen Verlaufsformen der PH wie bei Tabakrauch- und Hypoxie-exponierten Mäusen sowie bei Hypoxie-exponierten humanen PSMCs dagegen kommt es offenbar zu keiner verstärkten CSF-1R-Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die bisherigen Erkenntnisse dieser Arbeit sind in **Schaubild 1** zusammengefasst:

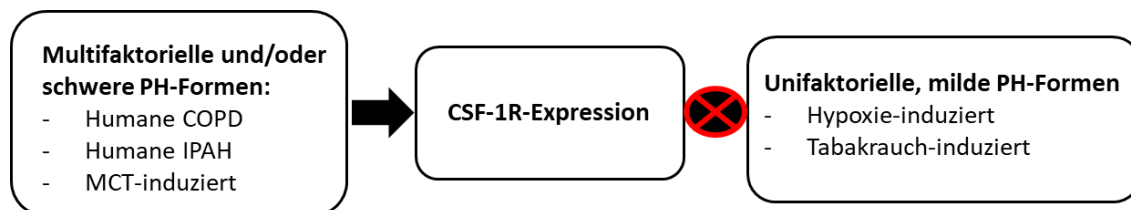


Schaubild 1 - **Hypothetische Einflussgrößen auf den CSF-1R bei PH**; schwarzer Pfeil – verstärkender Einfluss; Kreuzsymbol - kein Einfluss; humane COPD/IPAH = Proben von COPD- und IPAH-Patienten; MCT-induziert = Proben aus Rattenlungen; Hypoxie-induziert = Proben aus Mäuselungen und humanen PSMCs; Tabakrauch-induziert = Proben aus Mäuselungen.

#### 4.2.1 Möglicher pathophysiologischer CSF-1R-Signalweg

Neben dem CSF-1 ist mit dem IL-34 ein zweiter Ligand des CSF-1R identifiziert worden, der bei infektiösem Geschehen in der Lunge über die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr vermehrt sezerniert wird und somit über den CSF-1R zu

vermehrter Reifung und vermehrtem Überleben von Monozyten führt <sup>127</sup>. Die Freisetzung des IL-34 wird insbesondere durch die Aktivierung von dendritischen Zellen, CD4+-Zellen und zirkulierenden Monozyten und die daraus resultierende IL-22-Freisetzung massiv verstärkt. Diese Aktivierung ist Folge der Lungeninflammation als Teil der angeborenen Immunabwehr unter anderem durch Influenza-A-Viren <sup>128</sup>. Initial könnte die parakrine CSF-1R- bzw. IL-34-Stimulation an PASMCs unter anderem durch Monozyten bei der Entstehung der PH eine Rolle spielen. Durch eine endotheliale Dysfunktion in der Gefäßwand von Pulmonalarterien und -arteriolen kommt es dabei zur unkontrollierten Freisetzung inflammatorischer Zytokine wie RANTES, Fraktalkin CX(3)C oder CC Chemokinligand 2 <sup>29,129,130</sup>. Diese Zytokine führen zu einer verstärkten Monozytenmigration in pulmonale Gefäßwände <sup>124</sup>. Die Stimulation des CSF-1R durch das von Monozyten sezernierte CSF-1 ist wiederum mit dysfunktionalem Wachstum sowie vermehrter Migration von Tumorzellen und glatten Muskelzellen bei diversen Erkrankungen assoziiert <sup>77,131</sup>. Diese initiale Inflammation könnte somit zur Entartung der PASMCs über eine CSF-1R-Stimulation beitragen. Das Ausbleiben einer im Vergleich zur Kontrolle verstärkten CSF-1R-Expression bei Hypoxie- und Tabakrauch-exponierten Mäusen und Hypoxie-exponierten humanen PASMCs, die als milde PH-Formen am ehesten mit den Anfangsstadien der PH bei COPD- und IPAH-Patienten zu vergleichen sind, könnte durch die Autoregulation der CSF-1-/CSF-1R-Achse mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose erklärbar sein <sup>132</sup>. Hierbei steigen die CSF-1-Spiegel im Blut aufgrund vermehrter Monozytenaktivität möglicherweise bereits an, die PASMCs schützen sich jedoch initial bei noch intakten Zellfunktionen vor übermäßiger Zellstimulation durch den CSF-1R mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose <sup>94,132</sup>. Dies würde eine verstärkte CSF-1R-Expression und -Aktivität kaschieren. Im Verlauf der PH-Erkrankung dagegen scheint die autokrine und verstärkte parakrine CSF-1R-Stimulation unter anderem durch entartete PASMCs bei fortschreitendem unkontrollierten Wachstum dieses Zelltyps wahrscheinlich, da neben vielen anderen gestörten Zellfunktionen auch die Autoregulation der CSF-1-/CSF-1R-Achse gestört sein könnte. So ist bereits beim Ovarialkarzinom und bei diversen anderen Tumorentitäten die autokrine Zellstimulation mit CSF-1 als wichtigster Faktor für Tumorwachstum beschrieben worden <sup>133,134</sup>. Durch den autokrin und parakrin stimulierten, permanent aktiven CSF-1R wird über intrazelluläre Signalwege mittels SFK und MAP/ERK die Proliferation verstärkt sowie über PI3K/Akt das Wachstum gesteigert und die Apoptose verhindert <sup>135</sup>. Auch die Tendenz zur fortschreitenden



Entartung eines anfangs leicht veränderten bis normalen Zelltyps ist über diesen Signalweg beschrieben worden <sup>101,136</sup>. Ferner fördern auch Hormone wie Östrogen und Progesteron die vermehrte CSF-1-Freisetzung, was eine Erklärung für die erhöhte Prävalenz bei Frauen für die IPAH sein könnte <sup>137-139</sup>. Auch Glukokortikoiden konnte eine Induktion zur vermehrten CSF-1R-Expression nachgewiesen werden <sup>140</sup>. Der besprochene Signalweg unterliegt also auch einer hormonellen Regulation, die berücksichtigt werden sollte. Zuletzt könnte auch eine chronische Zellbelastung beispielsweise durch chronische Hypertonie zu einer CSF-1R-geförderten PSMC-Entartung beitragen. So dient der CSF-1R-/CSF-1-Signalweg physiologisch dazu, Gewebe auf veränderte Bedingungen einzustellen. Er fördert bei der laktierenden Mamma eine Verstärkung des Alveolar- sowie Duktalepitheliums und möglicherweise bei pulmonaler Hypertonie aufgrund von chronischer alveolärer Hypoxie mit hypoxischer Vasokonstriktion eine Verdickung der Gefäßwände <sup>141</sup>. Aufgrund von chronischer Aktivierung des CSF-1R durch chronische Gewebelastung könnte es über einen unbekanntem Mechanismus und in Verbindung mit inflammatorischen, hormonellen und/oder zelleigenen Reizen zur Entartung der Gefäßwand- bzw. Drüsengangzellen kommen. In der Literatur ist die Entstehung duktaler Mammakarzinome und arteriosklerotischer Plaques über den CSF-1R-/CSF-1-Signalweg bereits beschrieben worden <sup>75,84</sup>. Eine ähnliche Beteiligung im Gefäßremodeling bei PH erscheint plausibel, wo es bei entsprechender Veranlagung aufgrund chronischer Inflammation, hormoneller Beeinflussung, chronischer alveolärer Hypoxie mit hypoxischer Vasokonstriktion und/oder genetischer Entartung zu einer dauerhaften, autokrinen sowie parakrinen CSF-1R-Aktivierung mit konsekutiver Hyperplasie und Proliferation der PSMCs kommt. In **Schaubild 2** wird ein hypothetischer pathophysiologischer Signalweg der CSF-1-/CSF-1R-Achse anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sowie Erkenntnisse aus der Literatur vorgestellt:

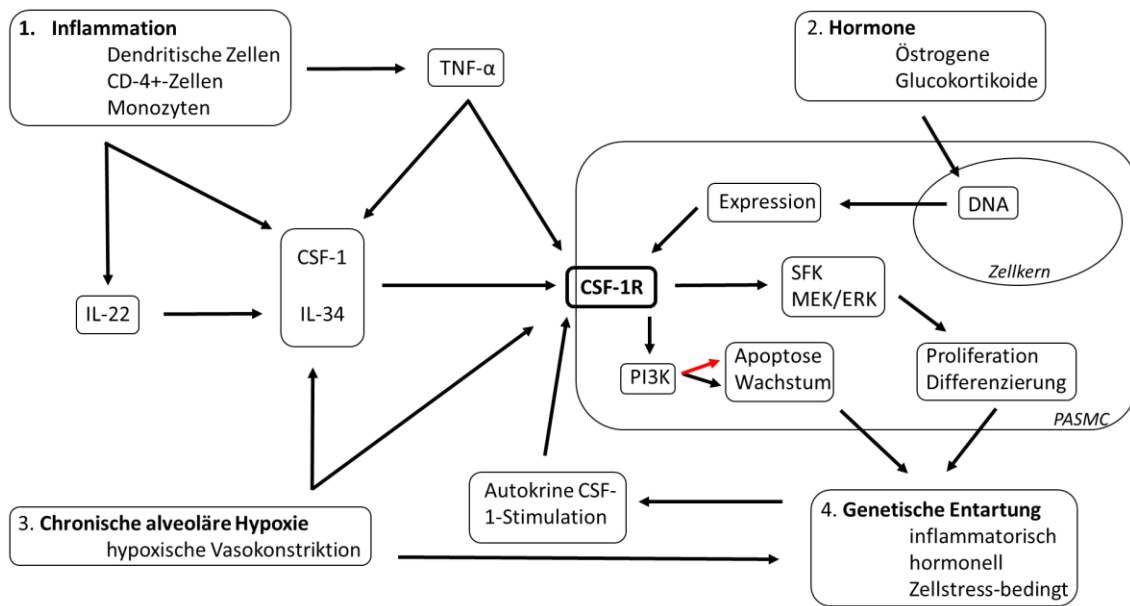


Schaubild 2 - **Hypothetischer Signalweg des CSF-1R bei PH in PSMCs**; schwarze Pfeile = verstärkender Einfluss; rote Pfeile = verringernder Einfluss.

Wie in **Schaubild 2** gezeigt, ist die Ätiopathogenese der PH insbesondere bei den schweren, fortgeschrittenen Formen multifaktoriell und somit haben unter anderem chronische Inflammation, diverse Hormone, chronische alveoläre Hypoxie sowie genetische Entartung einen Einfluss. In dieser Arbeit konnte qualitativ die Expression des CSF-1R in jeder der untersuchten Homogenate und insbesondere auch in PSMCs von Ratte, Maus und Mensch gezeigt werden. Zudem legten die Ergebnisse dieser Arbeit trotz mitunter nicht ganz eindeutiger Expressionsmuster quantitativ den Schluss nahe, dass der CSF-1R nicht nur wie aus der Literatur bekannt eine Rolle bei der Entstehung verschiedener Tumoren spielt, sondern durchaus auch seine Bedeutung bei der Entstehung und Manifestation der tumor-ähnlichen, schweren PH-Formen wie bei MCT-behandelten Ratten und bei IPAH- und COPD-Patienten haben könnte. Zumal in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Stimulation des CSF-1R eine migrationsfördernde Wirkung auf PSMCs hat. Bei milderer PH-Formen wie bei Tabakrauch- und Hypoxie-exponierten Mäusen sowie humanen Hypoxie-exponierten PSMCs dagegen scheint der CSF-1R den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge keine Bedeutung bei der PH-Entstehung und -Manifestation zu besitzen. Unklar bleiben insbesondere für die Ergebnisse von der WB und qPCR der mögliche Einfluss der Homogenatherstellung auf die Nachweisbarkeit des CSF-1R sowie die Beeinflussung der quantitativ gemessenen CSF-1R-Expression durch die physiologische Rezeptor-

vermittelte Endozytose des CSF-1R nach dessen Aktivierung insbesondere bei milderen PH-Formen beziehungsweise zu Beginn der PH-Erkrankung. Folglich wäre eine Beteiligung dieses Rezeptors bei bestimmten Formen der PH möglich und bietet gegebenenfalls neue Therapieoptionen, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

### 4.3 Therapeutische Ansatzpunkte

Therapeutische Ansatzpunkte ergeben sich aus dem Aufbau des CSF-1R: zum einen die Senkung des CSF-1-/IL-34-Spiegels oder die Verminderung der CSF-1R-Expression, zum anderen die Blockierung der CSF-1R-Bindungsstelle, der Rezeptordimerisierung oder der Tyrosinkinaseaktivität <sup>74</sup>. Die Rezeptorblockierung kann an den erkrankten Zellen selbst oder über Tumor-assoziierte Makrophagen wirksam sein. So konnte in experimentellen Zellversuchen bei unterdrückter CSF-1R-Expression durch small interfering RNA (siRNA) eine erhöhte Apoptoseneigung sowie eine verringerte Proliferations- und Migrationsrate bei CSF-1R-exprimierenden Tumorzellen festgestellt werden <sup>87</sup>. Somit führte die direkte CSF-1R-Inhibierung an Tumor-assoziierte Makrophagen mittels Tyrosinkinaseinhibitor bei Patienten mit Glioblastoma multiforme zu erhöhten Überlebensraten und verstärkter Tumorregression <sup>88</sup>. Es ist außerdem bekannt, dass Tyrosinkinasen wie der *platelet derived growth factor* Rezeptor (PDGF-R) in der Pathologie der PH eine Rolle spielen. So konnte eine erhöhte Expression des PDGF-R bei PH-Patienten im Vergleich zu Lungengesunden nachgewiesen werden <sup>123</sup>. In Tierversuchen wurde gar ein verstärkter Rückgang des pulmonalarteriellen Remodelings unter Therapie mit dem Proteinkinaseinhibitor Imatinib im Vergleich zu Placebo-behandelten Vergleichstieren gezeigt <sup>123</sup>. Zudem wurden in der Literatur einige Patientenfälle beschrieben, in denen bei Patienten unter Imatinib-Therapie ein Rückgang des mPAP, des rechtsventrikulären Drucks und der Rechtsherzhypertrophie bei PH-Patienten erzielt werden konnte <sup>123,142-146</sup>. Der CSF-1R ist wie der PDGF-R eine Tyrosinkinase und ist daher ebenfalls sensitiv gegenüber Imatinib <sup>147</sup>. Zwar führte die Imatinib-Therapie in einer großen klinischen Studie bei PH-Patienten zu Nebenwirkungen wie Kardiotoxizität und zerebralen Blutungen und wurde in der Folge abgebrochen <sup>148</sup>. Jedoch sind weitere CSF-1R-Inhibitoren bei verschiedenen proliferativen Erkrankungen wie Glioblastoma multiforme oder therapie-refraktären Tumoren in klinischer Erprobung <sup>88,149-152</sup>. Um weitere systemische Nebenwirkungen wie Immunsuppression durch systemische Makrophagendepletion unter CSF-1R-

Inhibierung zu vermeiden, muss eine hohe Spezifität für die anvisierten entarteten Zellen bzw. Tumor-assoziierte Makrophagen erreicht werden <sup>74</sup>. Interessant für die Therapie CSF-1R-abhängiger Erkrankungen könnte der Glukokortikoid-Rezeptor-Antagonist (G-R-Antagonist) Mifepriston RU486 werden, da dieser Wirkstoff den in **Schaubild 2** gezeigten massiven Glukokortikoid-bedingten Anstieg der CSF-1R-Expression verhindert, ohne die vor allem hämatologisch bedeutsame CSF-1-Konzentration zu beeinflussen <sup>75,140</sup>. Ein weiterer interessanter therapeutischer Ansatzpunkt ist die Inhibierung des von Monozyten sezernierten TNF- $\alpha$ , das für verschiedene inflammatorische Effekte verantwortlich ist. Im Falle des CSF-1R erhöht es dessen Expression und die des Liganden CSF-1 und verstärkt zusätzlich die Wirkung dieses Signalwegs auf Proliferation und Differenzierung von SMCs <sup>84</sup>. So wird auch verständlich, dass durch eine TNF- $\alpha$ -Inhibierung unter anderem eine Verminderung von Neointimaformationen aus VSMCs bei Transplantat-abhängiger arterieller Verschlusskrankheit erzielt werden konnte <sup>102,103</sup>. Insgesamt ist bei allen genannten therapeutisch, medikamentösen Ansätzen eine volatile, einatembare Darreichungsform wünschenswert, um bei maximaler Wirkung am Zielorgan Lunge eine möglichst geringe systemische Wirkung zu erzielen. Auf diese Weise wäre bereits neben einer möglichst hohen zu erzielenden Rezeptorspezifität eine hohe Ortspezifität erreicht. Aufgrund der chemischen Zusammensetzung oder von diversen Nebenwirkungen ist eine volatile Darreichungsform jedoch nicht immer möglich. Darüber hinaus scheint die Beeinflussung des CSF-1-/IL-34-Spiegels aufgrund seiner systemischen Bedeutung für die Reifung hämatologischer Zellen vor allem für die Behandlung inflammatorischer Erkrankungen geeignet zu sein <sup>153</sup>. Dagegen wird dem CSF-1R eher eine Bedeutung bei hyperproliferativen Erkrankungen wie zum Beispiel Tumorerkrankungen oder gegebenenfalls der PH zugeschrieben <sup>74</sup>. Einige mögliche therapeutischen Ansatzpunkte und deren Wirkweise sind in **Schaubild 3** zusammengefasst:

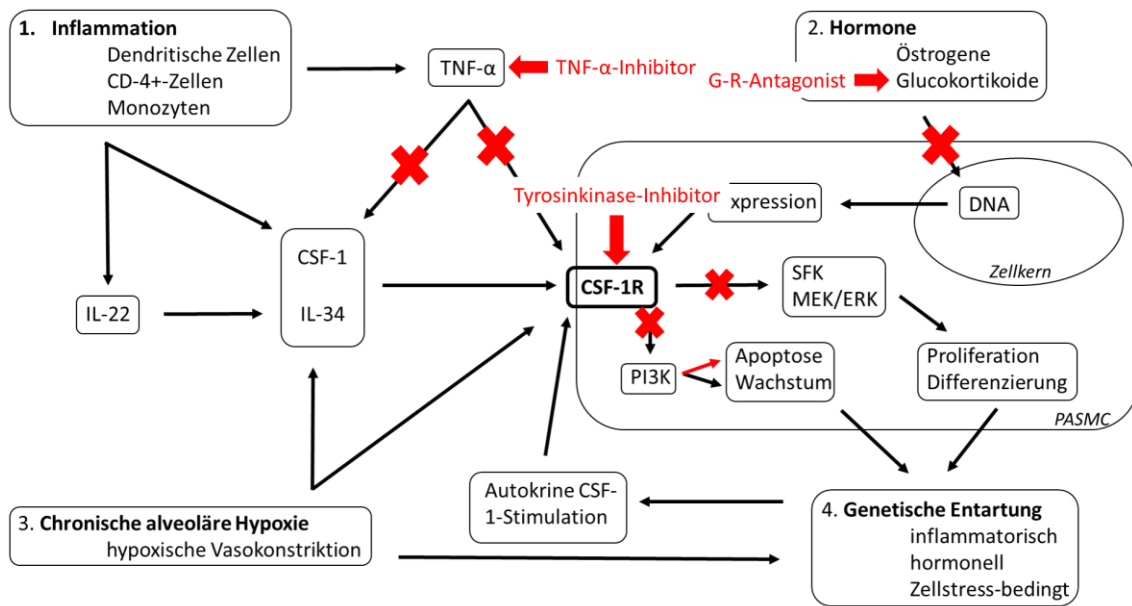


Schaubild 3 – **Mögliche Ansatzpunkte bei CSF-1R-beteiligter PH-Therapie**; schwarze Pfeile = verstärkender Einfluss; rote, schmale Pfeile = verringernder Einfluss; rote, breite Pfeile = hemmender Einfluss; rote Kreuze = gehemmter Signalweg; G-R-Antagonist = Glukokortikoid-Rezeptor-Antagonist.

#### 4.4 Systemkritik und Ausblick

In dieser Arbeit konnte die Expression des CSF-1R in PAMSCs und dessen funktionelle Bedeutung in der Migration von murinen PAMSCs nachgewiesen werden. Dennoch stellt diese Arbeit lediglich die Grundlage für weitere Forschung bezüglich der Bedeutung des CSF-1R für die Entstehung und das Fortschreiten der PH dar. Im Folgenden sind daher die Systemkritik der in dieser Arbeit verwendeten Methoden sowie Möglichkeiten für die weitere experimentelle Forschung mit dem CSF-1R in PAMSCs aufgeführt. So zeigten die funktionellen Assays bereits in den sehr niedrig gewählten CSF-1-Konzentrationen eine leichte Steigerung des Proliferationsverhaltens und sogar eine signifikante Steigerung des Migrationsverhaltens der PAMSCs. Möglicherweise könnten mit sehr viel höheren, möglicherweise pathophysiologisch bedeutsameren CSF-1-Konzentrationen noch stärkere Unterschiede zwischen den CSF-1-stimulierten und den unstimulierten PAMSCs erzielt werden. Zudem sind die Messabstände im Proliferationsassay mit 5, 10, 15 und 20 Minuten nach Stimulation mit CSF-1 sehr kurz gewählt, weitere Messungen der Proliferationsrate zwischen 2 bis 4 Stunden nach der Stimulation könnten weitere Erkenntnisse über die Wirkung der CSF-1-Stimulation auf PAMSCs liefern. Ferner wichtig in einem experimentellen Ansatz ist die Validierung der Zielstruktur durch verschiedene Negativkontrollen. Dabei sehr

bedeutsam sind Tiermodelle, in denen die Gene so verändert werden, dass das zu untersuchende Protein nicht mehr exprimiert wird. Das untersuchte Target ist folglich mittels unterschiedlicher Methoden wie WB, qPCR und Histologie nicht mehr auffindbar. Es dient so als hoch valide Negativkontrolle <sup>154,155</sup>. Eine sogenannte Knockout-Maus ist zwar lebensfähig, zeigt aber bei ausgeknocktem CSF-1R unter anderem Störungen in der Organentwicklung, schwere Osteopetrose und Defekte im Reproduktionstrakt sowie abnorme Hirnentwicklung <sup>154-156</sup>. Somit ist ein solches Modell zwar generell verfügbar und lebensfähig, dessen Etablierung war aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht realisierbar. Eine weitere Möglichkeit das CSF-1R-Protein auszuschalten, besteht durch das Einbringen von siRNA in PSMCs. So wird die Produktion des CSF-1R in der Zelle verhindert und es können Rückschlüsse auf mögliche weitere Funktionen dieses Rezeptors gezogen werden. Auch die Untersuchung von PSMCs aus Hypoxie- und Tabakrauch-exponierten Mäusen mittels qPCR und WB würde die Bedeutung des CSF-1R für diesen Zelltyp bei PH eventuell weiter erklären. PSMCs dieser zwei PH-Modelle waren aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenso nicht verfügbar. Interessanterweise zeigte sich die Positivkontrolle in der WB auf einer Höhe von ca. 110 kD statt auf ca. 160 kD wie in der Literatur angegeben <sup>110,111</sup>. Dies ist wahrscheinlich auf die rekombinante Herstellung der CSF-1R-Moleküle der Positivkontrolle zurückzuführen, da diese weniger posttranslationale Modifikationen erhalten sowie im Gegensatz zu *in vivo* gewonnenen Proben eher als Monomere vorliegen und daher in der WB schneller wandern, sich also kleiner darstellen. Entsprechend wurde im Datenblatt des verwendeten Antikörpers das Molekulargewicht des unprozessierten CSF-1R mit ca. 110 kDa und das Molekulargewicht des prozessierten Rezeptors mit ca. 160 kDa angegeben <sup>157</sup>. Die Richtigkeit der Höhe bei 110 kDa für die Positivkontrolle wurde zudem vom Hersteller bestätigt. In der WB wurde ferner ein polyklonaler CSF-1R-Antikörper verwendet. Somit ist der Antikörper zwar CSF-1R-spezifisch, aber er bindet aufgrund seiner Polyklonalität unterschiedliche Anteile des Rezeptors. Dies kann, wie im Methodenteil besprochen, die Erklärung für die verschiedenen unspezifischen Banden im WB-Film sein. Es waren zudem zwei verschiedene Antikörper für IHC und WB notwendig, da der jeweilige Antikörper lediglich entweder bei der IHC oder bei der WB einsetzbar war. Eine Fluoreszenzfärbung könnte zudem Aufschluss darüber geben, in welchem Zellkompartimenten der Rezeptor produziert und gespeichert wird. So könnten eventuell weitere Eigenschaften des CSF-1R in PSMCs diskutiert werden.

Ferner könnte mittels Laser-Mikrodissektion der Gefäße speziell die Lungengefäße auf die Expression des CSF-1R hin untersucht werden, was die in dieser Arbeit vermutete Bedeutung der CSF-1R-Expression für die PASMC-Entartung in pulmonalarteriellen Gefäßen unterstützen würde.

Die Auswertung der CSF-1R-Expression in der IHC erfolgte durch die *Score Value %*. Dieser Wert berechnet sich nach der Formel  $Scoring \% \times (Area \% / 100)$ . Der *Scoring %* Wert gibt dabei die relative Färbeintensität an und berechnet sich aus der gemessenen Färbeintensität normiert auf einen Referenzwert, welcher durch die höchste Färbeintensität im jeweiligen Präparat definiert ist. Der *Area %* Wert gibt die relative gefärbte Fläche an, berechnet aus der CSF-1R-spezifisch gefärbten Gesamtfläche normiert auf die Gesamtfläche des Präparats. Folglich entspricht die *Score Value %* der relativen Färbeintensität CSF-1R-spezifisch gefärbter Zellen normiert auf die relative gefärbte Fläche. Somit kann bei einem signifikanten Anstieg der *Score Value %* auf eine signifikante Hochregulation der CSF-1R-Expression in den Zellen rückgeschlossen werden. Daher wurde die *Score Value %* der einzelnen Präparate für die Auswertung der IHC verwendet. Die Erläuterungen zur Software Qwin V3 sind in **Tabelle 6** zusammengefasst.

Bezeichnung	Erklärung
<b><i>Scoring</i></b>	Färbeintensität des gesamten Präparats
<b><i>Scoring %</i></b>	Scoring / Referenzwert Färbeintensität normiert auf Referenzwert
<b><i>Score Value %</i></b>	$Scoring \% \times (Area \% / 100)$ Relative Färbeintensität normiert auf relative gefärbte Fläche
<b><i>Area %</i></b>	$(Gefärbte\ Gesamtfläche \times 100) / Gesamtfläche\ des\ Präparats$ CSF-1R-spezifisch gefärbte Fläche normiert auf Gesamtfläche

Tabelle 6 – Erläuterung zum Tabellendokument der Software Qwin V3.

Prognostisch und diagnostisch könnten möglicherweise CSF-1-Spiegel im Blut sowie die CSF-1R-Expression im erkrankten Gewebe hilfreich sein. So ist zwar aufgrund der teils uneinheitlichen Expressionsmuster eine endgültige Aussage über die Bedeutung

der CSF-1-/CSF-1R-Achse bei PH schwierig zu treffen und bedarf daher weitergehender Forschung. Dennoch zeigte diese Arbeit, dass PASMCs den CSF-1R exprimieren, die Aktivierung des Rezeptors eine migrationsfördernde Wirkung auf diesen Zelltyp hat, die CSF-1R-Expression bei schweren und multifaktoriellen PH-Formen teils massiv ansteigt und folglich dieser Rezeptor eine Rolle in der Pathogenese der PH spielen kann. Dabei scheint die parakrine, systemische CSF-1R-Stimulation über CSF-1 vor allem initial bei der Entstehung der PH von Bedeutung zu sein. Es wäre aufgrund dessen zum einen interessant, Patienten auf erhöhte CSF-1-Spiegel im Blut zu untersuchen, die ein erhöhtes Risiko haben, an einer PH zu erkranken wie z.B. bei familiärer Vorbelastung oder bei einer Frühform der COPD. So könnte der CSF-1-Spiegel im Patientenblut als Frühmarker einer beginnenden PH eingesetzt werden und einen Therapiebeginn im Anfangsstadium der PH ermöglichen wie bereits bei anderen CSF-1R-abhängigen Tumorerkrankungen wie zum Beispiel dem Endometriumkarzinom<sup>94</sup>. Zum anderen wäre die Ermittlung der CSF-1-Spiegel im Blut PH-Erkrankter aus unterschiedlichen PH-Subtypen aufschlussreich in Bezug auf die Bedeutung der CSF-1-/CSF-1R-Achse beim Fortschreiten des jeweiligen PH-Typs. Im fortgeschrittenen PH-Stadium könnte ferner die Bestimmung der CSF-1R-Expression in erkrankten Lungenarealen, wie bei Bronchialkarzinom bekannt, Aufschluss über Prognose und mögliche Therapierbarkeit von PH-Patienten geben.

## 5 Zusammenfassung

Bei der Pulmonalen Hypertonie (PH) handelt es sich um eine Erkrankung der Lungenstrombahn. Dabei kommt es durch eine pathologische Verengung der Lungengefäße durch Gefäßwandverdickung zu einer Zunahme des pulmonalarteriellen Drucks und einer daraus resultierenden Rechtsherzbelastung, die schließlich zum Tode führen kann. Bis heute kann therapeutisch lediglich die Lebensqualität verbessert, nicht aber eine Heilung von der PH erreicht werden. Daher sind Untersuchungen des Pathomechanismus mit dem Ziel der Entdeckung neuer Therapietargets essentiell, um die Prognose der PH zu verbessern. Die in dieser Arbeit untersuchten, in der experimentellen PH-Forschung etablierten Modelle von Tabakrauch- und Hypoxie-exponierten Mäusen, MCT-behandelten Ratten und IPAH- sowie COPD-Patienten,



entwickeln eine pathologische Gefäßwandverdickung insbesondere in präkapillären Arteriolen. Da dabei pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (PASMCs) eine entscheidende Rolle spielen, wurden diese auf die Expression des Koloniestimulierenden Faktor-1 Rezeptors (CSF-1R) und dessen Funktion für diesen Zelltyp hin untersucht. Beim CSF-1R handelt es sich indes um einen Rezeptor, der für die Entstehung und Progression anderer hyperproliferativer Erkrankungen bedeutsam ist und dort bereits diagnostisch und therapeutisch genutzt wird. Um die Expression des CSF-1R in Lungengewebe sowie PASMCs nachweisen und quantifizieren zu können, wurden die oben genannten Modelle mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), Western Blot Analyse (WB) und Immunhistochemie (IHC) untersucht. Die Expression des CSF-1R in PASMCs konnte in allen verwendeten Tiermodellen sowie den humanen Proben qualitativ nachgewiesen werden. Quantitativ wiesen IPAH- und COPD-Patienten sowie MCT-exponierte Ratten in der IHC sowie PASMCs von MCT-exponierten Ratten in der WB im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe eine signifikant verstärkte CSF-1R-Expression auf. Bei Tabakrauch- und Hypoxie-exponierten Mäusen sowie Hypoxie-exponierten humanen PASMCs zeigten sich dagegen keine Unterschiede im CSF-1R-Expressionsverhalten im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe in WB, qPCR und IHC. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit könnte die CSF-1R-Expression von PASMCs bei multifaktoriellen Lungenerkrankungen wie der COPD sowie bei schweren PH-Formen wie MCT-induzierter PH und IPAH eine pathophysiologische Bedeutung haben. Bei milden PH-Formen wie Hypoxie- und Tabakrauch-induzierter PH im Mausmodell dagegen findet keine Regulation dieses Rezeptors statt. Im Zuge der funktionellen Analysen konnte eine signifikante Steigerung im Migrationsverhalten der PASMCs von Mäusen durch die Aktivierung des CSF-1R durch dessen Rezeptor-spezifischen Liganden CSF-1 gezeigt werden, ein Einfluss auf das Proliferationsverhalten zeigte sich dagegen nicht. Zusammengefasst wird der CSF-1R von PASMCs exprimiert, hat einen migrationsfördernden Einfluss auf diesen Zelltyp und könnte bei der Entwicklung multifaktorieller Lungenerkrankungen und schwerer Formen der PH eine Rolle spielen. Daher könnte weitere Forschung an der CSF-1R-Expression von PASMCs zu einem besseren Verständnis des Pathomechanismus der PH beitragen und schließlich zu einer effektiveren Therapie der PH führen.

## 5.1 Summary

Pulmonary Hypertension (PH) affects the pulmonary vasculature by pathological thickening of the vessel walls and narrowing of the vascular lumen. Consequently the pulmonary blood pressure rises, leading to a right heart overload, which can eventually cause death by right heart failure. Until today there is no cure, but only symptomatic therapy for PH-patients. Therefore, investigations of the PH-pathomechanism are necessary to find new therapeutic targets and, above all, improve the patients' prognosis. The models investigated in this study such as tobacco smoke- and hypoxia-exposed mice, monocrotalin-treated rats (MCT), IPAH- and COPD-Patients develop pathological thickening of the vessel walls especially in precapillar arteriols. Pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) are therefore of major importance regarding the formation and manifestation of PH. That is why this study investigated this specific cell type for their expression of the colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R), which is well known and already used in diagnostics and therapy of other hyperproliferative diseases. The characterization of the CSF-1R-expression of PASMCs was done by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), Western Blot analysis (WB) and Immunohistochemistry (IHC). The expression of the CSF-1R was proven qualitatively in all models mentioned above. Quantitatively the study showed in IPAH- and COPD-patients, as well as in MCT-exposed rats in the IHC and in PASMCs of MCT-treated rats in WB a significant increase of the CSF-1R-expression compared to the respective control. All the other investigated PH-models did not show significant changes in their CSF-1R-expression. On the basis of this data the CSF-1R in PASMCs seems to play a pathophysiological role in multifactorial lung diseases such as COPD and severe types of PH such as IPAH and MCT-induced; however moderate models of PH such as tobacco smoke- and hypoxia-induced PH in mice appear to be less affected. In addition, this study showed a significant increase in migration of PASMCs stimulated by CSF-1, a CSF-1R-specific ligand. In summary, the data of this study shows that the CSF-1R is expressed by PASMCs and moreover, has a functional importance for this cell type. Therefore, further investigation of the CSF-1R could contribute to a deeper understanding of the PH's pathology and ultimately, lead to a more effective treatment of the PH-disease.

## 6 Ehrenwörtliche Erklärung

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 7 Danksagung

Ich danke allen, die mich in jedweder Weise unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich freue mich so sehr, dass ich meine Arbeit nun vollenden konnte und weiß, dass dies ohne euch nicht möglich gewesen wäre:

- Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Norbert Weißmann bedanken, der neben der Themenstellung, Betreuung und Korrektur meiner Arbeit, immer bereit war – zu jeder Zeit und von überall auf der Welt –, mir auf meine Fragen zu antworten und konstruktive Kritik abzugeben.
- Meinem Betreuer Dr. Florian Veit und den Postdocs Dr. Djuro Kosanovic, Dr. Christine Veith, Dr. Alexandra Pichl sowie Dr. Oleg Pak, danke ich sehr für die selbstverständliche Weitergabe eures Wissens und eurer Erfahrungen.
- Ferner bedanke ich mich ganz herzlich bei den beiden Prüfern.
- Ein besonderer Dank geht an Ingrid Breitenborn-Müller für deine tolle Art, das geduldige Erklären, die gute Laune und die schöne Zeit.
- Außerdem danke ich Ewa Bieniek, Lisa Fröhlich, Carmen Homberger, Elisabeth Kappes, Karin Quanz und Miriam Wessendorf und dem ganzen ECCPS-Team für die technische Hilfe, die offene, freundschaftliche, lustige Atmosphäre und eure Hilfsbereitschaft.
- Zuletzt und am allerwichtigsten danke ich natürlich meiner Mutter, meinem Vater, meiner Familie, allen Freunden und Bekannten. Ihr habt mich gelobt und kritisiert, ihr habt mir Kraft und Motivation gegeben, ihr habt mir zugehört und Korrektur gelesen, aber vor allem seid ihr immer für mich da. DANKE!

## 8 Lebenslauf

## 9 Veröffentlichungen

**Abstract:** Merlin Reinhardt, Christine Veith, Werner Seeger, Florian Veit, Norbert Weißmann. *Charakterisierung der Expression des Kolonie-stimulierenden Faktor-1 Rezeptors in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen.* Pneumologie 2018; 72: 1–15 (Thieme, 2018).

**Poster:** Merlin Reinhardt, Christine Veith, Werner Seeger, Florian Veit, Norbert Weißmann. *Charakterisierung der Expression des Kolonie-stimulierenden Faktor-1 Rezeptors in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen.* Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (November 2017, Gießen).

## 10 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 - Schematische Darstellung der menschlichen Lunge modifiziert nach J. Ecke <sup>2</sup>. Gezeigt werden die Trachea mit dem sich anschließenden Bronchialsystem innerhalb des Brustkorbes, sowie der O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Austausch zwischen Alveolen und Kapillaren. ....7
- Abbildung 2 – Schematischer Wandaufbau einer Arterie modifiziert nach J. Ecke <sup>1</sup>. Zu sehen ist die typische Dreischichtung einer Arterie mit Endothel, Media und Adventitia, welche von der Tunica elastica interna und externa voneinander abgegrenzt werden.....9
- Abbildung 3 - Veränderung einer gesunden Pulmonalarterie auf der linken Bildseite zu einer bei PH pathologisch veränderten Pulmonalarterie auf der rechten Bildseite. Auf der rechten Seite sind insbesondere die Neointimaformation sowie die Mediahypertrophie, die zur Gefäßverengung und konsekutiv zur PH führt, zu erkennen. Abkürzungen: Typ 1 Pneumozyt (Typ 1 PZ), Typ 2 Pneumozyt (Typ 2 PZ). Modifiziert nach Schermuly et al. <sup>3</sup>..... 13
- Abbildung 4 – Unterschiede zwischen einer gesunden, dünnwandigen Pulmonalarterie in a) und einer bei PH pathologisch veränderten Pulmonalarterie durch

Mediaproliferation in b) sowie durch Neointimaformation in c). Auf den Abbildungen zeigen die PASMCs der Gefäßmedia eine Rotfärbung gegen CSF-1R durch CSF-1R-Antikörper und die Zellkerne eine Blaufärbung durch Hämatoxylin. Die verwendeten Bilder a), b), c) in dieser Abbildung stammen aus eigenen Färbungen.....	15
Abbildung 5 – Mediahypertrophie mit Neointima bei einer Pulmonalarterie. Besonders die für die PH pathognomonische starke Verdickung der Gefäßmedia sowie die nahezu vollständige Okklusion des Gefäßlumens durch die Neointima ist in diesem Bild gut zu erkennen <sup>60,65</sup> . Auf der Abbildung zeigen die PASMCs der Gefäßmedia eine Rotfärbung gegen CSF-1R durch CSF-1R-Antikörper und die Zellkerne eine Blaufärbung durch Hämatoxylin. Das verwendete Bild in dieser Abbildung stammt aus eigenen Färbungen. ....	18
Abbildung 6 – Western Blot Membranen von Hypoxie-exponierten Mäusen. Die WB Membran auf der linken Seite zeigt CSF-1R-spezifischen Banden. Die WB Membran auf der rechten Seite zeigt dieselbe Membran nach Inkubation mit einem Gemisch aus CSF-1R-Antikörper-spezifischen blocking peptide und dem Primärantikörper. Rot markiert sind die CSF-1R-spezifischen Banden mit einer Molekülmasse von ca. 160 kDa. Grün markiert ist die CSF-1R-spezifische Positivkontrolle mit einer Molekülmasse von ca. 110 kDa. ....	41
Abbildung 7 - Exemplarische Darstellung eines Western Blots mit CSF-1R-Antikörper markierten Banden. A: Spalte für verwendeten Marker mit farblich markierten Proteinen mit standardisierten Molekülmassen in kDa als Referenzwert für die untersuchten Proben. B: Zeile mit CSF-1R spezifischen Banden mit einer Molekülmasse von ca. 160 kDa. C: Zeilen mit unspezifischen Banden aufgrund der Polyklonalität des verwendeten CSF-1R-Antikörpers. ....	41
Abbildung 8 - Exemplarische Darstellung eines Western Blots mit $\beta$ -Aktin-Antikörper markierten Banden. 1: Spalte für verwendeten Marker mit farblich markierten Proteinen mit standardisierten Molekülmassen in kDa als Referenzwert für die untersuchten Proben. 2: Zeile mit $\beta$ -Aktin spezifischen Banden mit einer Molekülmasse von ca. 42 kDa. ....	42
Abbildung 9 - Weißabgleich zur Normierung der Messwerte auf unspezifische Hintergrundfärbung.....	47

Abbildung 10 - Höchste Farbtintensität in der CSF-1R-spezifischen Rotfärbung als Referenz für alle Messwerte.....	47
Abbildung 11 - Markierung der relevanten, durch Qwin V3 detektierten CSF-1R-spezifischen Rotfärbung durch türkisfarbene Umrandung.....	48
Abbildung 12 – Tabellendokument der Software Qwin V3. Es werden vier verschiedene Messwerte aufgelistet: A) Scoring B) Scoring % C) Score Value % D) Area %...	49
Abbildung 13 – CSF-1R-mRNA-Expression in MCT-behandelten Ratten. Links Homogenat: Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression von unbehandelten (Kontrolle) mit MCT-behandelten Ratten mittels qPCR. Normierung der delta Ct-Werte auf HPRT; n = 12 (Kontrolle), n = 20 (MCT). Nicht signifikant. Rechts PSMCs: Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression in PSMCs isoliert von unbehandelten (Kontrolle) und MCT-behandelten Ratten mittels qPCR. Normierung der delta Ct-Werte auf HPRT; n = 9 (Kontrolle), n = 12 (MCT). Nicht signifikant.....	51
Abbildung 14 – Links CSF-1R-mRNA-Expression in Tabakrauch-exponierten Mäusen: Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression von unbehandelten (Kontrolle) mit Tabakrauch-exponierten Mäusen (Rauch) mittels qPCR. Normierung der delta Ct-Werte auf PBGD; n = 12 pro Gruppe. Nicht signifikant. Rechts CSF-1R-mRNA-Expression in Hypoxie-exponierten Mäusen: Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression von Normoxie-behandelten (NOX) mit unter Hypoxie gehaltenen Mäusen (HOX) mittels qPCR. Normierung der delta Ct-Werte auf HPRT; n = 5 (NOX), n = 5 (HOX). Nicht signifikant. ....	51
Abbildung 15 – Links CSF-1R-mRNA-Expression in Humanen Proben von COPD- und IPAH-Patienten sowie Donoren: Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression von lungengesunden Donoren mit COPD- sowie IPAH-Patienten mittels qPCR. Normierung der delta Ct-Werte auf B2M; n = 12 (Donor), n = 8 (COPD), n = 16 (IPAH). Nicht signifikant. Rechts CSF-1R-mRNA-Expression in Hypoxie-exponierten humanen PSMCs: Vergleich der CSF-1R-mRNA-Expression von unbehandelten (NOX) mit Hypoxie-exponierten humanen PSMCs. Normierung der delta Ct-Werte auf PBGD; n = 3 (NOX), n = 4 (HOX). Nicht signifikant. ....	52
Abbildung 16 – CSF-1R-Proteinexpression in MCT-behandelten Ratten. Links Homogenat: Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot	



Analyse; n = 3 (Kontrolle), n = 5 (MCT). Normierung der Proteinkonzentration auf $\beta$ -Aktin. Nicht signifikant. Rechts PSMCs: Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse. Normierung der Proteinkonzentration auf $\beta$ -Aktin; n = 3 (Kontrolle), n = 4 (MCT). „***“ Signifikant ( $p < 0,01$ ). .....	53
Abbildung 17 – Links CSF-1R-Proteinexpression in Tabakrauch-exponierten Mäusen: Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse. Normierung der Proteinkonzentration auf $\beta$ -Aktin; n = 6 (Kontrolle), n = 6 (Rauch). Nicht signifikant. Rechts CSF-1R-Proteinexpression in Hypoxie-exponierten Mäusen: Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse. Normierung der Proteinkonzentration auf $\beta$ -Aktin; n = 5 (NOX), n = 5 (HOX). Nicht signifikant. ....	53
Abbildung 18 - CSF-1R-Proteinexpression in Humanen Proben von COPD- und IPAH-Patienten sowie Donoren: Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse. Normierung der Proteinkonzentration auf $\beta$ -Aktin; links n = 3 (IPAH), n = 3 (Donor). Nicht signifikant – bei Ausschluss der vierten Probe von links (IPAH) und der zweiten Probe von rechts (Donor) aufgrund von nicht detektierbarem CSF-1R-Signal in der Densitometrie. Rechts n = 5 (IPAH), n = 5 (Donor). Nicht signifikant. ....	54
Abbildung 19 - Hypoxie-exponierte humane PSMCs: Bestimmung der Proteinexpression des CSF-1R mittels Western Blot Analyse. Normierung der Proteinkonzentration auf $\beta$ -Aktin; n = 1 (NOX), n = 1 (HOX). Nicht signifikant. ....	54
Abbildung 20 - Negativkontrolle human. Keine Rotfärbung.....	55
Abbildung 21 - Negativkontrolle Ratte. Keine Rotfärbung. ....	55
Abbildung 22 - Negativkontrolle Maus. Keine Rotfärbung.....	55
Abbildung 23 - Positivkontrolle human Milz. Mutmaßlich sind insbesondere die CSF-1R-exprimierenden Mono-zyten rot gefärbt. ....	55
Abbildung 24 - Positivkontrolle Maus Darm. Rotfärbung in der Muskelschicht der Darmwand. ....	55
Abbildung 25 - Positivkontrolle Maus Milz. Mutmaßlich sind insbesondere die CSF-1R-exprimierenden Monozyten rot gefärbt. ....	55

Abbildung 26 – CSF-1R-Expression in pulmonalen Gefäßen in aufeinander folgenden Serienschnitten: Links Exemplarisches Bild einer CSF-1R-spezifischen Rotfärbung. Rechts Exemplarisches Bild einer Doppelfärbung mit vWF- spezifischer Braunfärbung am Endothel und $\alpha$ -sma-spezifischer Blauviolett- färbung an glatten Muskelzellen.....	56
Abbildung 27 - Donor human: links CSF-1R, rechts $\alpha$ -sma/vWF.....	57
Abbildung 28 - COPD human: links CSF-1R, rechts $\alpha$ -sma/vWF. ....	57
Abbildung 29 - IPAH human: links CSF-1R, rechts $\alpha$ -sma/vWF.....	57
Abbildung 30 - MCT-behandelte Ratte: links CSF-1R, rechts $\alpha$ -sma/vWF. ....	57
Abbildung 31 - unbehandelte Kontrolle Ratte: links CSF-1R, rechts $\alpha$ -sma/vWF.....	58
Abbildung 32 - Hypoxie-exponierte Maus: links CSF-1R, rechts $\alpha$ -sma/vWF. ....	58
Abbildung 33 - Normoxie-exponierte Maus: links CSF-1R, rechts $\alpha$ -sma/vWF.....	58
Abbildung 34 – Tabakrauch-exponierte Maus: links CSF-1R, rechts $\alpha$ -sma/vWF. ....	58
Abbildung 35 – Kontrolle zur Tabakrauch-exponierten Maus: links CSF-1R, rechts $\alpha$ - sma/vWF. ....	59
Abbildung 36 - MCT-behandelte Ratten: Morphometrische Quantifizierung der CSF- 1R-Expression der immunhistochemisch rot angefärbten Präparate; n = 10 (Kontrolle), n = 10 (MCT). „*“ Signifikant (p < 0,05). Bilder: Links Pulmonales Gefäß einer Placebo-behandelten Ratte. Rechts Pulmonales Gefäß einer MCT- behandelten Ratte. ....	59
Abbildung 37 - Tabakrauch-exponierte Mäuse: Morphometrische Quantifizierung der CSF-1R-Expression der immunhistochemisch rot angefärbten Präparate; n = 5 (Kontrolle), n = 5 (Rauch). Nicht signifikant. Bilder: Links Pulmonales Gefäß einer Placebo-behandelten Kontrollmaus. Rechts Pulmonales Gefäß einer Tabakrauch-exponierten Maus. ....	60
Abbildung 38 - Hypoxie-exponierte Mäuse: Morphometrische Quantifizierung der immunhistochemisch rot angefärbten Präparate; n = 5 (NOX), n = 5 (HOX). Nicht signifikant. Bilder: Links Pulmonales Gefäß einer Normoxie-exponierten Maus. Rechts Pulmonales Gefäß einer Hypoxie-exponierten Maus.....	60

Abbildung 39 - Humane Proben von COPD- und IPAH-Patienten und Donoren:  
Morphometrische Quantifizierung der CSF-1R-Expression der immunhistochemisch rot angefärbten Präparate; n = 10 (Donor), n = 10 (COPD), n = 10 (IPAH). COPD- und IPAH-Gruppe zeigen „\*“ signifikant erhöhte CSF-1R-Expression im Vergleich zu lungengesunden Donoren (p < 0,05). Bilder: Oben Pulmonales Gefäß eines lungengesunden Donoren. Unten links Pulmonales Gefäß eines COPD-Patienten. Unten rechts Pulmonales Gefäß eines IPAH-Patienten. ...60

Abbildung 40 – Einfluss der CSF-1-Stimulation auf die DNA-Syntheserate bei murinen PSMCs. Die PSMCs wurden mit 10ng/µl CSF-1 bzw. mit 100ng/µl CSF-1 und als Kontrolle mit NaCl stimuliert. Auswertung des Proliferationsassays nach 5, 10, 15 und 20 Minuten .....61

Abbildung 41 - Einfluss der CSF-1-Stimulation auf die Migrationsrate bei murinen PSMCs. Vergleich von CSF-1 stimulierten Maus PSMCs (stim) mit Placebo (NaCl)-behandelten Maus PSMCs (us) nach 6 und 12 Stunden (Std.). „\*“ Signifikanter Unterschied (p < 0,05).....62

Abbildung 42 - Unstimuliert nach 3h.....63

Abbildung 43 - Stimuliert mit CSF-1 nach 3h .....63

Abbildung 44 - Unstimuliert nach 6h.....63

Abbildung 45 - Stimuliert mit CSF-1 nach 6h .....63

Abbildung 46 - Unstimuliert nach 12h.....63

Abbildung 47 - Stimuliert mit CSF-1 nach 12h .....63

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Verwendete CSF-1R-Primer in der qPCR für Ratte, Mensch und Maus.  
Abkürzungen: vorwärts (F); rückwärts (R); Guanin (G); Cytosin (C); Thymin (T); Adenin (A).....34

Tabelle 2 - Verwendete Primer der Referenzgene in der qPCR für die Modelle der MCT-behandelten Ratte, Hypoxie- und Tabakrauch-exponierter Maus sowie

humanen Proben. Abkürzungen: vorwärts (F); rückwärts (R); Guanin (G); Cytosin (C); Thymin (T); Adenin (A). .....	35
Tabelle 3 - Standardisierte Grundeinstellung von Belichtungszeit, Verstärkung und Farbsättigung für das verwendete Lichtmikroskop. ....	46
Tabelle 4 - Standardisierte Grundeinstellung von Intensität, Aperturblende und Feldblende für das verwendete Lichtmikroskop. ....	46
Tabelle 5 - Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit untersuchten Modelle und deren CSF-1R-Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle in qPCR, WB, IHC; erhöht = signifikant verstärkte CSF-1R-Expression; ns = kein signifikanter Unterschied in der CSF-1R-Expression; IHC bei PSMCs nicht durchführbar.....	65
Tabelle 6 – Erläuterung zum Tabellendokument der Software Qwin V3.....	77

## 12 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
Akt	Serin/Threonin Protein-Kinase Akt
Alk1	Activin receptorlike Kinase 1
AP	Alkalische Phosphatase
BMP-2R	Bone morphogenic protein 2 Rezeptor
BSA	Bovines Serum-Albumin
cA	Kardialer Auswurf
Ca.	circa
cDNA	Komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CSF-1	Kolonie-stimulierender Faktor-1

CSF-1R	Kolonie-stimulierender Faktor-1 Rezeptor
DANN	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz
ED	Endotheliale Dysfunktion
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
Et al.	Et alteri – und andere
FCS	Fetales Kälberserum
FiO <sub>2</sub>	Sauerstofffraktion
FPAH	Hereditäre PAH
G	Gramm
GM	Glioblastoma multiforme
H	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IgG	Immunglobulin G
ICH	Immunhistochemie
IL-6/22/34	Interleukin-6/22/34
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
K	Kilo (10 <sup>3</sup> )
k.A.	Keine Angabe
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter

LST	Langzeitsauerstofftherapie
M	Milli ( $10^{-3}$ )
M	Meter
M	Molar – Konzentration in Mol/l
MAP	Mitogen-activated Protein
MCT	Monocrotalin
Min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	Mittlerer pulmonalerarterieller Druck
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Anzahl verschiedener Messungen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAH	Pulmonalerarterielle Hypertonie
PAP	Pulmonalerarterieller Druck
PASMC	Pulmonalerarterielle glatte Muskelzelle
PBS	Phosphate buffered saline
P <sub>CO2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PDGF-R	Platelet derived growth factor Rezeptor
PET-CT	Positronenemissionstomographie- Computertomographie
PH	Pulmonale Hypertonie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

P <sub>O2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PVC	Pulmonalvaskuläre Compliance
PVC	Pulmonalvaskulärer Widerstand
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RIPA	Radio-Immunopräzipitations-Assay Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
SFK	Src family Kinase
siRNA	small interfering RNA
SMC	Glatte Muskelzelle
sPAP	Systolischer PAP
TAM	Tumor-assoziierte Makrophage
TBS	Tris-buffered saline Puffer
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Typ 1 PZ	Typ 1 Pneumozyt
Typ 2 PZ	Typ 2 Pneumozyt
U	Unit
V	Volt
VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzelle
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WB	Western Blot Analyse
$\alpha$ -sma	Alpha-smooth-muscle-aktin

## 13 Literaturverzeichnis

- 1 Ecke, J. - Schematischer Wandaufbau einer Arterie  
[http://www.naturstudiendesign.de/bilder/Medizin/40\\_Arteriosklerose/Arterie.htm](http://www.naturstudiendesign.de/bilder/Medizin/40_Arteriosklerose/Arterie.htm),  
2016).
- 2 Ecke, J. - Schematische Darstellung der menschlichen Lunge  
[http://www.naturstudiendesign.de/bilder/Der\\_Mensch/40\\_Innere-Organ/Lunge.htm](http://www.naturstudiendesign.de/bilder/Der_Mensch/40_Innere-Organ/Lunge.htm),  
2016).
- 3 Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R. & Grimminger, F.  
Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews. Cardiology*  
8, 443-455, doi:10.1038/nrcardio.2011.87 (2011).
- 4 Herold, G. e. a. *Innere Medizin*. (Herold, Gerd, 2014).
- 5 Chan, S. Y. & Loscalzo, J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial  
hypertension. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44, 14-30,  
doi:10.1016/j.yjmcc.2007.09.006 (2008).
- 6 Schünke, M. S., Schumacher, U. et al. *Innere Organe*. Vol. 6 (Thieme, 2012).
- 7 Huppelsberg, J. W., K. *Kurzlehrbuch Physiologie*. (Thieme, 2013).
- 8 Klinke, R. S., S. et al. *Physiologie*. Vol. 6 (Thieme, 2009).
- 9 Welsch et al. *Lehrbuch Histologie*. (Elsevier GmbH, 2010).
- 10 Arasteh, B., Bieber, Brandt et al. *Innere Medizin*. (Thieme, 2012).
- 11 Firth, A. L., Mandel, J. & Yuan, J. X. Idiopathic pulmonary arterial  
hypertension. *Disease Models & Mechanisms* 3, 268-273, doi:10.1242/dmm.003616  
(2010).
- 12 Wilkins, M. R. Pulmonary hypertension: the science behind the disease  
spectrum. *European Respiratory Review: an official journal of the European  
Respiratory Society* 21, 19-26, doi:10.1183/09059180.00008411 (2012).



- 13 Simonneau, G. *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 54, S43-54, doi:10.1016/j.jacc.2009.04.012 (2009).
- 14 <http://www.lung.org/lung-disease/pulmonary-arterial-hypertension/understanding-pah.html>.
- 15 Vonk-Noordegraaf, A. *et al.* Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *Journal of the American College of Cardiology* 62, D22-33, doi:10.1016/j.jacc.2013.10.027 (2013).
- 16 Simonneau, G. *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 62, D34-41, doi:10.1016/j.jacc.2013.10.029 (2013).
- 17 Rosenkranz, S. in *Cor pulmonale und pulmonale Hypertonie - Update nach der Weltkonferenz in Nizza* (ed © Urban & Vogel 2014) (© Urban & Vogel 2014, S. 58 ff., 2014).
- 18 Crosswhite, P. & Sun, Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling. *Molecular Medicine* 20, 191-201, doi:10.2119/molmed.2013.00165 (2014).
- 19 <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-hypertension/basics/tests-diagnosis/con-20030959>.
- 20 Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852, doi:10.1038/nature01320 (2002).
- 21 Deng, Z. *et al.* Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *American Journal of Human Genetics* 67, 737-744, doi:10.1086/303059 (2000).
- 22 Ishii, M. *et al.* Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood* 114, 3244-3254, doi:10.1182/blood-2009-04-217620 (2009).
- 23 Tuder, R. M. *et al.* Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 62, D4-12, doi:10.1016/j.jacc.2013.10.025 (2013).

- 24 Weir, E. K., Tucker, A., Reeves, J. T., Will, D. H. & Grover, R. F. The genetic factor influencing pulmonary hypertension in cattle at high altitude. *Cardiovascular Research* 8, 745-749 (1974).
- 25 Cruz, J. C., Reeves, J. T., Russell, B. E., Alexander, A. F. & Will, D. H. Embryo transplanted calves: the pulmonary hypertensive trait is genetically transmitted. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 164, 142-145 (1980).
- 26 Yildiz, P. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. *Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry* 403, 9-16, doi:10.1016/j.cca.2009.01.018 (2009).
- 27 Galie, N. *et al.* Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* 25, 2243-2278, doi:10.1016/j.ehj.2004.09.014 (2004).
- 28 Eddahibi, S. *et al.* Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 113, 1857-1864, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.591321 (2006).
- 29 Sanchez, O. *et al.* Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176, 1041-1047, doi:10.1164/rccm.200610-1559OC (2007).
- 30 Adnot, S. Lessons learned from cancer may help in the treatment of pulmonary hypertension. *Journal of Clinical Investigation* 115, 1461-1463, doi:10.1172/JCI25399 (2005).
- 31 Dromparis, P., Sutendra, G. & Michelakis, E. D. The role of mitochondria in pulmonary vascular remodeling. *Journal of Molecular Medicine* 88, 1003-1010, doi:10.1007/s00109-010-0670-x (2010).
- 32 Nogueira-Ferreira, R., Ferreira, R. & Henriques-Coelho, T. Cellular interplay in pulmonary arterial hypertension: implications for new therapies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843, 885-893, doi:10.1016/j.bbamcr.2014.01.030 (2014).

- 33 Mandegar, M. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvascular Research* 68, 75-103, doi:10.1016/j.mvr.2004.06.001 (2004).
- 34 Campo, A. *et al.* Hemodynamic predictors of survival in scleroderma-related pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182, 252-260, doi:10.1164/rccm.200912-18200C (2010).
- 35 Chung, L. *et al.* Characterization of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension from REVEAL: identifying systemic sclerosis as a unique phenotype. *Chest* 138, 1383-1394, doi:10.1378/chest.10-0260 (2010).
- 36 Hoepfer, M. M. *et al.* Outcome after cardiopulmonary resuscitation in patients with pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165, 341-344, doi:10.1164/ajrccm.165.3.200109-0130c (2002).
- 37 D'Alonzo, G. E. *et al.* Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Annals of Internal Medicine* 115, 343-349 (1991).
- 38 Sanz, J., Conroy, J. & Narula, J. Imaging of the right ventricle. *Cardiology Clinics* 30, 189-203, doi:10.1016/j.ccl.2012.03.001 (2012).
- 39 Kasimir, M. T. *et al.* Reverse cardiac remodelling in patients with primary pulmonary hypertension after isolated lung transplantation. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 26, 776-781, doi:10.1016/j.ejcts.2004.05.057 (2004).
- 40 Kramer, M. R., Valantine, H. A., Marshall, S. E., Starnes, V. A. & Theodore, J. Recovery of the right ventricle after single-lung transplantation in pulmonary hypertension. *The American Journal of Cardiology* 73, 494-500 (1994).
- 41 Malenfant, S. *et al.* Signal transduction in the development of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation* 3, 278-293, doi:10.4103/2045-8932.114752 (2013).
- 42 Pietra, G. G. *et al.* Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 43, 25S-32S, doi:10.1016/j.jacc.2004.02.033 (2004).

- 43 Lee, S. D. *et al.* Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *The Journal of Clinical Investigation* 101, 927-934, doi:10.1172/JCI1910 (1998).
- 44 Rabinovitch, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of Clinical Investigation* 122, 4306-4313, doi:10.1172/JCI60658 (2012).
- 45 Rosenberg, H. C. & Rabinovitch, M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *The American Journal of Physiology* 255, H1484-1491 (1988).
- 46 Rabinovitch, M. *et al.* Pulmonary artery endothelial abnormalities in patients with congenital heart defects and pulmonary hypertension. A correlation of light with scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. *Laboratory Investigation* 55, 632-653 (1986).
- 47 Kardiologie, D. G. f. *Pocket-Leitlinien: Diagnostik und Therapie der Pulmonalen Hypertonie.* (2010).
- 48 *PharmaWiki*, <<http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=PharmaWiki>>
- 49 Fadel, E. *et al.* Long-term outcome of double-lung and heart-lung transplantation for pulmonary hypertension: a comparative retrospective study of 219 patients. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 38, 277-284, doi:10.1016/j.ejcts.2010.02.039 (2010).
- 50 Baenkler *et al.* *Kurzlehrbuch Innere Medizin.* (Thieme, 2010).
- 51 Murray, C. J. & Lopez, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 349, 1269-1276, doi:10.1016/S0140-6736(96)07493-4 (1997).
- 52 COPD, G. I. f. *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD.* (<https://www.researchgate.net>, 2014).
- 53 Lancet, T. From what will we die in 2020? *The Lancet* 349 (1997).
- 54 Sakao, S., Voelkel, N. F. & Tatsumi, K. The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. *European Respiratory Review* 23, 350-355, doi:10.1183/09059180.00007913 (2014).

- 55 Minai, O. A., Chaouat, A. & Adnot, S. Pulmonary hypertension in COPD: epidemiology, significance, and management: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest* 137, 39S-51S, doi:10.1378/chest.10-0087 (2010).
- 56 Barbera, J. A. & Blanco, I. Pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease: advances in pathophysiology and management. *Drugs* 69, 1153-1171, doi:10.2165/00003495-200969090-00002 (2009).
- 57 Zakyntinos, E., Daniil, Z., Papanikolaou, J. & Makris, D. Pulmonary hypertension in COPD: pathophysiology and therapeutic targets. *Current Drug Targets* 12, 501-513 (2011).
- 58 Seimetz, M. *et al.* Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 147, 293-305, doi:10.1016/j.cell.2011.08.035 (2011).
- 59 Santos, S. *et al.* Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *The European Respiratory Journal* 19, 632-638 (2002).
- 60 Ghofrani, H. A. *et al.* Hypoxia- and non-hypoxia-related pulmonary hypertension - established and new therapies. *Cardiovascular Research* 72, 30-40, doi:10.1016/j.cardiores.2006.07.025 (2006).
- 61 Stoller, J. K. *et al.* Oxygen therapy for patients with COPD: current evidence and the long-term oxygen treatment trial. *Chest* 138, 179-187, doi:10.1378/chest.09-2555 (2010).
- 62 Sawada, H. *et al.* Reduced BMPR2 expression induces GM-CSF translation and macrophage recruitment in humans and mice to exacerbate pulmonary hypertension. *The Journal of Experimental Medicine* 211, 263-280, doi:10.1084/jem.20111741 (2014).
- 63 Zhang, S. *et al.* Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 285, L740-754, doi:10.1152/ajplung.00284.2002 (2003).
- 64 <http://lungcenter.osu.edu/specialtyprograms/pulmonaryhypertension/factsaboutpulmonaryhypertension/>.

- 65 Barnes, P. J. Chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine* 343, 269-280, doi:10.1056/NEJM200007273430407 (2000).
- 66 Maarman, G., Lecour, S., Butrous, G., Thienemann, F. & Sliwa, K. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulmonary Circulation* 3, 739-756, doi:10.1086/674770 (2013).
- 67 Pak, O. Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research (2010).
- 68 Meyrick, B. & Reid, L. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *The American Journal of Pathology* 100, 151-178 (1980).
- 69 Yen, C. H. *et al.* Sildenafil limits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats through suppression of pulmonary vascular remodeling. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 55, 574-584, doi:10.1097/FJC.0b013e3181d9f5f4 (2010).
- 70 Gomez-Arroyo, J. G. *et al.* The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 302, L363-369, doi:10.1152/ajplung.00212.2011 (2012).
- 71 Veit, F. Regulation und Funktion der NADPH-Oxidase 1 in pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen aus Ratten im Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie, *JLU Gießen*, (2012).
- 72 Pichl, A. Die Rolle des serotonergen Systems und der Effekt des Serotonin-Antagonisten Tergurid im Zigarettenrauchinduzierten Lungenemphysemmodell der Maus, *JLU Gießen*, (2013).
- 73 Heisterkamp, N., Groffen, J. & Stephenson, J. R. Isolation of v-fms and its human cellular homolog. *Virology* 126, 248-258 (1983).
- 74 Hume, D. A. & MacDonald, K. P. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* 119, 1810-1820, doi:10.1182/blood-2011-09-379214 (2012).

- 75 Sapi, E. The role of CSF-1 in normal physiology of mammary gland and breast cancer: an update. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 229, 1-11 (2004).
- 76 Yeung, Y. G. & Stanley, E. R. Proteomic approaches to the analysis of early events in colony-stimulating factor-1 signal transduction. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 2, 1143-1155, doi:10.1074/mcp.R300009-MCP200 (2003).
- 77 Rettenmier, C. W., Roussel, M. F. & Sherr, C. J. The colony-stimulating factor 1 (CSF-1) receptor (c-fms proto-oncogene product) and its ligand. *Journal of Cell Science. Supplement* 9, 27-44 (1988).
- 78 Stanley, E. R. *et al.* Biology and action of colony--stimulating factor-1. *Molecular Reproduction and Development* 46, 4-10, doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199701)46:1<4::AID-MRD2>3.0.CO;2-V (1997).
- 79 Rettenmier, C. W. *et al.* Synthesis of membrane-bound colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and downmodulation of CSF-1 receptors in NIH 3T3 cells transformed by cotransfection of the human CSF-1 and c-fms (CSF-1 receptor) genes. *Molecular and Cellular Biology* 7, 2378-2387 (1987).
- 80 Pixley, F. J. & Stanley, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in Cell Biology* 14, 628-638, doi:10.1016/j.tcb.2004.09.016 (2004).
- 81 Pullamsetti, S. S. *et al.* Role of Src tyrosine kinases in experimental pulmonary hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32, 1354-1365, doi:10.1161/ATVBAHA.112.248500 (2012).
- 82 Baay, M., Brouwer, A., Pauwels, P., Peeters, M. & Lardon, F. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clinical & Developmental Immunology* 2011, 565187, doi:10.1155/2011/565187 (2011).
- 83 Morandi, A., Barbetti, V., Rivero, M., Dello Sbarba, P. & Rovida, E. The colony-stimulating factor-1 (CSF-1) receptor sustains ERK1/2 activation and proliferation in breast cancer cell lines. *PloS one* 6, e27450, doi:10.1371/journal.pone.0027450 (2011).
- 84 Hiroyasu, S. *et al.* Donor and recipient cell surface colony stimulating factor-1 promote neointimal formation in transplant-associated arteriosclerosis. *Arteriosclerosis,*

*Thrombosis, and Vascular Biology* 33, 87-95, doi:10.1161/ATVBAHA.112.300264 (2013).

85 Inaba, T. *et al.* Expression of M-CSF receptor encoded by c-fms on smooth muscle cells derived from arteriosclerotic lesion. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 5693-5699 (1992).

86 Horiguchi, J., Sherman, M. L., Sampson-Johannes, A., Weber, B. L. & Kufe, D. W. CSF-1 and C-FMS gene expression in human carcinoma cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157, 395-401 (1988).

87 Krol, M. *et al.* CSF-1R as an inhibitor of apoptosis and promoter of proliferation, migration and invasion of canine mammary cancer cells. *BMC Veterinary Research* 9, 65, doi:10.1186/1746-6148-9-65 (2013).

88 Pyonteck, S. M. *et al.* CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature Medicine* 19, 1264-1272, doi:10.1038/nm.3337 (2013).

89 Herembert, T., Gogusev, J., Zhu, D. L., Drueke, T. B. & Marche, P. Control of vascular smooth-muscle cell growth by macrophage-colony-stimulating factor. *Biochemical Journal* 325 ( Pt 1), 123-128 (1997).

90 Shin, E. K. *et al.* Association between colony-stimulating factor 1 receptor gene polymorphisms and asthma risk. *Human Genetics* 128, 293-302, doi:10.1007/s00439-010-0850-3 (2010).

91 Kacinski, B. M. *et al.* High level expression of fms proto-oncogene mRNA is observed in clinically aggressive human endometrial adenocarcinomas. *International Journal of Radiation Oncology \* Biology \* Physics* 15, 823-829 (1988).

92 Maher, M. G. *et al.* Prognostic significance of colony-stimulating factor receptor expression in ipsilateral breast cancer recurrence. *Clinical Cancer Research* 4, 1851-1856 (1998).

93 Tang, R. P. *et al.* Oncogene amplification correlates with dense lymphocyte infiltration in human breast cancers: a role for hematopoietic growth factor release by tumor cells? *Journal of Cellular Biochemistry* 44, 189-198, doi:10.1002/jcb.240440307 (1990).



- 94 Kacinski, B. M. *et al.* The cytokine CSF-1 (M-CSF) expressed by endometrial carcinomas in vivo and in vitro, may also be a circulating tumor marker of neoplastic disease activity in endometrial carcinoma patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 19, 619-626 (1990).
- 95 Priceman, S. J. *et al.* Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood* 115, 1461-1471, doi:10.1182/blood-2009-08-237412 (2010).
- 96 Godoy, M., Geuskens, M., Van Marck, E. A., Borojevic, R. & Van Gansen, P. Schistosomiasis and in vitro transdifferentiation of murine peritoneal macrophages into fibroblastic cells. *Parasitology Research* 76, 150-161 (1989).
- 97 Campbell, J. H., Efendy, J. L., Han, C., Girjes, A. A. & Campbell, G. R. Haemopoietic origin of myofibroblasts formed in the peritoneal cavity in response to a foreign body. *Journal of Vascular Research* 37, 364-371, doi:25752 (2000).
- 98 Shi, C. *et al.* Donor MHC and adhesion molecules in transplant arteriosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation* 103, 469-474, doi:10.1172/JCI4584 (1999).
- 99 Tellides, G. *et al.* Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature* 403, 207-211, doi:10.1038/35003221 (2000).
- 100 Stanley, E. R., Chen, D. M. & Lin, H. S. Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature* 274, 168-170 (1978).
- 101 Hamilton, J. A. CSF-1 signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology* 62, 145-155 (1997).
- 102 Clausell, N., Molossi, S., Sett, S. & Rabinovitch, M. In vivo blockade of tumor necrosis factor-alpha in cholesterol-fed rabbits after cardiac transplant inhibits acute coronary artery neointimal formation. *Circulation* 89, 2768-2779 (1994).
- 103 Suzuki, J. *et al.* Tumor necrosis factor receptor -1 and -2 double deficiency reduces graft arterial disease in murine cardiac allografts. *American Journal of Transplantation*: 968-976 (2003).
- 104 Veith, C. Pulmonale Hypertonie - Einfluss von Paxillin auf die Regulation der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen, *JLU Gießen*, (2012).

- 105 Weissmann, N. *et al.* Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19093-19098, doi:10.1073/pnas.0606728103 (2006).
- 106 Freeware, Primer3 (<http://simgene.com/Primer3>).
- 107 Mülhardt, C. *Der Experimentator*. Vol. 7 (Springer Spectrum, 2013).
- 108 Dheda, K. *et al.* Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37, 112-114, 116, 118-119 (2004).
- 109 Lenzel, R. e. *Der Experimentator*. Vol. 6 (Springer Spectrum, 2010).
- 110 Sherr, C. J. *et al.* The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell* 41, 665-676 (1985).
- 111 Morgan, C. J. & Stanley, E. R. Chemical crosslinking of the mononuclear phagocyte specific growth factor CSF-1 to its receptor at the cell surface. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 119, 35-41 (1984).
- 112 *Rodent Block M*, Biocare Medical USA (<http://biocare.net/product/rodent-block-m/>).
- 113 *Mouse-on-Mouse HRP-Polymer*, Biocare Medical USA (<http://biocare.net/wp-content/uploads/MM620.pdf>).
- 114 al., L. e. *Der Experimentator*. Vol. 4. Auflage (Springer Spektrum).
- 115 Kosanovic, D. *et al.* Chymase: a multifunctional player in pulmonary hypertension associated with lung fibrosis. *European Respiratory Journal*, doi:10.1183/09031936.00018215 (2015).
- 116 Remillard, C. V. & Yuan, J. X. High altitude pulmonary hypertension: role of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels. *High Altitude Medicine & Biology* 6, 133-146, doi:10.1089/ham.2005.6.133 (2005).
- 117 Newman, J. H. *et al.* Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred. *New England Journal of Medicine* 345, 319-324, doi:10.1056/NEJM200108023450502 (2001).

- 118 Thomson, J. R. *et al.* Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *Journal of Medical Genetics* 37, 741-745 (2000).
- 119 Peinado, V. I., Pizarro, S. & Barbera, J. A. Pulmonary vascular involvement in COPD. *Chest* 134, 808-814, doi:10.1378/chest.08-0820 (2008).
- 120 Veith, C., Schermuly, R. T., Brandes, R. P. & Weissmann, N. Molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor-induced pulmonary arterial smooth muscle cell alterations in pulmonary hypertension. *The Journal of Physiology* 594, 1167-1177, doi:10.1113/JP270689 (2016).
- 121 Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J. & McMurtry, I. F. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 297, L1013-1032, doi:10.1152/ajplung.00217.2009 (2009).
- 122 Bauer, N. R., Moore, T. M. & McMurtry, I. F. Rodent models of PAH: are we there yet? *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 293, L580-582, doi:10.1152/ajplung.00281.2007 (2007).
- 123 Schermuly, R. T. *et al.* Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 2811-2821, doi:10.1172/JCI24838 (2005).
- 124 Tudor, R. M., Groves, B., Badesch, D. B. & Voelkel, N. F. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The American Journal of Pathology* 144, 275-285 (1994).
- 125 Meyrick, B. O. & Reid, L. M. Crotalaria-induced pulmonary hypertension. Uptake of 3H-thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls. *American Journal of Pathology* 106, 84-94 (1982).
- 126 Roth, R. A., Dotzlauf, L. A., Baranyi, B., Kuo, C. H. & Hook, J. B. Effect of monocrotaline ingestion on liver, kidney, and lung of rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 60, 193-203 (1981).
- 127 Lin, H. *et al.* Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 320, 807-811, doi:10.1126/science.1154370 (2008).

- 128 Yu, G. *et al.* Activation of the interleukin-34 inflammatory pathway in response to influenza A virus infection. *American Journal of the Medical Sciences* 349, 145-150, doi:10.1097/MAJ.0000000000000373 (2015).
- 129 Balabanian, K. *et al.* CX3C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165, 1419-1425, doi:DOI 10.1164/rccm.2106007 (2002).
- 130 Dorfmuller, P. *et al.* Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165, 534-539, doi:10.1164/ajrccm.165.4.2012112 (2002).
- 131 Filderman, A. E., Bruckner, A., Kacinski, B. M., Deng, N. & Remold, H. G. Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) enhances invasiveness in CSF-1 receptor-positive carcinoma cell lines. *Cancer Research* 52, 3661-3666 (1992).
- 132 Bartocci, A. *et al.* Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 6179-6183 (1987).
- 133 Chambers, S. K., Kacinski, B. M., Ivins, C. M. & Carcangiu, M. L. Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. *Clinical Cancer Research* 3, 999-1007 (1997).
- 134 Rohrschneider, L. R., Rothwell, V. M. & Nicola, N. A. Transformation of murine fibroblasts by a retrovirus encoding the murine c-fms proto-oncogene. *Oncogene* 4, 1015-1022 (1989).
- 135 Fayard, E., Xue, G., Parcellier, A., Bozulic, L. & Hemmings, B. A. Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 346, 31-56, doi:10.1007/82\_2010\_58 (2010).
- 136 Rohrschneider, L. R. *et al.* Growth and differentiation signals regulated by the M-CSF receptor. *Molecular Reproduction and Development* 46, 96-103, doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199701)46:1<96::AID-MRD15>3.0.CO;2-1 (1997).
- 137 Bartocci, A., Pollard, J. W. & Stanley, E. R. Regulation of colony-stimulating factor 1 during pregnancy. *The Journal of Experimental Medicine* 164, 956-961 (1986).

- 138 Pollard, J. W. *et al.* Apparent role of the macrophage growth factor, CSF-1, in placental development. *Nature* 330, 484-486, doi:10.1038/330484a0 (1987).
- 139 Forum für Pulmonale Hypertonie ([http://www.kkkm.de/kk\\_km/bereiche/Medizinische\\_Abteilungen/Innere\\_Medizin/Seiten/Pulmonale\\_Hypertonie.php](http://www.kkkm.de/kk_km/bereiche/Medizinische_Abteilungen/Innere_Medizin/Seiten/Pulmonale_Hypertonie.php), 2015).
- 140 Sapi, E., Flick, M. B., Gilmore-Hebert, M., Rodov, S. & Kacinski, B. M. Transcriptional regulation of the c-fms (CSF-1R) proto-oncogene in human breast carcinoma cells by glucocorticoids. *Oncogene* 10, 529-542 (1995).
- 141 Talhouk, R. S., Chin, J. R., Unemori, E. N., Werb, Z. & Bissell, M. J. Proteinases of the mammary gland: developmental regulation in vivo and vectorial secretion in culture. *Development* 112, 439-449 (1991).
- 142 Souza, R., Sitbon, O., Parent, F., Simonneau, G. & Humbert, M. Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 61, 736, doi:10.1136/thx.2006.064097 (2006).
- 143 Hatano, M. *et al.* Imatinib mesylate has the potential to exert its efficacy by down-regulating the plasma concentration of platelet-derived growth factor in patients with pulmonary arterial hypertension. *International Heart Journal* 51, 272-276 (2010).
- 144 Garcia Hernandez, F. J. *et al.* [Experience with imatinib to treat pulmonary arterial hypertension]. *Archivos de Bronconeumologia* 44, 689-691 (2008).
- 145 Nayyar, D. *et al.* Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension and pulmonary capillary hemangiomas. *Pulmonary Circulation* 4, 342-345, doi:10.1086/675996 (2014).
- 146 Ghofrani, H. A. *et al.* Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182, 1171-1177, doi:10.1164/rccm.201001-0123OC (2010).
- 147 Chase, A. *et al.* Imatinib sensitivity as a consequence of a CSF1R-Y571D mutation and CSF1/CSF1R signaling abnormalities in the cell line GDM1. *Leukemia* 23, 358-364, doi:10.1038/leu.2008.295 (2009).
- 148 Hoepfer, M. M. *et al.* Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* 127, 1128-1138, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000765 (2013).

- 149 *Clinical Trial NCT01004861* (clinicaltrials.gov).
- 150 Ries, C. H. *et al.* Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell* 25, 846-859, doi:10.1016/j.ccr.2014.05.016 (2014).
- 151 *Clinical Trial NCT01346358* (clinicaltrials.gov).
- 152 *Clinical Trial NCT01440959* (clinicaltrials.gov).
- 153 Young, L. D. Blockade of CSF-1 and IL-34 in mouse model of inflammatory arthritis and colitis show a pathogenic role for IL-34. *The Journal of Immunology* (2013).
- 154 Erbllich, B., Zhu, L., Etgen, A. M., Dobrenis, K. & Pollard, J. W. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PloS one* 6, e26317, doi:10.1371/journal.pone.0026317 (2011).
- 155 Li, J., Chen, K., Zhu, L. & Pollard, J. W. Conditional deletion of the colony stimulating factor-1 receptor (c-fms proto-oncogene) in mice. *Genesis* 44, 328-335, doi:10.1002/dvg.20219 (2006).
- 156 Luo, J. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 157-172, doi:10.1084/jem.20120412 (2013).
- 157 Datenblatt des Antikörpers *c-FMS/CSF-1R (C-20): sc-692* (Santa Cruz Biotech., USA).