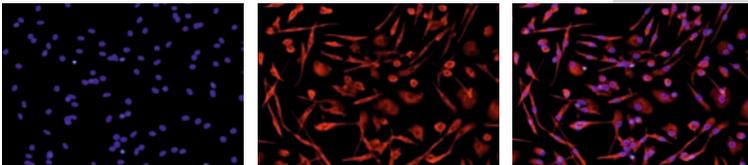


# Die Rolle zirkulierender Fibrozyten in der Pathogenese der pulmonal arteriellen Hypertonie

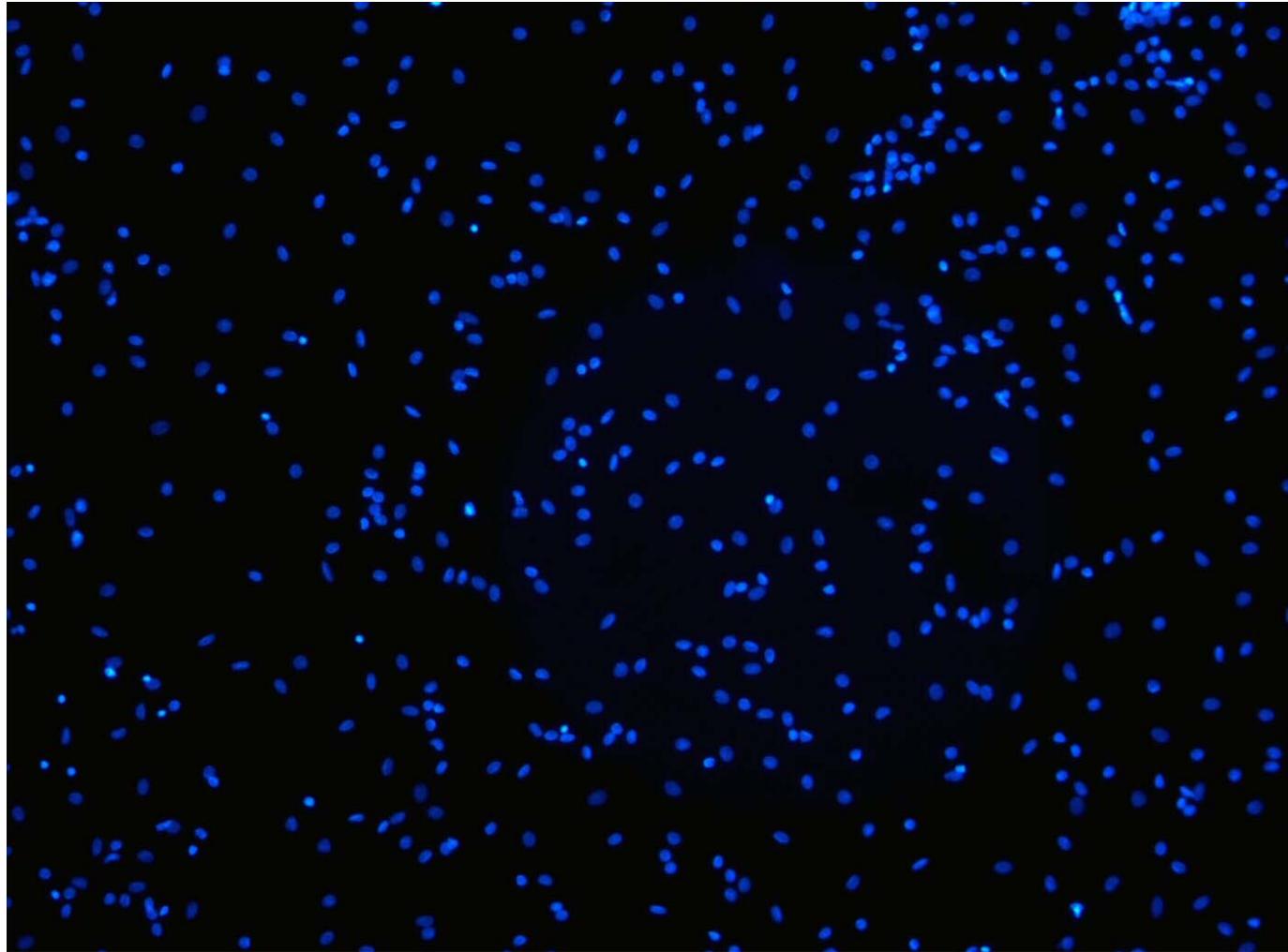
---

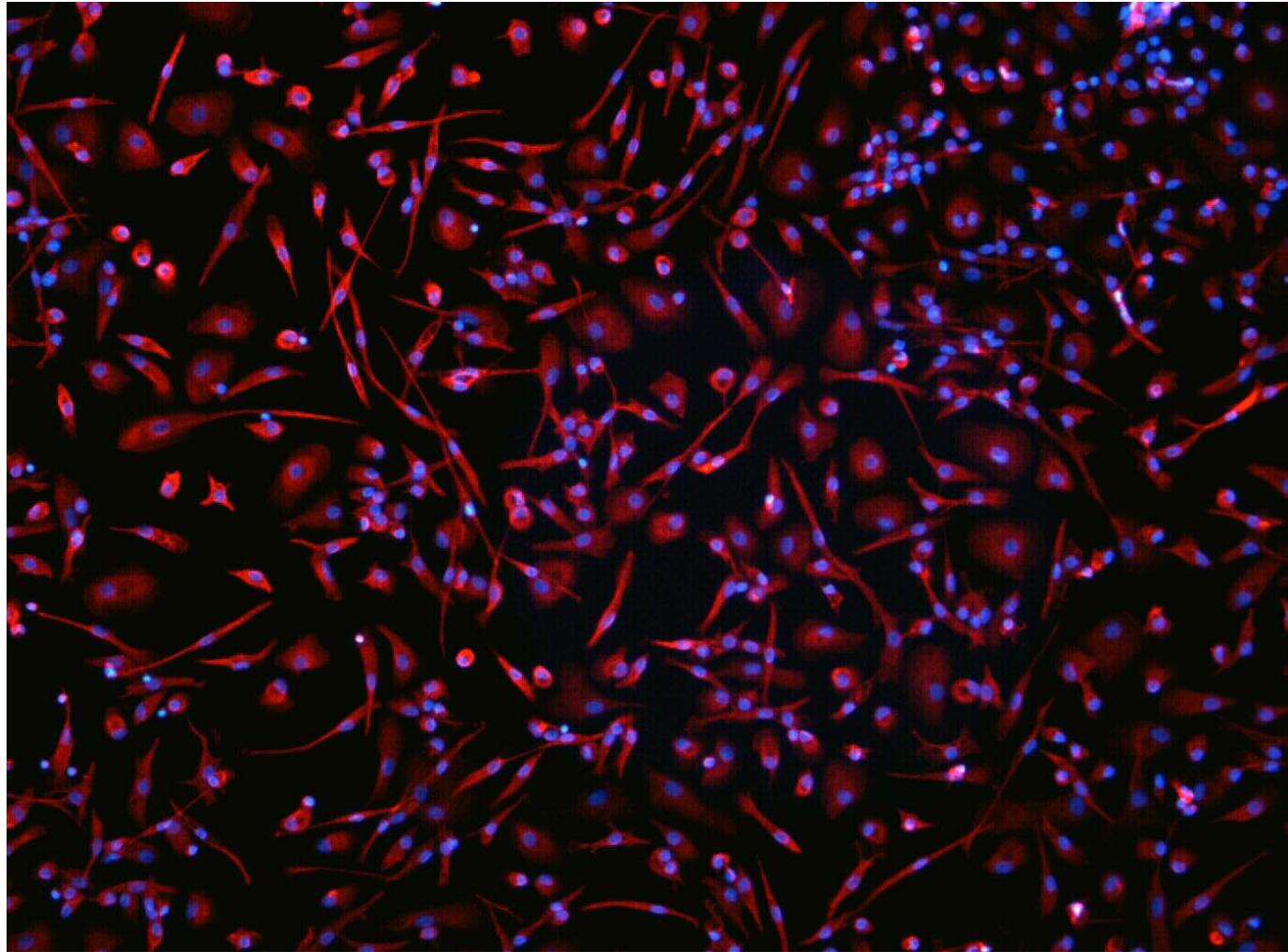
**Melanie Schuldes**

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



*édition scientifique*  
**VVB LAUFFERSWEILER VERLAG**





**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

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

1. Auflage 2013

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

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Die Rolle zirkulierender Fibrozyten in der Pathogenese  
der pulmonal arteriellen Hypertonie**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Melanie Schuldes**

aus Aichach / Bayern

Gießen 2013

Aus der Abteilung für Pulmologie der Medizinischen Klinik II  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. W. Seeger

Gutachter: PD Dr. R. Voswinckel

Gutachter: Prof. Dr. C. Hamm

Tag der Disputation: 07.11.2013

*Meinen Eltern und Großeltern*

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Einführung.....	1
1.1 Pulmonale Hypertonie.....	1
1.1.1 Definition und klinische Symptomatik.....	2
1.1.2 Klassifikation.....	3
1.1.3 Pathogenese und Pathophysiologie .....	5
1.1.4 Therapiestrategien .....	8
1.2 Zirkulierende Fibrozyten.....	12
1.2.1 Phänotyp.....	12
1.2.2 Differenzierung.....	13
1.2.3 Rekrutierung.....	14
1.2.4 Funktion .....	15
1.2.5 Die Rolle zirkulierender Fibrozyten in der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder .....	15
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden .....	22
2.1 Studienkollektiv .....	22
2.2 Material für molekularbiologische Analysen.....	23
2.2.1 Chemikalien.....	23
2.2.2 Pufferlösungen und Reaktionsansätze.....	24
2.2.3 Antikörper, Enzyme und Markerproteine.....	25
2.2.4 RNA- und ELISA- Kits.....	25
2.2.5 Geräte.....	26
2.3 Methodik .....	26
2.3.1 Isolierung zirkulierender Fibrozyten .....	26
2.3.2 Kultivierung der zirkulierenden Fibrozyten .....	27
2.3.3 Färben der zirkulierenden Fibrozyten .....	27
2.3.4 RNA-Isolierung.....	28
2.3.5 Reverse Transkription .....	29
2.3.6 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	29
2.3.6.1 Prinzip der PCR .....	29
2.3.6.2 Prinzip der qRT-PCR .....	29
2.3.6.3 Primer.....	30

2.3.6.4	<i>Amplifikation</i>	31
2.3.6.5	<i>Schmelzkurvenanalyse</i>	32
2.3.6.6	<i>Ct-Wert</i>	32
2.3.7	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	33
2.3.8	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)</i>	33
2.3.8.1	<i>Prinzip des ELISA</i>	33
2.3.8.2	<i>Zytokine</i>	34
2.3.8.3	<i>Auswertung des ELISA</i>	35
2.4	Statistische Analyse	35
3.	Resultate	36
3.1	Charakterisierung des Studienkollektivs	36
3.2	Ergebnisse der quantitativen Analyse zirkulierender Fibrozyten	37
3.3	Ergebnisse der ELISA	45
3.4	Ergebnisse der qRT-PCR	48
4.	Diskussion	55
4.1	Einfluss zirkulierender Fibrozyten auf die Entstehung der Pulmonalen Hypertonie	56
4.2	Korrelation zwischen der Anzahl zirkulierender Fibrozyten und dem Schweregrad der Pulmonalen Hypertonie	57
4.3	Einfluss der Therapie auf die Anzahl zirkulierender Fibrozyten	58
4.4	Einfluss zirkulierender Fibrozyten auf verschiedene Regulatorproteine	59
5.	Zusammenfassung	65
6.	Abkürzungsverzeichnis	69
7.	Abbildungsverzeichnis	72
8.	Tabellenverzeichnis	73
9.	Literaturverzeichnis	74
10.	Erklärung	81
11.	Danksagung	82



# 1. Einführung

## 1.1 Pulmonale Hypertonie

Die Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine heterogene Erkrankung, die charakterisiert ist durch eine Druck- und Widerstandserhöhung in den Pulmonalgefäßen. Sie kann ohne Ursache (idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie IPAH) oder als Folge einer Primärerkrankung auftreten [1].

Gemäß der aktuellen internationalen Klassifikation der pulmonalen Hypertonie werden, basierend auf histopathologischen und therapeutischen Gemeinsamkeiten, fünf Hauptgruppen unterschieden (Tab.1). Grundsätzlich grenzt man eine präkapilläre (Gruppen 1, 3 – 5) von einer postkapillären PH (Gruppe 2) ab. Bei der postkapillären Form kommt es durch eine Linksherzerkrankung (atrial, ventrikulär, valvulär) zu einer Stauung im pulmonalvenösen Gefäßsystem und sekundär zu einer Erhöhung des Pulmonalkapillardruckes (PCWP) sowie des pulmonal arteriellen Druckes (PAP). Man spricht von einer pulmonalvenösen Hypertonie (PVH) [1].

Demgegenüber stehen die präkapillären Formen, die durch eine isolierte Erhöhung des PAP bei normalem PCWP gekennzeichnet sind. Die Druckerhöhung ist nur auf den arteriellen Schenkel der pulmonalen Strombahn beschränkt. Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) entspricht der Gruppe 1 [1].

Epidemiologischen Studien zufolge beträgt die Prävalenz der PAH bzw. IPAH in der europäischen Bevölkerung 15-50 Fälle bzw. 8-10 Fälle/1 Mio. Einwohner und die jährliche Inzidenz 7,6 bzw. 1,5 Fälle/1 Mio. Einwohner [2]. Die PH stellt somit zwar eine äußerst seltene Erkrankung dar, die unbehandelt jedoch mit einer hohen Letalität verbunden ist. Ohne adäquate Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit bei IPAH-Patienten nach Diagnosestellung 2,8 Jahre mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 34% [3]. Die Mortalität korreliert mit hämodynamischen Parametern wie mittlerer pulmonal arterieller Druck (mPAP), rechtsatrialer Druck (RAP) und Herzzeitvolumen (CO). Diese charakterisierend eine chronische Rechtsherzbelastung, die als Folge der PH zu sehen ist und häufig in einem Rechtsherzversagen terminiert [1].

### 1.1.1 Definition und klinische Symptomatik

Die PH ist definiert als langfristige Erhöhung des mPAP  $\geq 25$  mmHg in Ruhe. Der physiologische Normwert des mPAP beträgt unter Ruhebedingungen  $\leq 20$  mmHg. Werte zwischen 21 mmHg und 25 mmHg werden als PH vom borderline Typ bezeichnet. Bis vor kurzem galt auch ein Anstieg des mPAP  $> 30$  mmHg unter Belastung als Definitionskriterium der PH. Von dieser Einteilung wurde allerdings Abstand genommen, nachdem eine Publikation gezeigt hat, dass der mPAP vor allem bei älteren gesunden Menschen unter Belastung physiologisch deutlich höhere Werte annehmen kann. Aufgrund dieser belastungsabhängigen Variabilität der Messwerte wurde die pulmonale Belastungshypertonie nicht mehr in die Definition mit aufgenommen [1].

Die Einteilung der PH nach hämodynamischen Parametern basiert auf invasiven Messungen mittels Rechtsherzkatheter (RHK) - Untersuchung, die als „Goldstandard“ in der Diagnostik der PH gilt. Der initiale Befund resultiert jedoch aus nicht-invasiven Verfahren (Elektrokardiogramm (EKG), Labor, Lungenfunktionstest (LUFU), Röntgen-Thorax, Echokardiographie 6-min-Gehtest (6MWD)). Speziell die Echokardiographie dient neben der initialen Abklärung der Verdachtsdiagnose PH auch der Verlaufsbeobachtung sowie der Kontrolle des Therapieeffekts. Aufgrund der Empfehlungen der Kölner Konsensus Konferenz spielen Belastungsuntersuchungen (Spiroergometrie, Stressechokardiographie) und Screeningverfahren zum Ausschluss prädisponierender Grunderkrankungen und genetischer Dispositionen eine zunehmend wichtige Rolle im diagnostischen Algorithmus der PH [1].

Die klinischen Symptome der PH sind unspezifisch und können von Belastungsdyspnoe, über rasche Ermüdbarkeit und abnehmende Leistungsfähigkeit, bis hin zu Synkopen und thorakalen Schmerzen reichen. Als Folge einer Rechtsherzinsuffizienz können periphere Ödeme, obere und untere Einflusstauung sowie Aszites auftreten [1].

Der funktionelle Schweregrad der PH basiert auf der Beurteilung der klinischen Symptomatik und wird anhand einer modifizierten NYHA-Klassifikation in vier Stadien eingeteilt (Abb. 1). In Korrelation mit hämodynamischen Parametern lässt sich diese Klassifikation wie folgt erweitern: eine leichte PH ist definiert als mPAP-Werte  $\leq 35$  mmHg bei gleichzeitig guter rechtsventrikulärer Funktion. Bei Werten zwischen 35 und 40 mmHg ist die PH als mittelschwer einzustufen. Eine schwere PH besteht, wenn

bereits eine Rechtsherzinsuffizienz vorliegt und der mPAP  $\geq 40$  mmHg ist [4].

Klasse 1	Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Normale körperliche Belastung führt nicht zu vermehrter Dyspnoe, Müdigkeit oder thorakalen Schmerzen.
Klasse 2	Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit leichter Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Normale körperliche Belastung führt zu vermehrter Dyspnoe, Müdigkeit oder thorakalen Schmerzen.
Klasse 3	Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Bereits leichte Belastung führt zu vermehrter Dyspnoe, Müdigkeit oder thorakalen Schmerzen.
Klasse 4	Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit Unfähigkeit, körperliche Belastung ohne Beschwerden auszuführen. Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz. Beschwerden bereits in Ruhe.

**Abb. 1** Funktioneller Schweregrad der pulmonalen Hypertonie. Nach Evian-Konferenz 1998 [5].

### 1.1.2 Klassifikation

Die World Health Organization (WHO) stellte erstmals 1973 ein Schema zur Klassifikation der PH vor und führte 1998 die Evian Klassifikation ein, die sich vor allem an pathophysiologischen Mechanismen und dem klinischen Erscheinungsbild orientierte. Diese Einteilung wurde 2003 auf der Dritten Weltkonferenz für Pulmonale Hypertonie in Venedig grundlegend geändert. Nach der neuen Klassifikation wird die PAH von anderen Formen der PH abgegrenzt, die als Folge von Linksherzerkrankungen und chronischen Lungenerkrankungen auftreten können. Der Begriff „primäre pulmonale Hypertonie“ (PPH) wurde durch IPAH ersetzt. Als weitere wichtige Veränderung wurden die pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH) und die pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) in einer Untergruppe zusammengefasst [6]. Diese klinische Klassifikation wurde auf der Vierten Weltkonferenz für PH 2008 speziell in Hinsicht auf die neuen Erkenntnisse der PAH überarbeitet [7]. Aktuell beinhaltet die Klassifikation für PH 5 Untergruppen, zu denen man die PAH, die PH assoziiert mit Linksherzerkrankungen bzw. Lungenerkrankungen, die chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) und die PH aus bisher noch ungeklärter bzw. multifaktorieller Genese zählt (Tab. 1).

## 1. Pulmonal arterielle Hypertonie

- Idiopathisch PAH
- Hereditär
  - BMPR2
  - ALK1, Endoglin
  - Unbekannt
- Drogen- und toxininduziert
- Assoziiert mit
  - Bindegewebserkrankungen
  - HIV Infektion
  - Portaler Hypertension
  - Angeborenem Links-Rechts Shunt
  - Schistosomiasis
  - Chronisch hämolytischer Anämie
- Persistierende pulmonale Hypertonie bei Neugeborenen

## 1` Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder Pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)

## 2. Pulmonale Hypertonie assoziiert mit Linksherzerkrankung

- Systolische Dysfunktion
- Diastolische Dysfunktion
- Valvuläre Dysfunktion

## 3. Pulmonale Hypertonie assoziiert mit Lungenerkrankung und/oder Hypoxie

- Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
- Interstitielle Lungenerkrankung (ILD)
- Schlafapnoe-Syndrom
- Langfristiger Aufenthalt in Höhenlagen
- Bronchopulmonale Dysplasie (BPD)
- Entwicklungsanomalien

## 4. Chronisch thromboembolische Hypertonie (CTEPH)

## 5. Pulmonale Hypertonie mit unbekannter und/oder multifaktorieller Genese

- Hämatologisch  
Myeloproliferative Veränderung; Splenektomie
- Systemisch  
Sarkoidose, Histiozytose, Neurofibromatosis
- Metabolisch  
Glykogenspeichererkrankung, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
- Andere  
Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen

**Tab. 1** *Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie.* Die Klassifikation der pulmonalen Hypertonie wurde auf der WHO-Konferenz in Dana Point 2008 zum letzten Mal modifiziert und umfasst fünf verschiedene Gruppen. BMPR2 = Bone morphogenetic receptor 2; ALK1 = Activin receptor-like kinase 1; HIV = Humanes Immundefizienz Virus

### 1.1.3 Pathogenese und Pathophysiologie

Die PH ist eine pathogenetisch multifaktorielle Erkrankung, die durch chronisch proliferative Veränderungen der distalen Pulmonalgefäße und des rechten Ventrikels gekennzeichnet ist. Vasokonstriktion, vaskuläres Remodelling und in-situ-Thrombosen führen zu einer Erhöhung des pulmonal vaskulären Widerstandes (PVR) und somit zu einer vermehrten Rechtsherzbelastung mit Ausbildung eines Cor Pulmonale [8].

Hypoxie, Inflammation und mechanische Belastung können Auslösemechanismen für strukturelle Veränderungen der Gefäßwände sein, die letztlich zu einer Abnahme des Querschnitts und der Elastizität der Gefäße führen. Dieses vaskuläre Remodelling betrifft alle Wandschichten und ist charakterisiert durch Intimaproliferation, Mediahypertrophie und Adventitiaverdickung [8, 9].

Histopathologisches Kennzeichen der PH ist die Ausbildung einer Neointima. Hierbei handelt es sich um eine Schicht von Myofibroblasten und Extrazellulärer Matrix (ECM) zwischen Endothel und Lamina elastica interna, die zu einer verminderten Dehnbarkeit der Gefäßwand führt [8]. Daneben kann es im weiteren Verlauf der PH zur Entstehung sog. plexiformer Läsionen kommen. Diese glomerulusartigen fokalen Läsionen sind von proliferierenden Zelltypen (Endothelzellen, Myofibroblasten, glatten Muskelzellen, Bindegewebsmatrix) ausgekleidet. Sie wachsen irreversibel obliterierend in das Gefäßlumen von präkapillären Arteriolen hinein und erhöhen somit den PVR [10].

Diese unterschiedlichen strukturellen Veränderungen entstehen durch ein Zusammenspiel von ortsständigen und extrapulmonalen Zellen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten). Durch Rekrutierung und Differenzierung dieser Zellen kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Mediatoren [11, 12]. Wachstumsfaktoren, wie Basic fibroblast growth factor (bFGF), Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Platelet derived growth factor (PDGF) und Vascular endothelial growth factor (VEGF), führen zu einer vermehrten Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen [13, 14]. Signifikante Änderungen von Anzahl, Struktur und Funktion dieser Zellen bedingen eine progrediente Obliteration des Gefäßlumens und damit einen Anstieg des PVR. Entzündungsprozesse durch Aktivierung proinflammatorischer Cytokine scheinen vor allem bei der bindegewebsassoziierten Form der PAH (CVD-PAH) eine Rolle im Prozess des vaskulären Remodellings zu spielen [8].

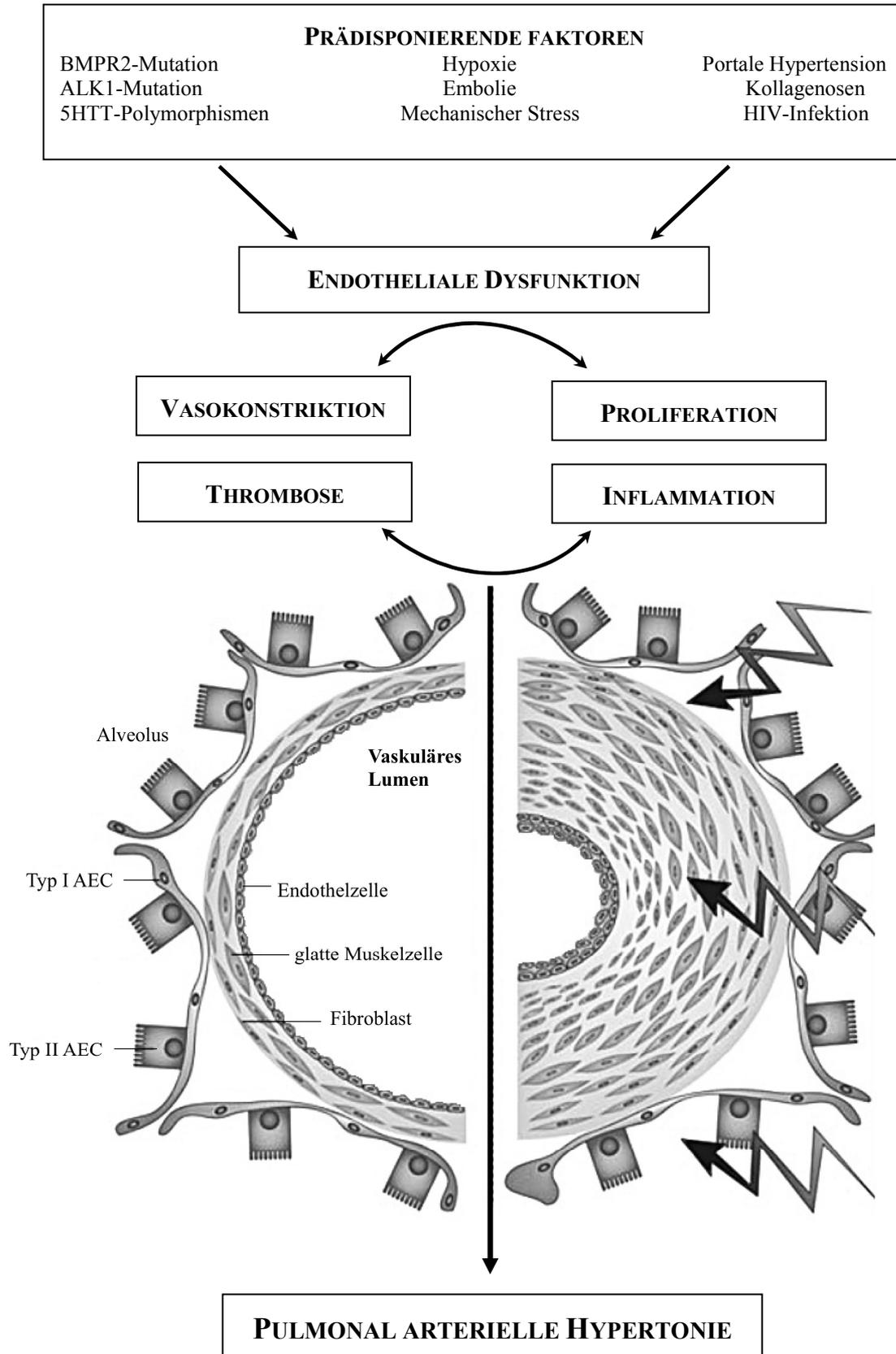
Diese morphologischen und funktionellen Modifikationen des Endothels können zur

Beeinträchtigung seiner metabolischen Funktion und somit zu einem Ungleichgewicht zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Mediatoren führen [8].

Grundsätzlich wird die Regulation des Gefäßtonus durch das pulmonal vaskuläre Endothel moduliert, welches daneben auch Thrombozytenfunktion, Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen sowie die Bildung von ECM steuert. Die Freisetzung relaxierender antiproliferativer Mediatoren wie Prostazyklin und Stickstoffmonoxid (NO) führt zur Hemmung der Thrombozytenaggregation und zu verminderter Produktion von Endothelin-1 (ET-1). Vasokonstriktorisch proliferative Faktoren wie ET-1, Thromboxan, Serotonin sowie Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF $\beta$  stimulieren im Gegensatz dazu das Wachstum von Endothelzellen und glatten Muskelzellen und führen gleichzeitig zu einer vermehrten Kollagensynthese und Plättchenaggregation. Eine Dysfunktion des Endothels führt zum Verlust seiner vasoprotektiven Eigenschaften mit Verschiebung des Gleichgewichts der Mediatoren hin zu vasokonstriktorisches und proliferativen Faktoren. Sie spielt somit eine zentrale Rolle sowohl in der Entstehung als auch in der Progression der pulmonal arteriellen Hypertonie [8, 15](Abb. 2).

Bei der PAH sind neben diesen Triggermechanismen auch genetische Komponenten entscheidend für die Manifestation der Krankheit. Es konnte nachgewiesen werden, dass 70% der hereditären pulmonal arteriellen Hypertonie (HPAH) - und 20% der IPAH-Patienten eine Mutation im Bone Morphogenic Protein Rezeptor-Typ 2 (BMPR2) auf Chromosom 2q31-32 besitzen. Verschiedene Mutationen wie Frameshift, Nonsense – oder De-Novo-Mutationen führen zu einem Funktionsverlust im BMPR2-Gen. Dieses Gen codiert für einen membranösen Rezeptor der TGF $\beta$ - Superfamilie und reguliert somit Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose. Das Fehlen des Gens begünstigt folglich die Entstehung des vaskulären Remodellings und damit verbunden die Entwicklung einer PH [16].

Weitere Gene der TGF $\beta$ - Superfamilie sind activin-like-kinase-1-Gen (ALK1) und Endoglin-Gen (ENG), deren Mutation hauptsächlich mit Formen der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie (HHT) assoziiert ist [16].



**Abb. 2** Pathogenese der pulmonal arteriellen Hypertonie. Schematische Darstellung des vaskulären Remodellings mit potentiellen Einflussfaktoren in der Pathogenese der PAH. BMPR2 = Bone morphogenetic receptor 2; ALK1 = Activin receptor-like kinase 1; 5HTT = Serotonin-Transporter-Gen; AEC = alveoläre Epithelzelle; Modifiziert nach Galie et al. [17] und

Schermuly et al. [18]

#### 1.1.4 Therapiestrategien

Das immer weiter wachsende Verständnis der Pathophysiologie der PH eröffnet neue Therapiestrategien der Behandlung dieser komplexen Erkrankung. Speziell die Imbalance zwischen vasodilatativen (NO, Prostazyklin) und vasokonstriktorisches Substanzen (Thromboxan, ET-1, Serotonin) stellt einen wichtigen Angriffspunkt der gegenwärtigen therapeutischen Interventionen dar [8].

In erster Linie besteht die Basistherapie aus einer konsequenten Antikoagulation, der Gabe von Diuretika bei chronischer Rechtsherzinsuffizienz, frühzeitiger Infektsanierung und ggf. einer Langzeitsauerstofftherapie, da auch Hypoxie ein bedeutender Faktor für die Entstehung einer pulmonalvaskulären Vasokonstriktion ist [1, 3, 19]. Zusätzlich sollen IPAH-Patienten, die zu den sog. „Echten Respondern“ zählen (positive Reaktion auf einen Vasoreagibilitätstest mit Abfall des mPAP unter NO-Gabe um mehr als 10 mmHg unter 40 mmHg), mit hochdosierten Calcium-Antagonisten wie Amlodipin oder Diltiazem behandelt werden [1, 20]. Calciumkanalblocker senken sowohl den pulmonalen als auch den systemischen Gefäßwiderstand und bewirken somit eine klinische und hämodynamische Verbesserung. Langfristig lassen sich allerdings nur weniger als 10% der IPAH-Patienten erfolgreich mit diesem Medikament behandeln [20, 21].

Seit Dana Point 2008 wird erstmals auch ein supervidiertes körperliches Training für PAH Patienten empfohlen, das nachweislich die körperliche Belastbarkeit und Lebensqualität steigert [1, 22].

#### PROSTAZYKLIN

Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>), ein Prostaglandin-Derivat, wird in Endothelzellen gebildet und induziert die Relaxation glatter Muskelzellen durch Stimulation der Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) [23]. PGI<sub>2</sub> ist der stärkste bekannte pulmonale Vasodilatator und hat darüber hinaus starke aggregationshemmende, antiproliferative und antiinflammatorische Eigenschaften, die einen günstigen Effekt auf das vaskuläre Remodelling ausüben [24].

Intravenöses Prostazyklin (Epoprostenol) ist das erste zur Therapie der PAH zugelassene Medikament. Unter Therapie zeigte sich sowohl eine Verbesserung der Hämodynamik als auch eine Erhöhung der Überlebensrate bei Patienten mit Rechtsherzdekompensation [25]. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit besteht allerdings

die Notwendigkeit der intravenösen Dauerapplikation, die zu septischen Katheterinfektionen und Unterbrechung der Therapie durch Verlegung des Katheters führen kann [26]. Deshalb wurde ein stabiles Prostazyklinanalogon (Trepostinil) mit einer Halbwertszeit von drei Stunden zur kontinuierlichen subkutanen Darreichungsform entwickelt. Trotz eines signifikanten Effekts im 6-min Gehstest zugunsten von Trepostinil, konnten nur Patienten, die eine höhere Dosis des Medikaments tolerierten, von der Therapie profitieren [27].

Ein oral verfügbares Prostazyklin (Beraprost), erwies sich in klinischen Studien wenig effektiv und war häufig mit Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen und Übelkeit assoziiert [28].

Weiterhin erfolgte die Entwicklung eines inhalativen Prostazyklins, Iloprost. Es hat den Vorteil durch selektive pulmonale Vasodilatation zu einer deutlichen Verbesserung der Hämodynamik und Ventilations-/Perfusionsverteilung zu führen. Seine relativ kurze Halbwertszeit bedingt jedoch 6-9 Inhalationen täglich [29], weshalb langwirksame aerosolierte Prostazykline (Trepostinil) mit geringerem Nebenwirkungsspektrum etabliert wurden [30]. Der aktuellen Studienlage (FREEDOM-C) zufolge befindet sich nun auch eine orale Form von Trepostinil in der klinischen Testphase, so dass möglicherweise bald drei Darreichungsformen dieses Medikaments auf dem Markt erhältlich sind [31].

#### ENDOTHELIN-REZEPTOR-ANTAGONISTEN

Endothelin-1 (ET-1) ist ein Peptid, das vorwiegend von vaskulären Endothelialzellen produziert wird und aufgrund seiner vasokonstriktorisches und profibrotischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Intimaproliferation und Vasokonstriktion der Pulmonalarterien spielt. Diese Effekte werden durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, ET-A und ET-B, vermittelt. In den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien werden beide Rezeptor-Subtypen konstitutiv exprimiert und vermitteln dort Vasokonstriktion und Zellproliferation. Durch Stimulierung des endothelialen ET-B-Rezeptors, der vasodilatatorisch wirkende Stoffe wie NO und PGI<sub>2</sub> freisetzt, wird die luminal Clearance von ET-1 gefördert [32].

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die ET-1 Konzentrationen bei PH-Patienten, sowohl in der Lunge als auch im Plasma erhöht waren. Demnach gehen erhöhte ET-1 Plasmakonzentrationen mit einer eingeschränkten Hämodynamik und signifikant verminderter Überlebensrate einher [33-35].

Durch die Entwicklung von Endothelinrezeptorantagonisten (ERA) besteht nun die Möglichkeit das Endothelinsystem selektiv zu hemmen. Bosentan, ein oral verfügbarer dualselektiver ET-A- und ET-B- Rezeptorantagonist ist seit 2001 zur Therapie der PAH zugelassen [32]. In der EARLY Studie [36] zeigte sich unter Therapie eine signifikante Verbesserung der Hämodynamik einhergehend mit einer erhöhten klinischen Belastungskapazität sowie verzögerter Krankheitsprogression. Selektive Vertreter der ERA sind Ambrisentan und Sitaxsentan, die seit kurzem auch in Europa zugelassen sind. Klinische Studien in Bezug auf diese beiden Medikamente zeigen eine vergleichbare Wirksamkeit wie Bosentan mit verminderter Hepatotoxizität [32].

#### PHOSPHODIESTERASE-INHIBITOREN

Phosphodiesterasen (PDE) sind zelluläre Enzyme, die für den Abbau zyklischer Monophosphate verantwortlich sind. Die verschiedenen PDE-Isoformen zeigen ein zell- und gewebespezifisches Verteilungsmuster. PDE-5 ist die häufigste PDE-Isoform in der Lunge. Sie metabolisiert ausschließlich cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und ist nachweislich bei PAH überexprimiert. Sildenafil, ein potenter Vasodilatator und spezifischer Inhibitor der PDE-5, ist unter dem Handelsnamen Revatio® zur Behandlung der PAH seit Ende 2005 zugelassen [37]. Klinische Studien und Fallberichte konnten zeigen, dass PDE-5 Inhibitoren hinsichtlich ihrer vasodilatativen Wirkung eine hohe pulmonale Selektivität besitzen und darüber hinaus antiproliferativ wirken [37-39]. Die zulassungsrelevante placebokontrollierte SUPER-1-Studie [40] demonstrierte, dass Sildenafil konzentrationsabhängig zu einer Verbesserung der Leistungsfähigkeit, der klinischen Symptomatik und der hämodynamischen Parameter führte.

Vardenafil und Tadalafil stellen zwei weitere PDE-5 Inhibitoren dar, deren therapeutische Wirkung in der Behandlung der PAH in diversen Studien untersucht worden ist. Beide Substanzen bewirken eine Senkung des PVR, wobei sich Unterschiede hinsichtlich der Selektivität auf die pulmonale Strombahn zeigen [41, 42].

#### SGC-STIMULATOREN

Die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch NO bewirkt die Bildung von cGMP, welches zu einer Vasorelaxation führt. Da die Bioverfügbarkeit von NO bei PAH nur begrenzt ist, stellt die direkte Stimulation der sGC, unabhängig von NO, einen neuen Angriffspunkt in der Therapie der PAH dar [43-45]. In tierexperimentellen Studien führte Riociguat zu einer partiellen Rückbildung der PH, der

Rechtsherzhypertrophie und des pulmonal vaskulären Remodellings. Eine Phase II-Studie bei PAH-Patienten zeigt eine signifikante Verbesserung der Belastungskapazität und der Hämodynamik [45]. Eine aktuelle zulassungsrelevante Phase III-Studie (CHEST bzw. PATENT) soll weitere Erkenntnisse über diese Substanz bringen.

#### TYROSINKINASE-INHIBITOREN

Wachstumsfaktoren wie PDGF üben ihre proliferative und antiapoptotische Wirkung über spezifische Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) aus, die eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen. In den Pulmonalgefäßen von Patienten mit IPAH konnte eine vermehrte Expression von PDGF und PDGF-Rezeptoren nachgewiesen werden [13]. In experimentellen Tiermodellen der PAH konnte unter Therapie mit Imatinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI), eine komplette Reversibilität der PH verzeichnet werden [46]. Mehrere Fallberichte sowie die multizentrische Phase III-Studie IMPRES beweisen die Wirksamkeit von Imatinib und weisen auf herausragende Erfolge bei austerapierten Patienten hin [47-49].

#### SEROTONIN-REZEPTOR-ANTAGONISTEN

Ein weiterer wichtiger Mediator in der Pathogenese der PAH ist Serotonin.

Serotonin gehört zur Gruppe der Monoamine und vermittelt über die Rezeptoren 5-HT<sub>1B</sub> und 5-HT<sub>2A</sub> eine pulmonale Vasokonstriktion. Bei PAH ist insbesondere der 5-HT<sub>2B</sub> - Rezeptor verstärkt exprimiert und bedingt über den Serotonin-Transporter eine vermehrte Zellproliferation, Bildung von Elastase und TGFβ sowie Hyperplasie glatter Muskelzellen [50, 51]. Tergurid, ein Serotonin-Antagonist, zeigte im Tiermodell eine dosisabhängige Verbesserung der Hämodynamik, eine verminderte Rechtsherzhypertrophie und Muskularisierung der pulmonalen Arteriolen [52]. Auf diese Ergebnisse stützend wird gerade eine klinische Phase II- Studie (TERPAH) durchgeführt.

Die derzeit zur Verfügung stehenden Medikamente verbessern zwar als Mono- bzw. Kombinationstherapie die Prognose der PAH, dennoch geht die Diagnose der Erkrankung immer noch mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität und Lebenserwartung einher. Daher sind weitere Investitionen und Studien notwendig, um die Versorgung der Patienten sicherzustellen.

## **1.2 Zirkulierende Fibrozyten**

Im Jahre 1994 beschrieben Bucala et. al [53] fibroblastenähnliche Zellen des peripheren Blutes und bezeichneten diese neue Zellpopulation als „Fibrozyten“. Dabei handelt es sich um eine Leukozyten-Subpopulation, die in Abhängigkeit der lokal exprimierten Chemokine und Adhäsionsmoleküle aus dem Knochenmark in erkranktes Gewebe invadieren und sich dort differenzieren [54]. Durch die Synthese extrazellulärer Matrixproteine tragen Fibrozyten wesentlich zur Pathogenese fibrotischer Veränderungen bei [55-57].

### **1.2.1 Phänotyp**

Fibrozyten sind in ihrer stern- bzw. spindelförmigen Morphologie den Fibroblasten ähnlich und machen 0,5% der zirkulierenden Leukozyten aus. Sie exprimieren neben dem hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 auch den T-Lymphozytenmarker CD43, den Pan-Leukozytenmarker CD45, die Monozytenmarker CD11b und CD14, und sind in der Lage Zytoskelettkomponenten wie Vimentin, Kollagen I/ III und Fibronectin zu produzieren. Chemokin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche ermöglichen Ihnen zusätzlich die Invasion in inflammatorische Gebiete [54, 58, 59].

Lange Zeit galt die Coexpression von CD34 und CD45 mit Kollagen I bzw. Pro-Kollagen I als verlässlicher Marker zirkulierender Fibrozyten [60], bis weiterführende Studien den Nachweis erbrachten, dass auch Makrophagen-Subpopulationen diese Kombination an Oberflächenmarkern aufweisen. Die Expression von identischen Oberflächenproteinen weist darauf hin, dass beiden Zelllinien die gleichen Vorläuferzellen zugrunde liegen. Mittels verschiedener in vitro-Depletionsversuche konnte gezeigt werden, dass humane Fibrozyten aus einer CD11b(+) CD15(+) GR1(+) Subpopulation von CD14<sup>+</sup> peripheren Blut-mononukleären-Zellen (PBMC) hervorgehen. Nach Differenzierung der Vorläuferzellen zu Fibrozyten verlieren diese ihre monozyten-typischen Marker CD14 und CD16 und exprimieren fortan vermehrt Kollagen und  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SMA). Die Kombination aus Kollagenproduktion und Expression von CD45 bzw. anderen hämatopoetischen Stammzellmarkern ist charakteristisch für diese Zellpopulation und grenzt sie von anderen Zelltypen ab [54, 61].

Allerdings bleibt der genaue Ursprung zirkulierender Fibrozyten trotz des wachsenden Interesses an dieser Zellpopulation und intensiver Forschung immer noch ungeklärt.

### **1.2.2 Differenzierung**

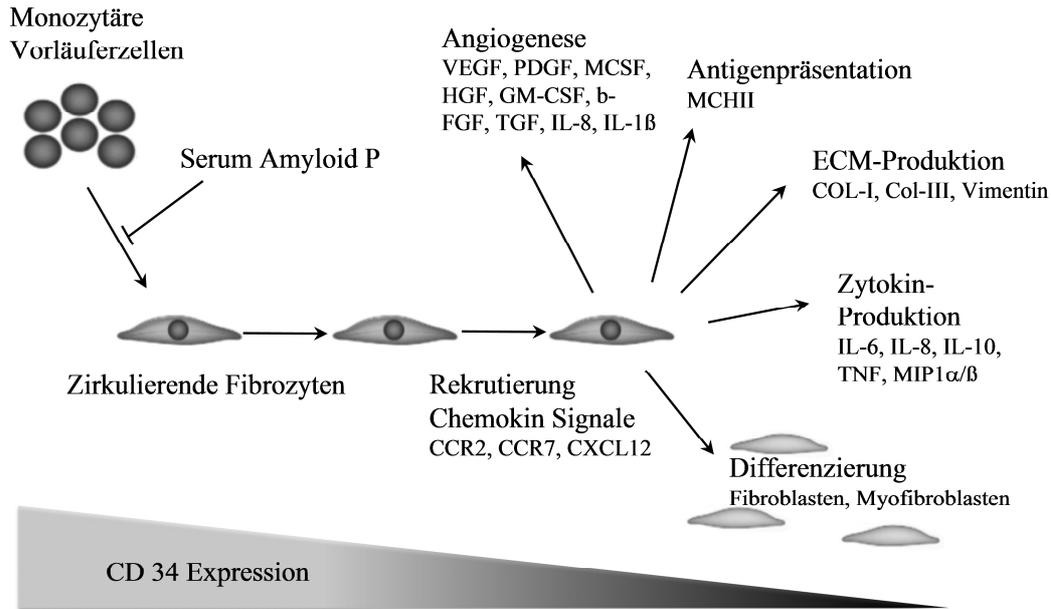
Die Differenzierung von Fibrozyten aus ihren Vorläuferzellen wird durch eine Reihe verschiedener Faktoren gesteuert. Dabei nimmt die Expression von CD34 progredient mit dem Grad der Differenzierung ab (Abb. 3).

TGF- $\beta$ , ein lokaler Wachstumsfaktor, dem eine relevante Rolle bei der Fibrosierung von Geweben zukommt, steigert *in vitro* die Anzahl an Fibrozyten und die Expression von Kollagen I. Darüber hinaus induziert TGF- $\beta$ 1 die Transformation von reifen Fibrozyten zu myofibroblasten-ähnlichen Zellen, die  $\alpha$ -SMA exprimieren und die Fähigkeit besitzen, sich kontrahieren zu können [54].

Serum Amyloid P (SAP) gehört zur Familie der Pentraxine und bindet an Fc-Rezeptoren für Immunglobulin G, die auf CD14+ Vorläuferzellen exprimiert werden. Durch Aktivierung dieser Rezeptoren inhibiert SAP *in vitro* und *in vivo* die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Fibrozyten und hemmt dadurch deren Akkumulation. In einer klinischen Studie mit Patienten mit Sklerodermie- und Mischkollagenosen (MCDT) war der SAP-Serumspiegel in diesem Kollektiv im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich vermindert. Somit ist es denkbar, dass niedrige SAP-Spiegel mit pathologischen Prozessen wie Fibrosierung einhergehen [58, 62].

Daneben ist eine Vielzahl von fibrotischen Veränderungen mit einer T-Helferzelle (TH)-2 gesteuerten Inflammation assoziiert und durch einen Anstieg an profibrotischen Faktoren (Interleukin (IL)-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) charakterisiert [63]. Profibrotische Zytokine begünstigen die Aktivierung und Differenzierung von Fibrozyten aus monozytären Vorläuferzellen und stimulieren somit die Kollagensynthese und Deposition. Eine Proliferation bereits reifer Fibrozyten findet nicht statt. Im Gegensatz dazu inhibieren die von TH1 freigesetzten Zytokine Interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), Tumor Nekrose Faktor (TNF) und IL-12 die Fibrozytengnese [64].

Das Zusammenspiel dieser Zytokine, Chemokine und Plasmaproteine reguliert die Differenzierung der Fibrozyten am Entzündungsort.



**Abb. 3** *Fibrozytendifferenzierung, Migration und Funktion.* Fibrozyten stammen von CD14<sup>+</sup> Vorläuferzellen ab und exprimieren das Oberflächenantigen CD34. Entzündungen und Gewebeschäden führen zur Rekrutierung von zirkulierenden Fibrozyten, die in das betroffene Gebiet invadieren und sich dort weiterdifferenzieren. Dabei nimmt die Expression von CD34 progredient ab.  $\alpha$ -SMA =  $\alpha$ -smooth muscle Aktin; bFGF = basic fibroblast growth factor; TGF- $\beta$  = transforming growth factor  $\beta$ , GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HGF = hepatocyte growth factor; IL = Interleukin; MCSF = macrophage colony-stimulating factor; MCHII = major histocompatibility complex class II; MIP-macrophage inflammatory protein; PDGF = platelet derived growth factor; VEGF = vascular endothelial growth factor. Nach Herzog et.al [63].

### 1.2.3 Rekrutierung

Murine Fibrozyten exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR2, CCR7 und CXCR4. Diese Moleküle vermitteln die Migration von Fibrozyten in inflammatorische oder fibrosierende Areale [65-67]. Humane Fibrozyten tragen die Chemokinrezeptoren CCR3, CCR5 und CCR7 auf ihrer Oberfläche [68]. Die Rekrutierung von Fibrozyten in die Lunge wird durch CXCR4 und seinen Liganden CXCL12 gesteuert. Hohe Spiegel an CXCL12 konnten in der Lunge und im Blut von Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose (IPF) nachgewiesen werden und korrelierten mit der Konzentration zirkulierender Fibrozyten [69, 70]. Zudem scheint der Rezeptor CCR7 eine Rolle für die Migration von Fibrozyten in die Niere zu spielen [67]. Diese Beziehung zwischen Chemokin-Produktion und Fibrozytendifferenzierung und -rekrutierung könnte somit einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung fibrosierender Erkrankungen darstellen.

### **1.2.4 Funktion**

Im klassischen Modell der Wundheilung erfolgt die Wiederherstellung des beschädigten Gewebes direkt nach dem traumatischen Ereignis. Chemokine, die durch Verletzung des Endothels und anderer Zellbestandteile freigesetzt werden, führen zu einer sukzessiven Rekrutierung von Zellen. Nach Invasion in das betroffene Areal können Fibrozyten unter Einfluss von TGF $\beta$  den Phänotyp von Myofibroblasten annehmen [54]. Zudem besitzen Fibrozyten die Fähigkeit, proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-10, Makrophagen inflammatorisches Protein (MIP)-1 $\alpha/\beta$  und Matrix-Metalloproteinasen zu produzieren, die zur Einwanderung von endothelialen Zellen führen (Abb. 3) [71]. Daneben exprimieren Fibrozyten zahlreiche Chemokinrezeptoren und regulieren damit auch die Einwanderung von inflammatorischen Zellen zum Ort der Wundheilung. Durch Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) II kommt ihnen auch eine antigenpräsentierende Funktion während der inflammatorischen Phase zu, die zur Aktivierung von CD4 und CD8 T-Helferzellen führt und sowohl in vivo als auch in vitro Modellen belegt wurde [72]. Durch Sekretion proangiogenetischer Faktoren, wie VEGF, PDGF, Monozytenstimulierender Faktor (M-CSF), Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF), Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (b-FGF), TGF, IL-8 und IL-1 $\beta$ , begünstigen Fibrozyten zusätzlich die Neoangiogenese, einen wichtigen Schritt in der Proliferationsphase des Wundheilungsprozesses [71, 73].

### **1.2.5 Die Rolle zirkulierender Fibrozyten in der Pathogenese verschiedener**

#### **Krankheitsbilder**

##### KELOIDE UND HYPERTROPHE NARBEN

Keloide und hypertrophe Narben sind das Ergebnis einer gestörten Balance zwischen Synthese und Abbau des dermalen Kollagens. Im Gegensatz zu Keloiden sind hypertrophe Narben auf das Gebiet der ursprünglichen Wunde begrenzt. Sie ragen über das normale Hautniveau hinaus und sind durch eine wulstige, erythematöse Verdickung der Haut mit spontaner, oft aber inkompletter Rückbildung charakterisiert. Dieses Narbengewebe weist einen erhöhten TGF $\beta$ - Spiegel, eine große Zahl kollagenproduzierender Zellen und zahlreiche  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten auf. Auch im peripheren Blut von Verbrennungsoffern konnte eine erhöhte Zahl zirkulierender Fibrozyten nachgewiesen werden [74]. Bereits in frühen Studien wurde die Existenz von CD34+ Prolyl-4-Hydroxylase (P4h) + spindelförmigen Zellen

bewiesen. Dabei wurde eine inverse Korrelation zwischen der Expression von CD34 und P4h während der Narbenbildung beobachtet [75]. Dieser Wechsel des Phänotyps ist mit einer vermehrten Kollagen-Synthese verbunden und führt zur Bildung hypertrophen Narbengewebes. Zusätzlich exprimieren diese Zellen Pro-Kollagen und Lymphozytenspezifisches Protein 1 (LSP-1), welches die Chemotaxis der Leukozyten steuert und gleichzeitig einen Fibrozytenmarker darstellt [76]. Ferner ist es möglich, dass Fibrozyten durch Sekretion von TGF $\beta$ 1 die Aktivierung von umliegenden Fibroblasten steuern und damit den Fibrosierungsprozess beschleunigen können.

#### SKLERODERMIE

Die progressive systemische Sklerodermie (PSS) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung und wird dem Formenkreis der Kollagenosen zugeordnet. Sie ist charakterisiert durch eine zunehmende Fibrosierung der Haut mit oder ohne Beteiligung viszeraler Organe. Zugrunde liegt eine Überproduktion von Kollagen, dessen Mechanismus bisher ungeklärt ist, wobei inflammatorische Ereignisse eine Rolle spielen könnten. In klinischen Studien konnte in Hautbiopsaten von Sklerodermie-Patienten keine vermehrte Präsenz von CD34+ P4h+ Fibrozyten nachgewiesen werden [77]. Auch in der Durchflusszytometrie zeigten sich keine erhöhten Werte [78]. Allerdings konnte im Blut von Sklerodermie-Patienten mit Lungenbeteiligung eine erhöhte Konzentration an CD45+ Pro-Col 1+ Fibrozyten detektiert werden, die mit einer vermehrten Produktion von Makrophagen chemotaktischem Protein 1 (MCP-1) einherzugehen schien [79]. Welche Rolle den zirkulierenden Fibrozyten in der Pathogenese der dermalen Manifestation der Sklerodermie zukommt, bleibt dennoch umstritten. Möglicherweise besitzen diese Zellen eine regulatorische Funktion in der Homöostase der Haut. Durch Aktivierung oder Differenzierung könnten sie am progressiven Remodelling beteiligt sein.

#### NEPHROGENE SYSTEMISCHE FIBROSE (NSF)

Die nephrogene systemische Fibrose (NSF) ist eine Erkrankung bei niereninsuffizienten Patienten, die durch eine Fibrosierung von Dermis und viszerale Organen gekennzeichnet ist. Der Einsatz gadoliniumhaltiger Kontrastmittel bei der Magnetresonanztomographie kann bei eingeschränkter Nierenfunktion zu einer Ablagerung des Gadoliniums im Gewebe und zur Auslösung eines Fibrosierungsprozesses führen [80]. In vitro Studien zeigten, dass endogene Mediatoren

wie SAP und IL-12 durch Gadolinium inhibiert werden und somit die Differenzierung der Fibrozyten fördern [81]. In Hautbiopsien von Patienten ließen sich fibroproliferative Prozesse mit intradermaler Akkumulation von CD34+ Pro-Col 1+ Fibrozyten und Faktor-XIII positiven dendritischen Zellen nachweisen [82]. Diese kollagenproduzierenden Zellen finden sich bereits in frühen Stadien der Fibrosierung wieder und gehen mit einer vermehrten Freisetzung von TGF- $\beta$  einher [55, 83]. TGF- $\beta$  wird einerseits von dendritischen Zellen produziert und ist andererseits auch an der Differenzierung von monozytären Vorläuferzellen beteiligt. Möglicherweise entsteht so ein Circulus vitiosus, der zu einer Anhäufung von spindelförmigen Zellen im Gewebe und einem sich selbst unterhaltenden fibrotischen Prozess führt [83].

#### ASTHMA

Asthma bronchiale ist eine chronische Entzündung der Atemwege, die durch eine bronchiale Hyperreagibilität charakterisiert ist. Durch Remodelling der Atemwege kommt es zu einer progressiven Atemwegsobstruktion mit zunehmender Einschränkung der respiratorischen Funktion. Schmidt et al. [84] bewiesen anhand von Bronchialbiopsaten, dass die Atemwege von Asthma-Patienten Fibrozyten aufweisen, charakterisiert durch CD34- und Pro-Col1- Expression. Unter Allergenexposition nimmt die Anzahl dieser Zellen zu und ist mit dem Grad der Fibrosierung assoziiert. Das Zusammenspiel von aktivierten T-Lymphozyten und hohen TGF- $\beta$ -Spiegeln begünstigt dabei die Entwicklung von Fibrozyten aus ihren Vorläuferzellen. Des Weiteren zeigte sich in einem murinen Modell des allergischen Asthmas eine inverse Korrelation zwischen der Expression von CD34 und  $\alpha$ -SMA, sobald die zirkulierenden Fibrozyten in die Lunge migriert waren, was vermuten lässt, dass sich diese Zellen zu Myofibroblasten differenzieren [84]. Weitere Studien konnten CD34+ CD45+  $\alpha$ -SMA+ Fibrozyten in der Bronchiolo-alveolären-Lavage (BAL) Flüssigkeit von Asthma-Patienten nachweisen. In Bronchialbiopsien zeigte sich zudem eine Verdickung der Basalmembran [85]. Weiterführend scheint die Anzahl zirkulierender Fibrozyten auch Auswirkungen auf den Grad der Atemwegsobstruktion zu haben, der durch das forcierte expiratorische Volumen in der 1. Sekunde (FEV1) bestimmt wird. Hierbei ergab sich eine positive Korrelation zwischen erhöhter Zellzahl in Kultur und verminderter FEV1. Zusätzlich waren die TGF- $\beta$ 1-Spiegel bei Patienten mit obstruktiver Komponente erhöht im Gegensatz zu Patienten mit normaler Lungenfunktion [86]. Fibrozyten wurden dabei unabhängig vom Schweregrad des Asthmas nicht nur im peripheren Blut

und in der Lamina propria nachgewiesen, sondern auch in airway-smooth-muscle (ASM)- Bündeln, die vermutlich durch Freisetzung von PDGF die Migration von Fibrozyten regulieren [87].

#### LUNGENFIBROSE

Der Begriff Lungenfibrose beschreibt eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch einen progressiven bindegewebigen Umbau des Lungenparenchyms charakterisiert sind. Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist die am weitesten verbreitete Form mit bisher ungeklärter Ätiologie und schlechtem Therapieerfolg.

Intrapulmonale Fibrozyten wurden in verschiedenen Tiermodellen der Lungenfibrose nachgewiesen [65, 66, 88, 89]. Hashimoto et al. [89] führten eine Knochenmarktransplantation von GFP (grün fluoreszierendes Protein) transgenen Mäusen durch, um den Ursprung kollagenproduzierender Zellen im Modell der bleomycin-induzierten Lungenfibrose nachzuweisen. Dabei zeigte sich, dass ein Großteil dieser Zellen, vermutlich Fibrozyten, aus dem Knochenmark abstammen. Weiterführende Studien deuteten darauf hin, dass der Chemokin-Signalweg CXCR4-CXCL12 eine wichtige Rolle bei der Akkumulation von CD45+ Col 1+ Fibrozyten spielt [65]. Durch Störung dieser Achse könnte der fortschreitende Prozess der Lungenfibrose verhindert werden.

Aktuellen Studien zufolge ist der absolute Anteil zirkulierender Fibrozyten auch bei Patienten mit fibrotischen Erkrankungen erhöht [60, 69]. Moeller et al [60] zeigten, dass der Prozentsatz der CD45+ Col 1+ Fibrozyten im Blut von IPF- Patienten deutlich erhöht war und diese Zellen einen prädiktiven Faktor für den Krankheitsverlauf darzustellen scheinen, da es unter Exazerbation zu einem weiteren Anstieg der Fibrozytenzahl kam. Darüberhinaus exprimierten die Zellen des untersuchten Kollektivs den Chemokinrezeptor CXCR4 und zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine gesteigerte Konzentration des Liganden CXCL12 im Plasma, in der BAL sowie im Lungengewebe. Hierbei korrelierten die Chemokin-Spiegel direkt mit dem Schweregrad der Krankheit [60, 69, 90].

Aufgrund dieser Studienergebnisse wurden Fibrozyten nun als Biomarker für den Krankheitsverlauf der IPF vorgeschlagen [60, 66, 91]. Die Präsenz dieser Zellen scheint ein Anzeichen für fibrotische Gewebsveränderungen zu sein, allerdings nicht für akute Lungenerkrankungen im Allgemeinen, da Patienten mit ARDS (acute respiratory distress syndrom) keine erhöhte Anzahl an zirkulierenden Fibrozyten aufweisen.

Weiterhin konnte bisher kein direkter Zusammenhang zwischen Zellzahl und klinischen Parametern gefunden werden. Dennoch scheint eine hohe Zahl an zirkulierenden Fibrozyten mit einer schlechten Prognose verbunden zu sein [91].

#### PULMONALE HYPERTONIE

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion ist ein elementarer physiologischer Prozess zur Anpassung der lokalen Perfusion an die Ventilation. Unter chronischer Hypoxie, wie sie bei Lungenerkrankungen oder Rechts-Links-Shunts auftritt, führt dieser Mechanismus zu einem pulmonal vaskulären Remodelling, das eine Verdickung der Gefäßwand und damit eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks zur Folge hat [12].

Eine vor kurzem publizierte klinische Studie an jugendlichen PH-Patienten zeigte, dass die Anzahl zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht war. Weiterhin konnte unabhängig vom Therapieregime eine Korrelation zwischen dieser Zellpopulation und der Höhe des mPAPs nachgewiesen werden. Somit ist ein Zusammenhang zwischen der Anzahl rekrutierter Fibrozyten und dem Schweregrad der Erkrankung wahrscheinlich [92].

Aktuelle Studien am hypoxie-induzierten Tiermodell der PH konnten nachweisen, dass zirkulierende Fibrozyten möglicherweise zum strukturellen Gefäßwandumbau beitragen. Unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einer massiven Rekrutierung dieser Zellpopulation in die Adventitia der Pulmonalarterien, einhergehend mit einer erhöhten Anzahl an Fibroblasten in der umgebenden Bindegewebsschicht [93, 94].

Über autokrine und parakrine Signalwege sind Fibrozyten anscheinend in der Lage, die Proliferation anderer Zelltypen, wie glatter Muskelzellen und Endothelzellen, zu begünstigen und die Initiation bzw. Progression des vaskulären Remodellings zu fördern. Durch vermehrtes Zellwachstum und Deposition von ECM in die Pulmonalarterienwand kommt es zu einer konsekutiven Verengung des Lumens verbunden mit einer Erhöhung des vaskulären Widerstands. Ein sich selbst unterhaltender Regelkreis führt hierbei zu einer steten Rekrutierung weiterer extrapulmonaler Zellen [73].

Um diese proliferativen Prozesse zu limitieren wurden Versuchstiere mit Trepostinil, einem Prostazyklinanalogon, das zusätzlich antiproliferativ, antientzündlich und antiaggregatorisch wirkt, behandelt. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten, verbunden mit einer Verminderung des

rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSD) und einer leichten Regression des vaskulären Remodellings [95]. Dieser Effekt könnte entweder auf eine Inhibition proliferativer Signale von Fibrozyten oder auf eine direkte Hemmung ortsständiger Zellen zurückzuführen sein.

Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um diese Ergebnisse zu bestätigen und die zugrunde liegenden zellulären und parakrinen Mechanismen zu verstehen.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Basierend auf den derzeitigen Forschungsergebnissen ist die Pathogenese der PAH noch nicht bis in letzte Detail geklärt. Für die vorliegende Arbeit lässt sich die wesentliche Fragestellung wie folgt formulieren:

- Ist die Pathogenese der pulmonal arteriellen Hypertonie charakterisiert durch eine vermehrte Aktivität zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut?

Um dies im Detail prüfen zu können, ergeben sich weitere Fragestellungen:

- Liegt bei Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine vermehrte Anzahl zirkulierender Fibrozyten vor und findet sich eine erhöhte Expression von Chemokinen und Wachstumsfaktoren?
- Nimmt die Anzahl zirkulierender Fibrozyten im Blut wesentlichen Einfluss auf den Schweregrad der pulmonal arteriellen Hypertonie gemessen an mPAP, PVR und CI?
- Zeigt sich unter Behandlung eine Veränderung in der Anzahl und Aktivität zirkulierender Fibrozyten?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Studienkollektiv**

Das Patientenkollektiv umfasste 54 Patienten, die alle an einer idiopathisch pulmonal arteriellen Hypertonie (IPAH) erkrankt waren und 12 Patienten, die von einer bindegewebsassoziierten Form der pulmonal arteriellen Hypertonie (CVD-PAH) betroffen waren. In Anlehnung an die allgemein gültigen Richtlinien wurde die PAH mit Hilfe von Anamnese und klinischer Untersuchung sowie den Befunden von Echokardiographie, Rechtsherzkatheter, thorakaler Computertomographie und Ventilations-Perfusions-Szintigraphie diagnostiziert. Ausschlusskriterien für die Studie stellten thromboembolische Ereignisse in den letzten 6 Monaten, fibröse Veränderungen des Lungengewebes und Herzvitien dar.

Das Kontrollkollektiv umfasste 20 Patienten mit stark eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion, bei denen echokardiographisch eine pulmonal venöse Hypertonie (PVH) festgestellt wurde. Als gesunde Kontrollgruppe dienten 23 Buffy Coats (leukozytenhaltige Blutspendeprodukte) aus der Blutbank der Universität Giessen.

Alle Patienten gaben nach erfolgter Aufklärung eine schriftliche Zustimmung zu einer Blutentnahme und einer damit verbundenen wissenschaftlichen Analyse der Probe.

## 2.2 Material für molekularbiologische Analyse

### 2.2.1 Chemikalien

Die unten aufgeführten Chemikalien kamen zur Verwendung bei den einzelnen Schritten der Probenaufarbeitung.

<b><i>Produkte</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>
Aceton (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Agarose ROTI® GAROSE	Roth, Karlsruhe
Aqua B. Braun	BRAUN, Melsungen
BSA 10%	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
DPBS (ohne Magnesium, ohne Calcium)	PAN BIOTECH, Aidenbach
Ethidiumbromid 0,025%	Roth, Karlsruhe
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Foetal Bovine Serum (FCS)	PAN BIOTECH, Aidenbach
GIBCO® DMEM (1g/l D-Glucose, Pyruvate, L-Glutamine)	invitrogen, Darmstadt
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33342	invitrogen, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
L-Glutamine (200mM)	PAN BIOTECH, Aidenbach
Methanol (CH <sub>4</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10000 U Penicillin/ml, 10mg Streptomycin/ml)	PAN BIOTECH, Aidenbach
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence	Vector Laboratories, CA
2-Mercaptoethanol	SIGMA, München

**Tab.2** *Chemikalien*

### 2.2.2 Pufferlösungen, Reaktionsansätze und Zellmedium

Für die Isolation der zirkulierenden Fibrozyten und die anschließende molekularbiologische Analyse mittels qRT-PCR wurden folgende Puffer und Reaktionsansätze verwendet.

<i><b>Puffer</b></i>	<i><b>Zusammensetzung</b></i>	<i><b>Hersteller</b></i>
PBS 10x	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 900 ml Aqua dest. ad pH 7,4 Aqua dest. ad 1000 ml	
PBS 1x	100 ml PBS 10x 900 ml Aqua dest.	
Agarosegelpuffer (1%)	150 ml TAE-Puffer 1,5 g Agarose ROTI® GAROSE Ethidiumbromid	
TAE-Puffer 50x	242 g Tris-Base 50 ml Essigsäure 100 ml EDTA ad pH 8 Aqua dest. ad 1000 ml	
RT-PCR	2 µl 10x PCR Buffer II, ohne MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems
Reaktionsansatz 1x	4 µl 25mM MgCl <sub>2</sub> Solution	Applied Biosystems
	1 µl dNTP Mix	Applied Biosystems
	1 µl 50µM Random Hexamers	Applied Biosystems
	0,5 µl RNase Inhibitor	Applied Biosystems
	1 µl MuLV Reverse Transkriptase	Applied Biosystems
	0,5 µl Aqua dest.	Applied Biosystems
qRT-PCR	12,5 µl iQ™ SYBR® Green Supermix	BIORAD, München
Reaktionsansatz 1x	9,5 µl Aqua bidest	
	1 µl Primerpaare	Eurofins

FCS-Medium (20%)	490 ml DMEM
	100 ml FCS
	5 ml L-Glutamine
	5 ml Penicillin/Streptomycin

**Tab. 3** *Pufferlösungen, Reaktionsansätze und Zellmedium*

### 2.2.3 Antikörper, Enzyme und Markerproteine

Folgende Antikörper, Enzyme und Markerproteine wurden eingesetzt.

<b><i>Produkte</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>
normal mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG(H+L)	invitrogen, Darmstadt
Monoclonal Anti-Vimentin-Cy3, antibody produced in mouse	SIGMA, München
Gel Loading Dye Blue (6x)	Bio Labs, New England
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

**Tab. 4** *Antikörper, Enzyme und Markerproteine*

### 2.2.4 RNA- und ELISA-Kits

Für die RNA-Isolation und den Nachweis spezifischer Faktoren mittels ELISA wurden folgende gebrauchsfertige Kits verwendet.

<b><i>Produkte</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>
Rneasy® Plus Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Quantikine® Human CXCL12/SDF-1alpha	R&D Systems
Quantikine® Human PDGF-BB	R&D Systems
Quantikine® Human TGF-β2	R&D Systems
Quantikine® Human VEGF	R&D Systems

**Tab. 5** *Gebrauchsfertige Kits*

### 2.2.5 Geräte

Folgende Geräte kamen bei den einzelnen molekularbiologischen Methoden zum Einsatz.

---

<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
Brutschrank	Hera Cell, Heraeus
CFX96 Real-Time PCR Detection System	BIO-RAD, München
Eppendorf Mastercycler ep Gradient S	Eppendorf, Wesseling
Fluoreszenzmikroskop	Leica, DMLA
Gel IX Imager	Intas, Göttingen
Mikroliterzentrifuge MIKRO 220R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Rotina 46R, Hettich

---

**Tab. 6** *Geräte*

## 2.3 Methodik

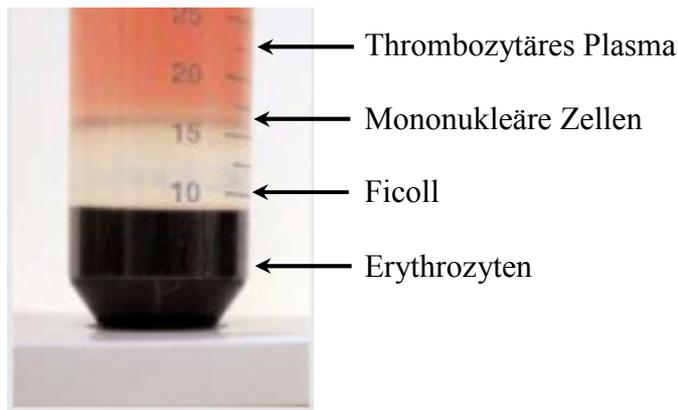
### 2.3.1 Isolierung zirkulierender Fibrozyten

Humane zirkulierende Fibrozyten wurden aus EDTA-antikoaguliertem venösen Blut von ausgewählten Spendern in Anlehnung an die Methode von Quan und Bucala [53, 96] durch Dichtezentrifugation über einen Ficoll-Gradienten gewonnen.

Die Zellisolation wurde standardmäßig unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

Das periphere Blut wurde zunächst 1:1 mit DMEM verdünnt. 20 ml dieses Gemisches wurden vorsichtig mit einer sterilen Pipette (BD Falcon) auf 15 ml Ficoll-Lösung, die zuvor in ein 50 ml fassendes steriles Propylene-Röhrchen (BD Falcon) vorgelegt wurde, aufgeschichtet.

Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 20 Minuten bei 23°C, 1800 Umdrehungen, ohne Bremse. Durch diese Zentrifugation über den Ficoll-Gradienten wird eine Auftrennung in thrombozytenreiches Plasma, mononukleäre Zellen (Fibrozyten, Mono- und Lymphozyten) und Granulo- /Erythrozyten bewirkt.



**Abb. 4** Ficoll- Gradient nach Zentrifugation

Nach Absaugen des thrombozytenreichen Plasmas erfolgte die Separation der mononukleären Zellen. Diese wurden vorsichtig abpipettiert und zusammen mit 20 ml DMEM für 20 Minuten bei 23°C, 1800 Umdrehungen, mit Bremse in einem neuen Röhrchen zentrifugiert. Danach folgten zwei Waschschrte (5 Minuten, 23°C, 1800 Umdrehung) mit DMEM. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet mit 4 ml FCS-Medium resuspendiert.

### 2.3.2 Kultivierung der zirkulierenden Fibrozyten

Die Quantifizierung der zirkulierenden Fibrozyten erfolgte durch lichtmikroskopische Zählung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellen wurden in Culture Slides ( $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Kammer) und 6 Well Gewebekulturplatten ( $10 \times 10^6$  Zellen pro Kammer) für 7 Tage in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Die Nährlösung DMEM, der 20% fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurde, enthielt zusätzlich 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamine. Nach 3 Tagen erfolgte ein Wechsel des Mediums, wobei der Zellverlust regelmäßig dokumentiert wurde.

### 2.3.3 Färben der zirkulierenden Fibrozyten

Nach Fixierung der Fibrozyten in Azetonmethanol bei RT für 7 Minuten und Waschen in phosphatpufferter Salzlösung (PBS 1x) wurde 20% iges Rinderalbumin (BSA) für 30 Minuten zugegeben, um eine unspezifische Bindung der Antikörper auf der Oberflächenmembran der Fibrozyten zu verhindern. Nach einem weiteren Waschschrte mit PBS erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers, normal mouse IgG (1:1000), der als negative Kontrolle diente. Die Inkubation fand lichtgeschützt für 45 Minuten bei RT

statt. Anschließend wurden die Objektträger zweimal gewaschen und der Sekundärantikörper für 45 Minuten aufgetragen. Hierzu wurde der Cy3-konjugierte anti-Vimentin Antikörper (1:1000), zur Darstellung der Zytoskelettproteine, und Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:1000), als Negativkontrolle, verwendet. Nach nochmaligem Waschen wurde der Objektträger mit Hoechst 33342 (1:1000) für 10 min gegengefärbt, um die Strukturen des Zellkerns fluoreszenz-mikroskopisch sichtbar zu machen. Abschließend wurden die Culture Slides gewaschen, die Kammern abgezogen und ein Einbettmedium (Vectashield Mounting Medium) zugegeben.

Danach erfolgte die Auswertung der Ergebnisse per Fluoreszenzmikroskopie.

#### **2.3.4 RNA-Isolation**

Nach einer Inkubationsdauer von 7 Tagen in 6-Well Gewebekulturplatten wurden aus den adhärennten Fibrozyten mit Hilfe des RNeasy-Kits (QIAGEN) gesamt-RNA gewonnen. Nach der Zellyse wurden die Proben zunächst in einer QIAShredder-Säule homogenisiert. Durch einen stark denaturierenden, guanidinisothiocyanat-haltigen Puffer wurden RNAsen effizient inaktiviert, um eine Isolierung intakter RNA zu gewährleisten. Durch Zugabe von Ethanol wurden optimale Bedingungen hergestellt, sodass die Gesamt-RNA spezifisch an die Silicagel-Membran binden konnte, während übrige Substanzen wie DNA und Proteine ausgewaschen wurden. Zum Schluss wurde die reine RNA mit 30 µL RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

Die Konzentration von 1 µl der präparierten RNA wurde anschließend in einem Einstrahl-Spektralphotometer über dessen optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Verwendung einer Quarzküvette gegen eine nukleinsäurefreie Pufferlösung bestimmt.

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten RNA wurde ein Absorptionsspektrum bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) und 280 nm (OD<sub>280</sub>) gemessen. In der vorliegenden Arbeit sollte der Absorptionsquotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> mehr als 1,6 betragen. Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Salzurückständen, die beim Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA) und bei Realtime-PCRs zu Ungenauigkeiten führen, werden durch einen kleineren Absorptionsquotienten angezeigt.

### **2.3.5 Reverse Transkription**

Als Template für Polymerasekettenreaktionen (PCR) dienen komplementäre DNA (cDNA), weshalb die Ribonukleinsäuren zuerst in cDNA-Sequenzen umgeschrieben werden mussten.

Dazu wurde die mRNA für 15 Minuten bei 70°C denaturiert. Für die anschließende cDNA-Synthese wurde eine reverse Transkriptase (rT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die z.B. aus Moloney- Murine-Leukemia Virus (M-MLV) isoliert werden kann, verwendet. Als Primer wurden Random Hexamer-Oligonukleotide eingesetzt. Dieser rt-Reaktionsansatz (s.Tab. 3) wurde für eine Stunde bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Bis zur Durchführung der Realtime-PCR (qRT-PCR) wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

### **2.3.6 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)**

#### 2.3.6.1 Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine effiziente Methode zur selektiven Vermehrung von polymeren Desoxyribonukleinsäuren. Man geht von einem doppelsträngigen Stück DNA aus, das die gesuchte Sequenz enthält und als Matrize dient. Der Doppelstrang wird durch Hitze denaturiert. Die entstehenden Einzelstränge werden mit zwei kurzen Oligonukleotiden, die als Starter bzw. Primer der DNA-Synthese dienen und die gesuchte Sequenz einrahmen, hybridisiert und durch eine DNA-Polymerase verlängert. Ein entsprechender Reaktionspuffer und Magnesium sorgen für optimale Reaktionsbedingungen während der Elongation. Die einzelnen Reaktionsschritte laufen bei unterschiedlichen Temperaturen ab. Die Trennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge erfolgt durch Erhitzen auf 95°C (10sec). Nachfolgendes Abkühlen auf circa 59°C (10sec) ermöglicht die Hybridisierung der Primer mit den komplementären DNA-Sequenzen. In Gegenwart der hitzestabilen Taq-Polymerase kommt es bei 72°C (15sec) zur Polymerisationsreaktion, der eigentlichen Verlängerung der hybridisierten Primer in 5'-3' Richtung.

Mehrfaches Wiederholen der Schritte (40x) Denaturierung, Hybridisierung und Elongation führt zu einer exponentiellen Vermehrung der Sequenz.

#### 2.3.6.2 Prinzip der qRT-PCR

Bei der quantitativen Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wird die Produktakkumulation in Echtzeit verfolgt, um die exponentielle Phase der Reaktion zu

identifizieren und für eine Quantifizierung der Templatemenge zu nutzen.

Hierzu interkalieren während des Annealing-Schrittes nicht nur sequenzspezifische Primer mit der DNA- Zielsequenz, sondern auch Fluoreszenzsonden z.B. SYBR Green. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet sensitiv an die dsDNA und steigert somit seine Fluoreszenzintensität um den Faktor 1000. Somit wird eine lineare Abhängigkeit erreicht. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz am Ende einer Elongation ist dabei direkt proportional zur Menge der neu gebildeten Target DNA-Stränge.

### 2.3.6.3 Primer

Die verwendeten PCR-Primer-Oligonukleotide (s. Tab. 7) wurden von dem Hersteller Eurofins MWG Operon, Ebersberg synthetisiert und ausgehend von den entsprechenden cDNA-Sequenzen unter Einhaltung folgender Kriterien computergestützt ausgewählt:

- Länge (18-22 Basen)
- hoher GC-Gehalt
- keine repetitiven Sequenzen
- keine palindromen Sequenzmotive innerhalb der Primer-Oligonukleotide
- paarweise vergleichbare  $T_M$ -Werte ( $55 \pm 0.5$  °C)
- amplifiziertes PCR-Produkt mit einer Länge von 100-200 Bp

Die Primer zur Amplifikation von cDNA sollten paarweise mindestens in verschiedenen Exonen des betreffenden Gens lokalisiert sein, damit ein fälschlicherweise direkt aus genomischer DNA amplifiziertes Fragment anhand seiner größeren Länge identifiziert werden kann.

Die genspezifischen Oligonukleotide wurden mittels BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf ihre Spezifität hin geprüft.

<i>Zielsequenz</i>	<i>Genbank</i>	<i>Bezeichnung/Genprodukt</i>
COL1A1	Z74615	collagen, type I, alpha 1
GAPDH	AF261085	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
P4HB	J02783	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
PBGD	X04808	hydroxymethylbilane synthase
TGF- $\beta$ 1	X02812	transforming growth factor, beta 1
VEGFA	AB021221	vascular endothelial growth factor A

**Tab. 7** Zielsequenzen im humanen Genom. Die Genbank-Einträge bezeichnen die Zugriffsnummern zu den Datenbankeinträgen (Accession Number) der Sequenzen in der Gen-Datenbank „Nucleotide“ des National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))

<i>Primer</i>	<i>Amplikonlänge</i>	<i>Position</i>	<i>Sequenz</i>
COL1A1	127	128 sense	5'-TG TTCAGCTTTGTGGACCTC-3'
		254 asense	5'-TTCTGTACGCAGGTGATTGG-3'
GAPDH	87	85 sense	5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'
		171 asense	5'-AAAAGCAGCCCTGGTGACC-3'
P4HB	115	760 sense	5'-CCAACAGTGACGTGTTCTCC-3'
		874 asense	5'-AGCAGGTTCTCCTTGGTGAC-3'
PBGD	70	159 sense	5'-CCCACGCGAATCACTCTCAT-3'
		228 asense	5'-TGTCTGGTAACGGCAATGCG-3'
TGF- $\beta$ 1	132	1160 sense	5'-AGCCTGAGGCCGACTACTAC-3'
		1291 asense	5'-CTCGCAGCTCTGATGTGTTG-3'
VEGFA	176	1025 sense	5'-CGAAACCATGAACTTTCTGC-3'
		1200 asense	5'-TCTCGATTGGATGGCAGTAG-3'

**Tab. 8** Primersequenzen

#### 2.3.6.4 Amplifikation

Die qRT-PCR-Reaktion wurde als Doppelbestimmung jeder Probe in einem jeweiligen Gesamt-Volumen von 25  $\mu$ l durchgeführt, wobei jede Einzelprobe 2  $\mu$ l des Proben-Ansatzes und 23  $\mu$ l des rt-PCR-Reaktionsansatzes (s. Tab. 3) enthielt. Entsprechend den spezifischen Reaktionsbedingungen der Oligonukleotid-Primer wurde der Real-Time PCR Thermocycler programmiert und gestartet.

#### 2.3.6.5 Schmelzkurvenanalyse

Ein Nachteil der qRT-PCR ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Aus diesem Grund wurde im Anschluss an die Amplifikation einer zu analysierenden Zielsequenz eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Schmelzkurven werden aufgezeichnet, indem während eines langsamen Temperaturanstiegs die Fluoreszenzintensität der Reaktionsansätze kontinuierlich gemessen wird.

Bei Verwendung des Sondensystem SYBR Green wird die Schmelztemperatur des PCR-Produktes ermittelt und zeigt sich in den gemessenen Signalkurven als ein lokales Maximum in der Abnahme der Intensität. Zur besseren Identifizierbarkeit der maximalen Intensitätsänderungen werden die Schmelzkurven als Peakkurven dargestellt. Bei den Peakkurven handelt es sich um die negative erste Ableitung der Schmelzkurven nach der Temperatur. Die Lage der Peakmaxima entspricht der Schmelztemperatur des Produkts. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Detektion von Polymorphismen möglich.

#### 2.3.6.6 Ct-Wert

Für die Auswertung eines Amplifikationsplots wird in die exponentielle Phase der PCR der Schwellenwert (Threshold) gelegt, der den Bereich anzeigt, in dem die PCR noch nicht linear (Plateauphase) verläuft. Die Basislinie kennzeichnet die Restfluoreszenz der Sonden. Der Schnittpunkt mit der Fluoreszenzkurve liefert einen Ct-Wert (engl. Cycle-Threshold), der als Zykluswert definiert ist, bei welchen zum ersten Mal ein Anstieg des Fluoreszenzsignals erfasst wird, d.h. der Schwellenwert von der Signalkurve überschritten wird. Dieser Ct-Wert ist ein Maß für die anfängliche DNA Probenmenge.

Von jeder cDNA-Probe wurde eine simultane Amplifikation von P4HB, COL1A1, VEGF, TGF- $\beta$ 1 und der Housekeeping-Gene PBGD und GAPDH durchgeführt, so dass die erhaltenen Ct-Werte beider PCR- Reaktionen miteinander verrechnet werden konnten. Dafür wurde der sogenannte delta Ct-Wert ( $\Delta$ Ct) nach folgender Formel bestimmt:  $\Delta$ Ct = Ct (Zielgen) – Ct (Referenzgen)

Unter der Bedingung, dass die PCR-Reaktion mit 100%iger Effizienz abläuft, sich also die Amplifikationsprodukte exponentiell vermehren, kann die cDNA-Menge

der zu untersuchenden Gene relativ zur Menge der konstant exprimierten Housekeeping-Gene quantifiziert werden.

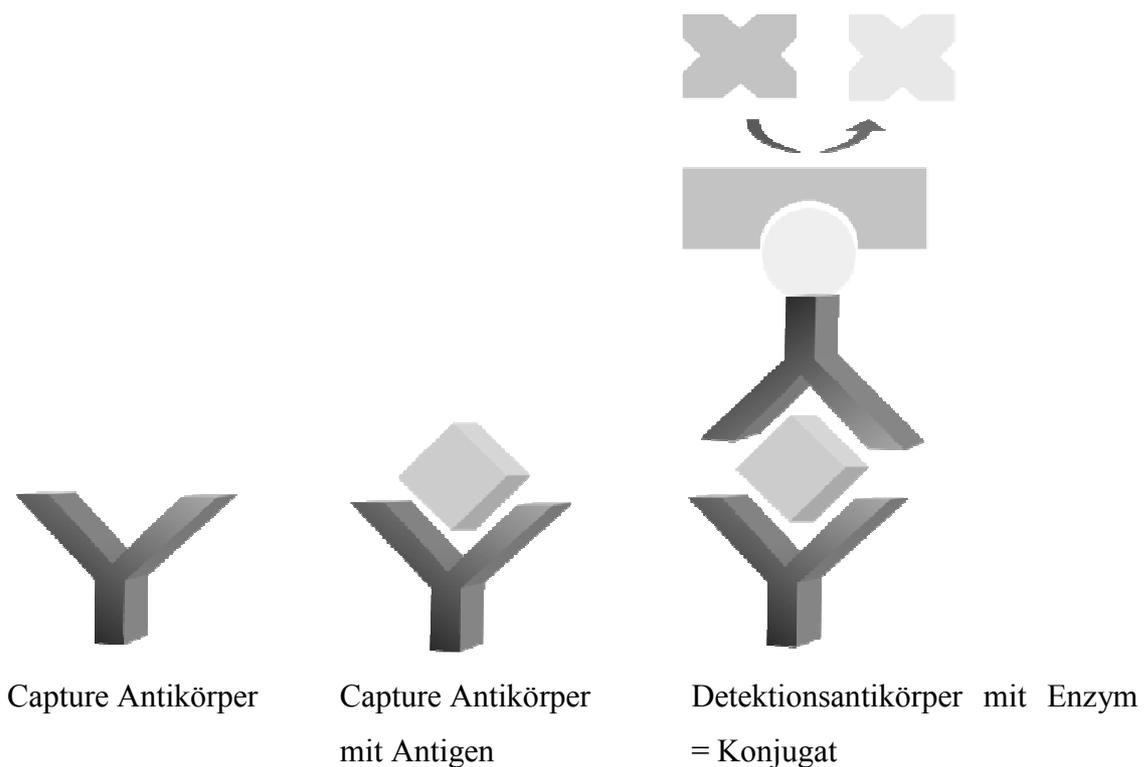
### **2.3.7. Agarosegelelektrophorese**

Zur Analyse der RT-PCR Produkte wurden 1% ige TAE-Agarosegele (s.Tab. 3) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für ca. 45 Minuten bei einer Spannung von 120 V. Danach wurden die erhaltenen Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert (Gel IX Imager, Intas). Durch den Einsatz intronspannender Primer konnte eine genomische DNA Kontamination durch längere PCR Amplifikate in der Gelelektrophorese kenntlich gemacht werden.

### **2.3.8 Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)**

#### **2.3.8.1 Prinzip des ELISA**

Die ELISA-Technik (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zählt zu den am weitest verbreiteten biochemischen Methoden. Bei dieser Technik kann eine Antigen-Antikörper Wechselwirkung mit einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen werden. Allen verwendeten ELISA (PDGF-BB, SDF-1 $\alpha$ , TGF $\beta$ 2 und VEGF) liegt das Prinzip der quantitativen Sandwich Enzyme Immunoassay Technik zugrunde (Abb. 5). Als Proben wurden nur Zellüberstände der Gewebekulturplatten verwendet. Die Messungen wurden im Doppelansatz mit Standardproben durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die Oberfläche einer 96-Well Mikrotiterplatte mit einem monoklonalen Antikörper (Capture Antikörper), der spezifisch für das jeweilige Zytokin ist, vorbeschichtet. Nach Zugabe der Proben binden die betreffenden Antigene an die immobilisierten Antikörper. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte gewaschen, um ungebundene Substanzen zu entfernen. In einem nächsten Schritt wird ein enzymgekoppelter polyklonaler Antikörper (Detektionsantikörper), der wiederum spezifisch ist, zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein Detektionsantikörper, der an ein fluoreszierendes Enzym gekoppelt ist, zugefügt und bindet an das Antigen. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich-Komplex). Durch Zugabe eines chromogenen Substrats, das von dem gekoppelten Enzym umgesetzt wird, kann das Antigen schließlich anhand der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Die emittierte Intensität ist proportional zur Konzentration der untersuchten Probe und wurde mit einem ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.



**Abb. 5** *Prinzip des Sandwich-ELISA.* Die Mikrotiterplatte wird mit einem immobilisierten Antikörper beschichtet, der spezifisch an ein Antigen bindet. Der Detektionsantikörper wird zugegeben und bindet an das Antigen. Der Nachweis dieses Antigens erfolgt durch Zugabe eines chromogenen Substrats, das von dem gekoppelten Enzym umgesetzt wird.

#### 2.3.8.2 Zytokine

Folgende Zytokine wurden mit den ELISA-Kits nachgewiesen. Es wurden nur ELISA für humane Proben verwendet.

<i>Zytokin</i>	<i>Bezeichnung</i>
PDGF-BB	platelet-derived growth factor BB
CXCL12 $\alpha$ / SDF-1 $\alpha$	stromal cell-derived factor-1 alpha
TGF- $\beta$ 2	transforming growth factor beta 2
VEGF	vascular endothelial growth factor

**Tab. 9** *Zytokine*

#### 2.3.8.2.3 Auswertung des ELISA

Mit Hilfe einer entsprechenden PC-Software konnten die Mittelwerte für die Messwerte der Doppelbestimmungen gebildet werden. Für die Berechnung der Testergebnisse wurde anhand der Standards mit dem 4-Parameter logistic-log-Modell (4PL) eine Eichkurve mit linearer Regression erstellt und damit die Konzentrationen der Probenlösungen in ng/ml ermittelt.

### **2.4 Statistische Analyse**

Die erhobenen Daten sind als Median und Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Kollektiven wurden durch einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) und Tukey Post-Hoc Test für multiple Vergleiche ermittelt. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden Box-Whisker-Plot und Scatterplot Diagramme verwendet. Box-Whisker-Plot Diagramme stellen 50% der Messwerte in der sog. „Box“, die durch das 25%- und 75%- Quantil begrenzt ist, dar. Dabei kann an der Länge der Box die Streuung der Messwerte abgeschätzt werden, welche sich um den Medianwert lagern, der als horizontale Linie in der Box eingezeichnet ist. Whiskers als vertikale Linien ober- und unterhalb der Boxen kennzeichnen den 1,5 fachen Interquartilsabstand. Alle Werte außerhalb der Whiskers werden als Ausreißer bzw. Extremwerte bezeichnet und mit einem Punkt markiert.

Scatterplot Diagramme dienen der graphischen Veranschaulichung der Verteilung zweier quantitativer Merkmale. Jedes Paar von Messwerten wird durch einen Punkt im Koordinatensystem dargestellt. Anhand der Punktwolke lässt sich erkennen, ob ein Zusammenhang zwischen den abgebildeten Merkmalen besteht und welcher Art dieser Zusammenhang ist.

### 3. Resultate

#### 3.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Das Patientenkollektiv umfasste 54 Patienten, die an einer idiopathisch pulmonal arteriellen Hypertonie (IPAH) erkrankt waren und 12 Patienten, die von einer bindegewebsassoziierten Form der pulmonal arteriellen Hypertonie (CVD-PAH) betroffen waren. Davon erhielten 16 Patienten keine Therapie, 17 Patienten eine Monotherapie mit Sildenafil, 5 Patienten eine Monotherapie mit Bosentan, 2 Patienten das Studienmedikament Terguride und 26 Patienten eine Kombi-Therapie.

Die Geschlechtsverteilung ergab 37 weibliche und 17 männliche IPAH-Patienten mit einem Durchschnittsalter von  $49 \pm 15$  Jahren. Das Kollektiv der CVD-PAH setzte sich nur aus weiblichen Teilnehmerinnen zusammen mit einer durchschnittlichen Altersverteilung von  $64 \pm 5$  Jahren.

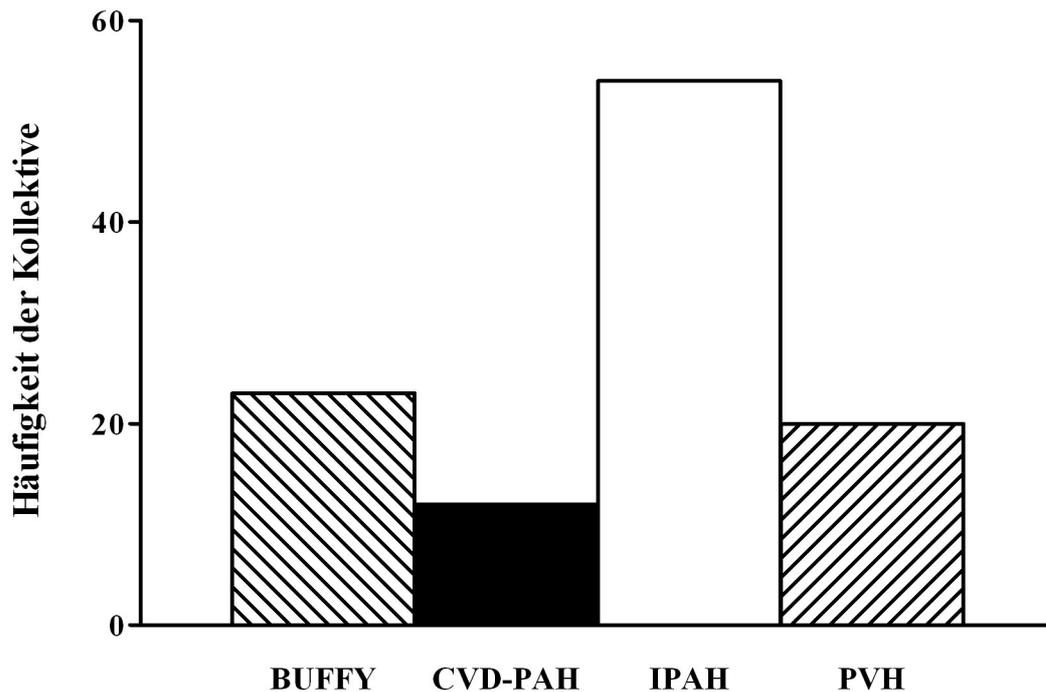
Bei allen Patienten wurde gemäß der Leitlinien eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung durchgeführt. Diese ergab im Durchschnitt folgende Messwerte:

	CI	PVR	mPAP	SvO2	CVP
	[ l/min/m <sup>2</sup> ]	[ dyn * sec * cm <sup>-5</sup> ]	[ mmHg]	[%]	[ mmHg]
IPAH	$2,2 \pm 0,7$	$1008 \pm 605$	$50 \pm 15$	$63,9 \pm 10,4$	$7 \pm 4$
CVD-PAH	$2,9 \pm 0,5$	$725 \pm 552$	$40 \pm 14$	$67,8 \pm 5,4$	$5 \pm 4$

**Tab. 10** Messwerte der Rechtsherzkatheter-Untersuchung.

IPAH: idiopathisch pulmonal arterielle Hypertonie; CVD-PAH: Bindegewebsassoziierte PAH;  
 CI: Herzindex; PVR: pulmonaler Gefäßwiderstand; mPAP: mittlerer pulmonalarterieller Druck; SvO2: pulmonalarterielle (gemischtvenöse) Sauerstoffsättigung; CVP: zentraler Venendruck;

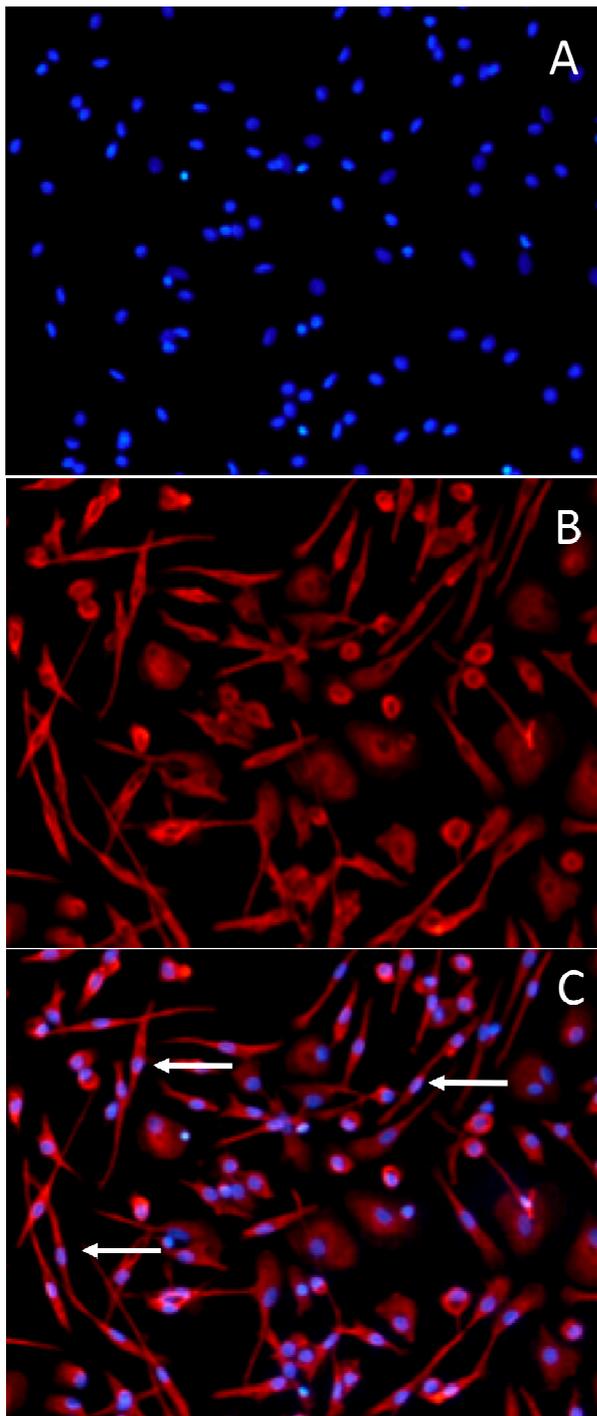
Von prognostischer Bedeutung ist außerdem der 6-Minuten Gehstest (6MWD), der bei den IPAH-Patienten durchschnittlich  $374 \pm 117$  m und bei den CVD-PAH Patienten  $324 \pm 90$  m betrug. Das Kontrollkollektiv umfasste 20 Patienten mit stark eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion ( $EF < 30\%$ ), bei denen echokardiografisch ein  $sPAP > 35$  mmHg ermittelt wurde und somit die Diagnose pulmonal venöse Hypertonie (PVH) gestellt werden konnte. Das Durchschnittsalter dieser Patientengruppe betrug  $66 \pm 12$  Jahre mit einem Geschlechtsverhältnis männlich zu weiblich von 9:1. Als gesunde Kontrollgruppe dienten 23 Buffy Coats aus der Blutbank der Universität Giessen.



**Abb. 6** Histogramm. Absolute Häufigkeitsverteilung des Studienkollektivs.

### 3.2 Ergebnisse der quantitativen Analyse zirkulierender Fibrozyten

Die genaue Pathogenese der PAH ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Um neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet zu erlangen, wurden humane zirkulierende Fibrozyten aus peripherem Blut von ausgewählten Spendern isoliert, um eine mögliche Beteiligung dieser Zellen am Entstehungsprozess der pulmonalen Hypertonie nachzuweisen. Nach Isolation der zirkulierenden Fibrozyten wurden diese für 7 Tage in DMEM-Medium mit 20 % hitze-inaktiviertem FCS kultiviert. Unter Standardbedingungen kam es zum Auswachsen stern- bzw. spindelförmiger Zellen, die morphologisch dem Bild von Fibrozyten entsprachen (Abb. 7).



**Abb. 7** Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen zirkulierender Fibrozyten nach 7 Tagen Kultur (100 x Vergrößerung) Man erkennt die zirkulierenden Fibrozyten an ihrem spindelförmigen Erscheinungsbild (→). A: Kernfärbung: Hoechst 33342 (blau) B: Zytoskelettfärbung: Cy3 konjugierter anti-Vimentin-Antikörper (rot) C: Kombination von A und B.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte die Quantifizierung der Fibrozyten pro Gesichtsfeld, indem die spindelförmigen Zellen von vier Gesichtsfeldern pro Zellkulturansatz ausgezählt wurden. Zusätzlich wurde auch die Anzahl aller adhären

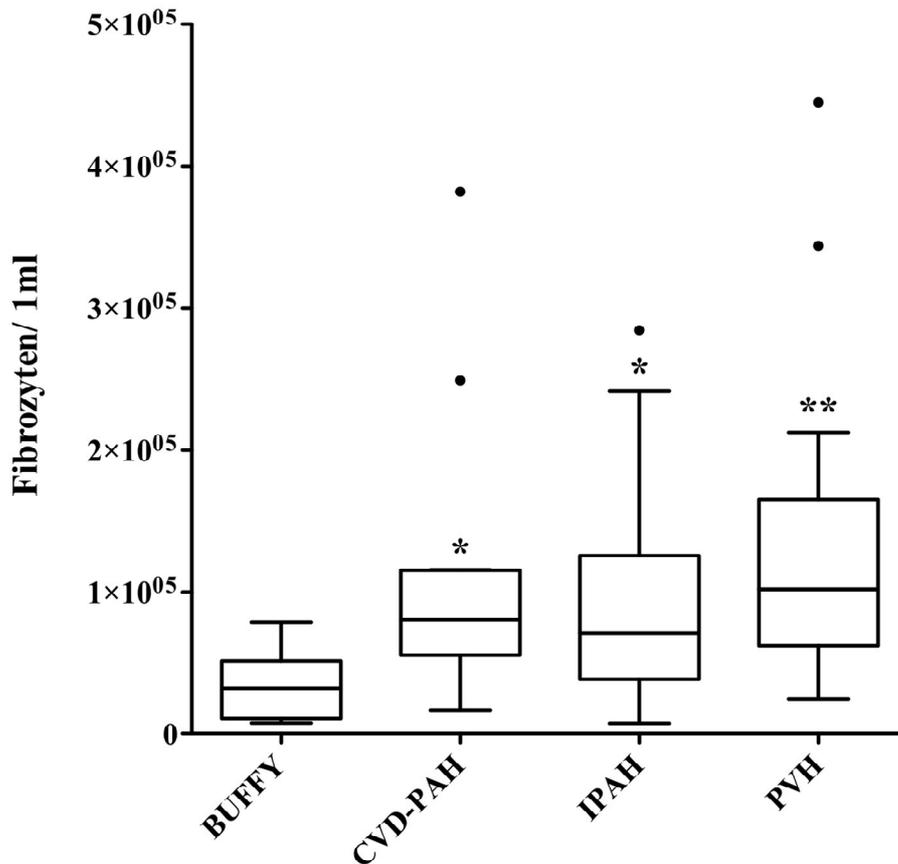
Zellen ermittelt.

Der Grund hierfür ergibt sich aus der Herkunft zirkulierender Fibrozyten. Es wird vermutet, dass sie von einer Subpopulation von CD14+ PBMC abstammen [54, 61]. Damit auch diese Vorläuferzellen bei der Quantifizierung der Zellen berücksichtigt werden, wurde neben dem relativen Anteil spindelförmiger Zellen auch der absolute Anteil aller adhärenen Zellen in 1 ml Spender-Vollblut ermittelt. Auf diese Weise wurden auch Zellen erfasst, die noch nicht weiter differenziert sind, aber per definitionem zur Population der zirkulierenden Fibrozyten gehören.

Zur Beurteilung der ermittelten Zahl zirkulierender Fibrozyten bzw. adhärenen Zellen wurden Box-Whisker-Plot Diagramme erstellt. Als Testverfahren der statistischen Auswertung wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey Post Hoc Test verwendet.

Die Lage der Boxplots in Abb. 8 zeigt eine erkennbare Differenz der Fibrozytenverteilung in den einzelnen Kollektiven. Die gesunde Kontrollgruppe BUFFY weist einen Medianwert von 32.488 (33.877) Fibrozyten/ 1 ml auf. Das restliche Kollektiv zeigt deutlich höhere Medianwerte. Somit ergibt sich für die Untergruppe IPAH ein Median von 70.834 (82.486) Fibrozyten/ 1 ml, für das Kollektiv CVD-PAH ein Median von 80.298 (52.942) Fibrozyten/ 1 ml und für die Kontrollgruppe PVH ein Median von 102.045 (96.122) Fibrozyten/ 1ml.

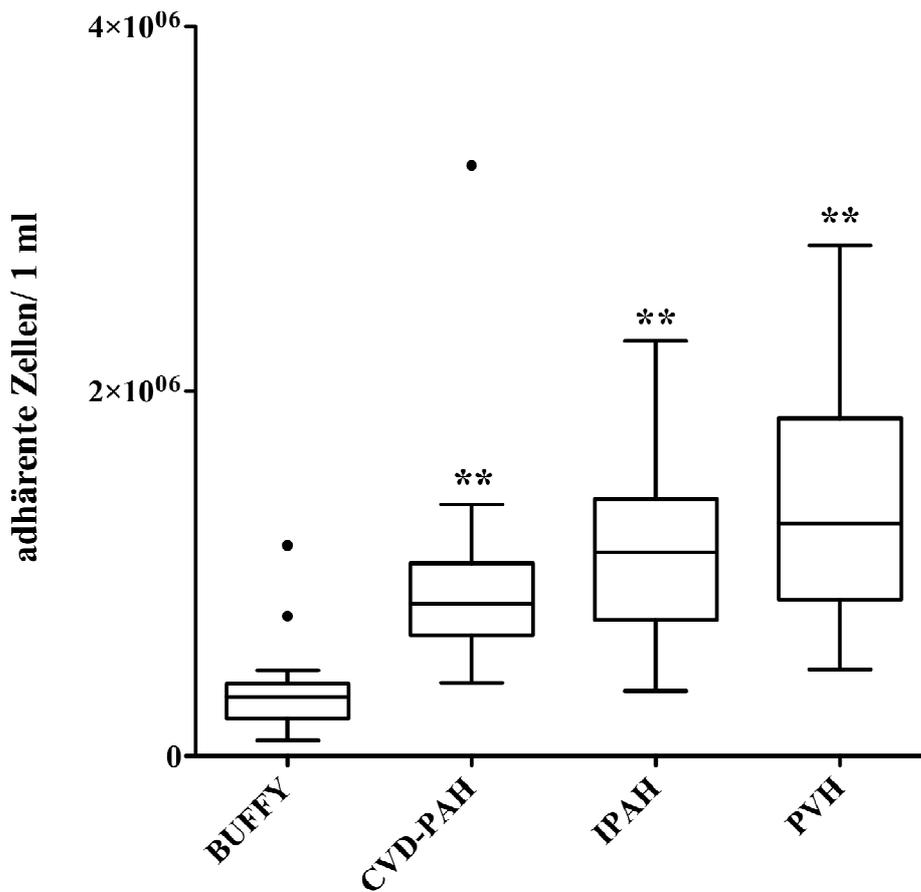
Im Hinblick auf die Anzahl zirkulierender Fibrozyten zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe ( $p \leq 0,016$ ). Zwischen den Kollektiven CVD-PAH, IPAH und PVH ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Fibrozytenzahl.



**Abb. 8** Box-Whisker-Plot Diagramm des absoluten Anteils zirkulierender Fibrozyten in 1 ml Spender-Vollblut. Angabe der Medianwerte und Quartile. Ausreißer bzw. Extremwerte sind als Punkte dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur gesunden Kontrollgruppe BUFFY bestimmt.  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*)

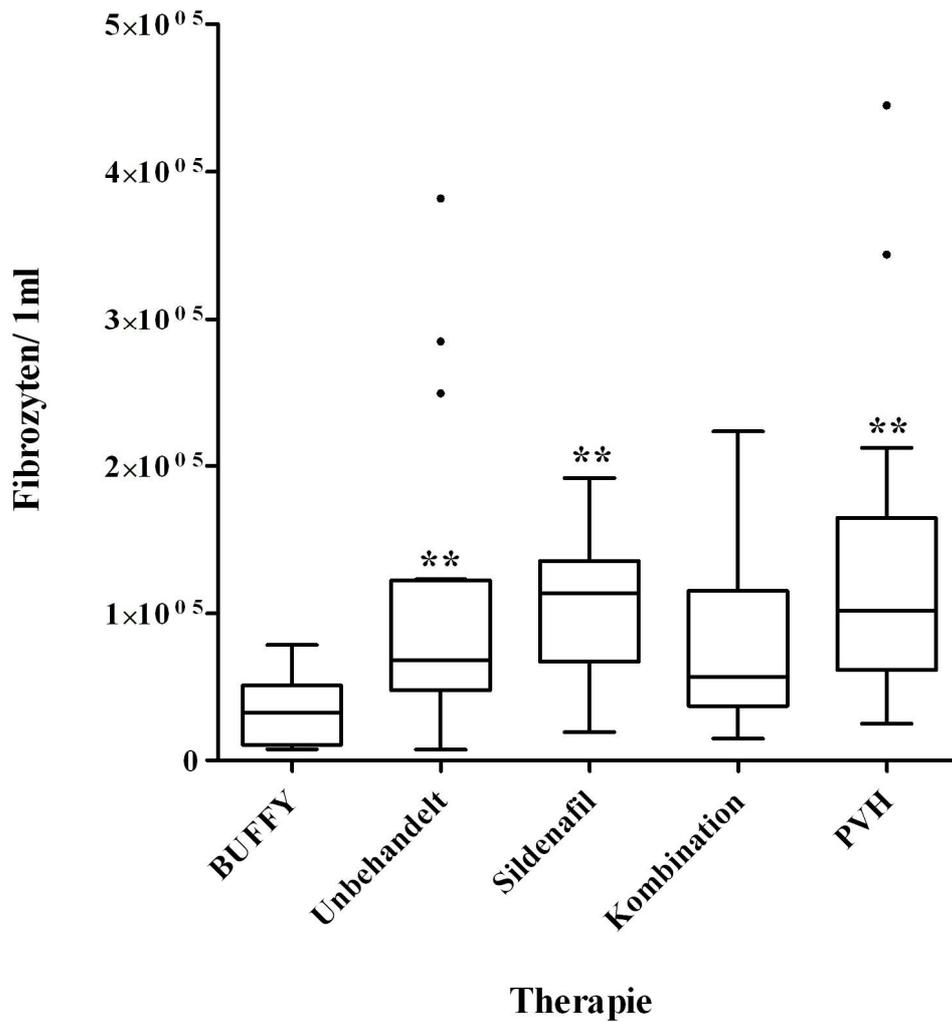
Die grafische Darstellung der Verteilung der adhärenenten Zellen (Abb. 9) zeigt eine ausgeprägte Disparität der einzelnen Datensätze. Für die jeweiligen Untergruppen ergaben sich folgende Medianwerte: BUFFY 324.293 (184.872) adhärenente Zellen/ 1 ml, CVD-PAH: 835.472 (313.332) adhärenente Zellen/ 1 ml, IPAH: 1.117.444 (650.444) adhärenente Zellen/ 1 ml und PVH: 1.275.917 (936.806) adhärenente Zellen/ 1 ml.

Auch hier besteht hinsichtlich der Zahl adhärenenter Zellen ein statistisch signifikanter Unterschied zum gesunden Kontrollkollektiv ( $p \leq 0,01$ ). Die Unterschiede zwischen den Patientengruppen CVD-PAH, IPAH und PVH erwiesen sich als nicht signifikant.



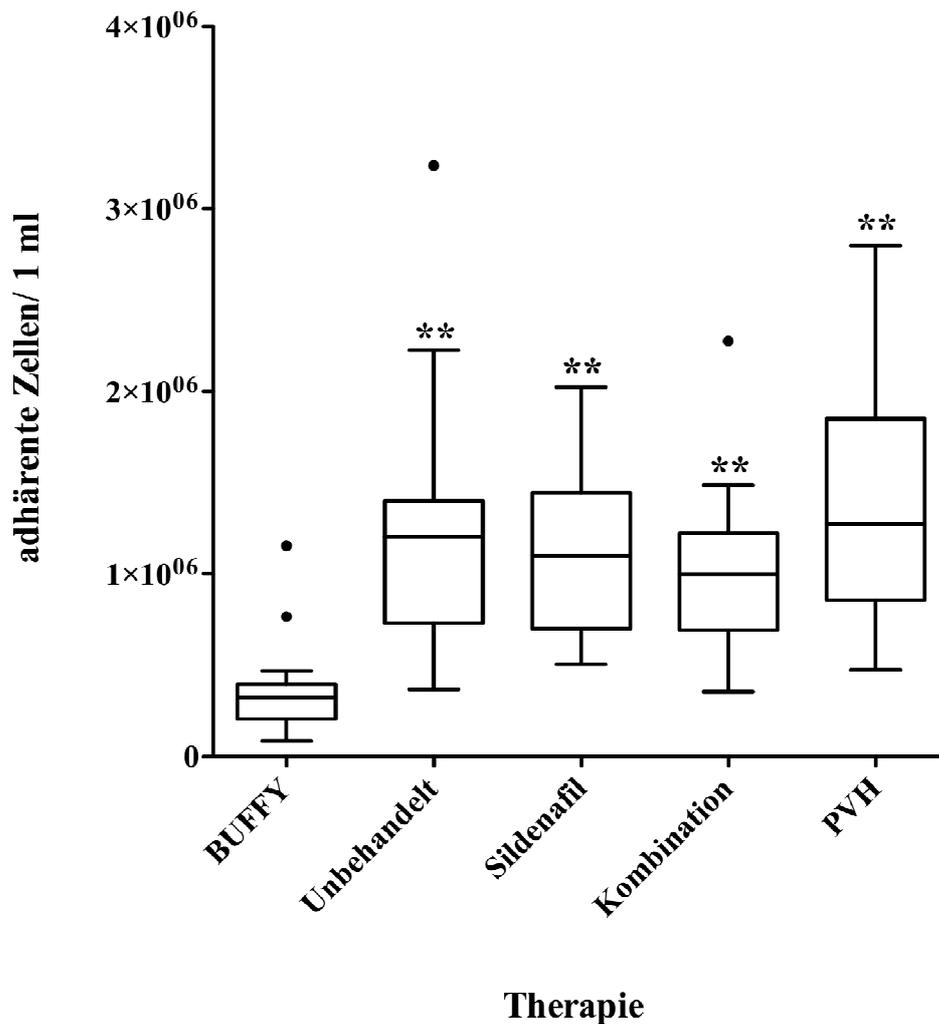
**Abb. 9** Box-Whisker-Plot Diagramm des absoluten Anteils adhärenter Zellen in 1 ml Spender-Vollblut. Angabe der Medianwerte und Quartile. Ausreißer bzw. Extremwerte sind als Punkte dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur gesunden Kontrollgruppe BUFFY bestimmt.  $p < 0,01$  (\*\*)

Abb. 10 und 11 zeigen die Anzahl zirkulierender Fibrozyten bzw. adhärenter Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Therapiestrategien. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich nur in Bezug auf die gesunde Kontrollgruppe  $p \leq 0,05$  bzw.  $p \leq 0,01$ . Die Art der Therapie scheint lediglich einen geringen Effekt auf die Zellzahl auszuüben. Der Median für die Gruppe der unbehandelten Patienten betrug 72.160 (67.253) Fibrozyten/ 1ml bzw. 1.077.778 (652.111) adhärenter Zellen/ 1ml, Patienten mit Sildenafil als Monotherapie wiesen im Median 113.667 (63.273) Fibrozyten/ 1ml bzw. 1.100.000 (609.590) adhärenter Zellen auf und Patienten mit einer Kombi-Therapie hatten im Median 57.103 (75.582) Fibrozyten/ 1ml bzw. 997889 (496.042) adhärenter Zellen.



**Abb. 10** Box-Whisker-Plot Diagramm des absoluten Anteils zirkulierender Fibrozyten in 1 ml Spender-Vollblut in Abhängigkeit von der Therapie. Angabe der Medianwerte und Quartile. Ausreißer bzw. Extremwerte sind als Punkte dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur gesunden Kontrollgruppe BUFFY bestimmt.

$p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*)



**Abb. 11** Box-Whisker-Plot Diagramm des absoluten Anteils adhärenter Zellen in 1 ml Spender-Vollblut in Abhängigkeit von der Therapie. Angabe der Medianwerte und Quartile. Ausreißer bzw. Extremwerte sind als Punkte dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur gesunden Kontrollgruppe BUFFY bestimmt.

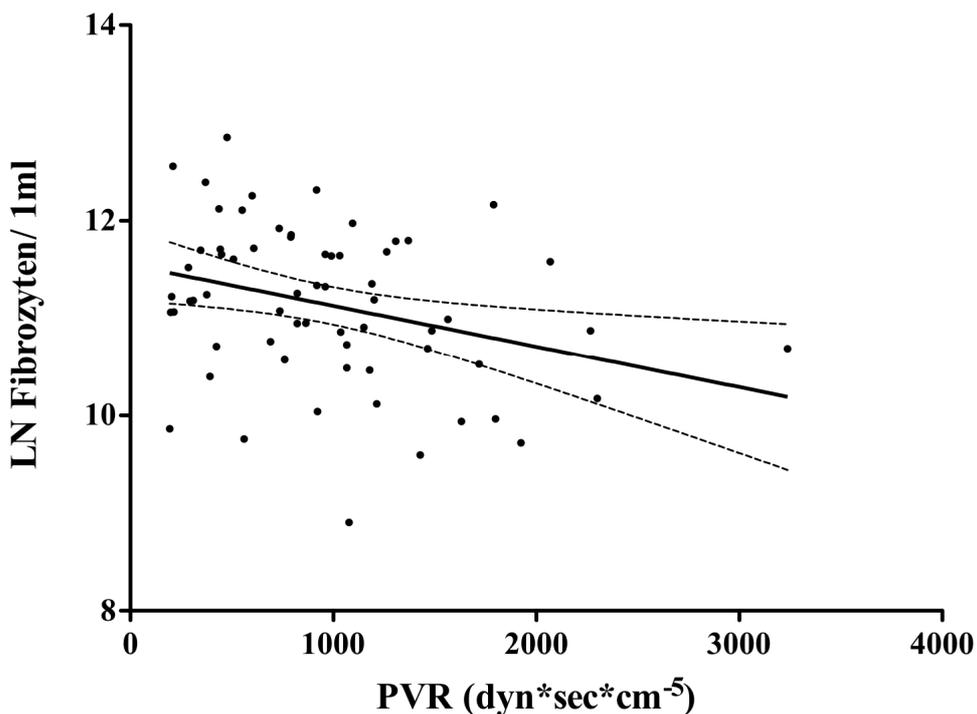
$p < 0,01$  (\*\*)

Weiterführend wurde der potenziell mögliche Zusammenhang zwischen der Fibrozytenzahl bzw. Anzahl adhärenter Zellen und dem klinischen Schweregrad der pulmonalen Hypertonie gemessen an CI, PVR, mPAP, SvO<sub>2</sub> und 6 MWD untersucht. Für die graphische Darstellung der Abhängigkeit dieser Variablen wurde ein Scatterplot verwendet mit anschließender Korrelationsanalyse, um die Stärke des Zusammenhangs der Merkmale zu quantifizieren. Für die Beziehung zwischen der Fibrozytenzahl und dem Schweregrad der PH ergab sich folgendes Ergebnis (Abb. 12 und 13).

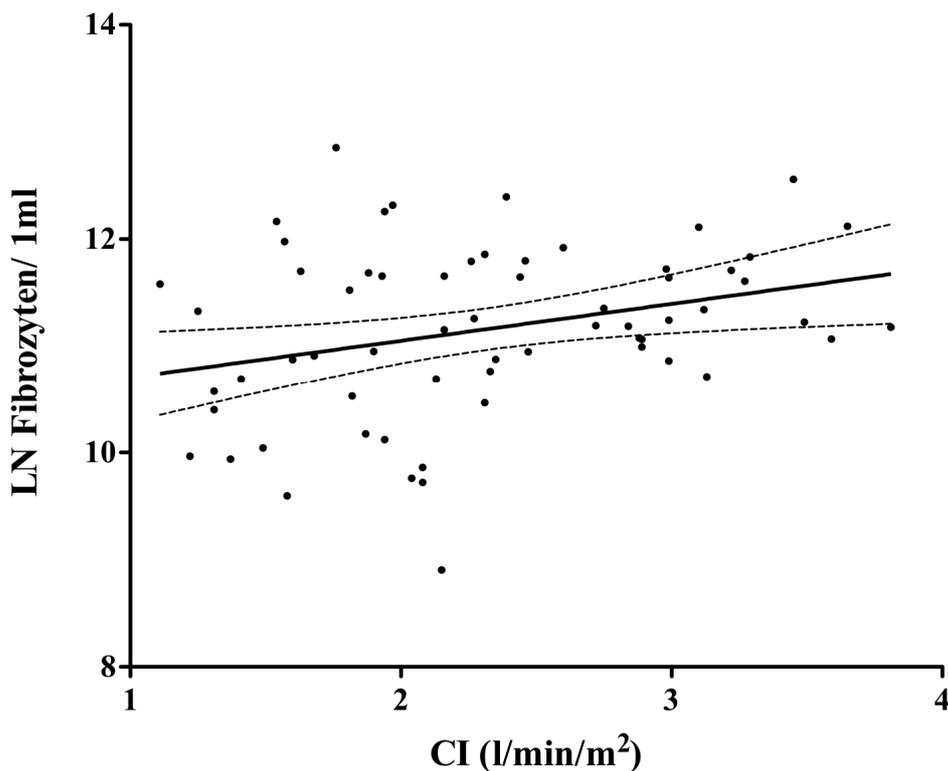
Der Scatterplot für die Korrelation zwischen Fibrozytenzahl und PVR bzw. CI zeigte eine Punktwolke mit einer schwach ausgeprägten linearen Struktur mit kleiner positiver bzw. negativer Steigung. Der zugehörige zweiseitige Signifikanztest wies einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Fibrozytenzahl/ 1 ml und dem PVR ( $p=0,011$ ) bzw. CI ( $p=0,045$ ) nach.

Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der einfachen linearen Regression betrug 0,1 bzw. 0,09, so dass nur 10 % bzw. 9 % der Varianzen der Werte durch die Regressionsgerade erklärt werden können. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ergab  $r=0,32$  bzw.  $r=0,3$ . Somit besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den Merkmalen. Für alle weiteren Parameter (mPAP, SvO<sub>2</sub>, 6 MWD) konnte weder ein statistisch signifikanter Zusammenhang noch eine Korrelation zur Fibrozytenzahl/ 1ml ermittelt werden.

Eine Beziehung zwischen der Anzahl adhärenter Zellen und dem Schweregrad der PH wurde nicht festgestellt.



**Abb. 12** Scatterplot der Korrelationsanalyse zwischen Fibrozytenzahl und PVR. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95% Konfidenzintervall. Korrelationskoeffizient  $r=0,32$ ; Bestimmtheitsmaß  $R^2=0,1$ ;  $p < 0,05$



**Abb. 13** Scatterplot der Korrelationsanalyse zwischen Fibrozytenzahl und CI. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95% Konfidenzintervall. Korrelationskoeffizient  $r = 0,3$ ; Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,09$ ;  $p < 0,05$

Desweiteren wurde untersucht, ob die Anzahl zirkulierender Fibrozyten bzw. adhärenter Zellen als prognostisch relevanter Faktor für die Aktivität und Progression der PAH dienen kann. Für die Analyse der Time to Clinical Worsening (TTCW) wurden als sekundäre Endpunkte Tod, Hospitalisierung und Erweiterung der medikamentösen Therapie definiert. Dabei zeigte sich im Log-Rang-Test der Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse kein signifikanter Mortalitätsunterschied in Abhängigkeit von der Zellzahl ( $p > 0,05$ ). Auch im anschließenden Cox-Modell konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit und der untersuchten Variable nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ).

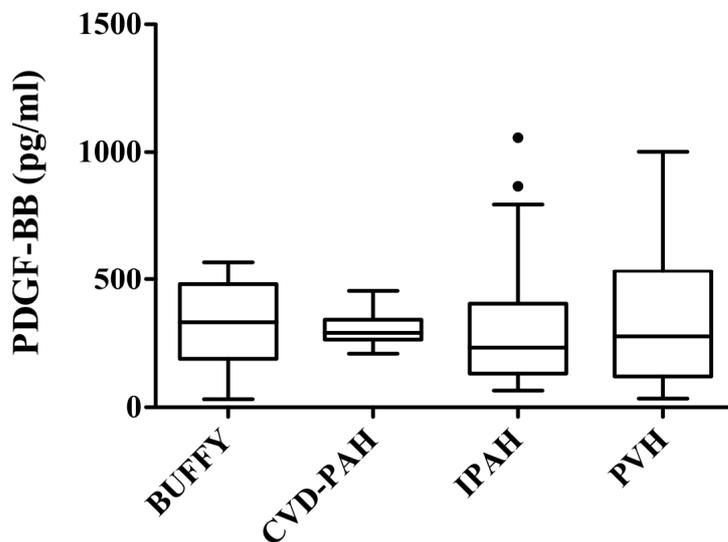
### 3.3 Ergebnisse der ELISA

Die Migration von zirkulierenden Fibrozyten in entzündetes oder fibrosierendes Gewebe wird von verschiedenen exo- und endokrinen Chemokinen gesteuert. Die Expression der Zytokine PDGF-BB, SDF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 2 und VEGF wurde mit Hilfe der

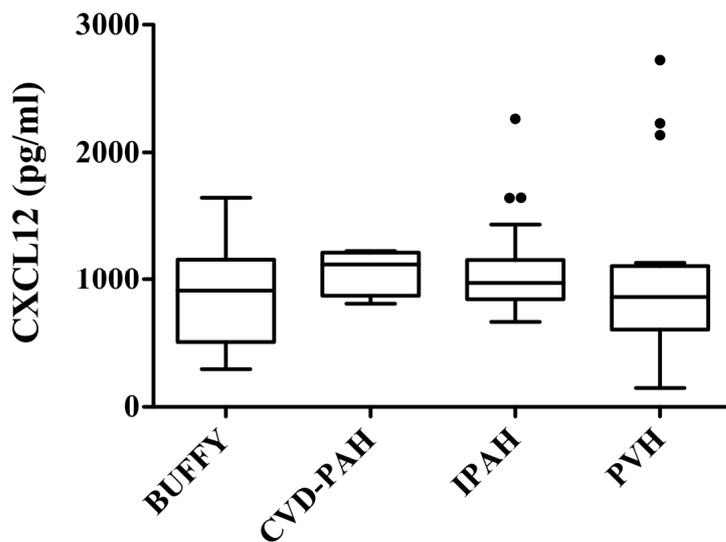
ELISA-Technik im Zellkulturüberstand nachgewiesen.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse in Form von Box-Whisker-Plot-Diagrammen zeigte keinen erkennbaren Unterschied in der Ausprägung der Zytokine zwischen den einzelnen Gruppen des Studienkollektivs. Man erkennt, dass der Median zwischen den Kollektiven kaum differiert (Abb. 14–17).

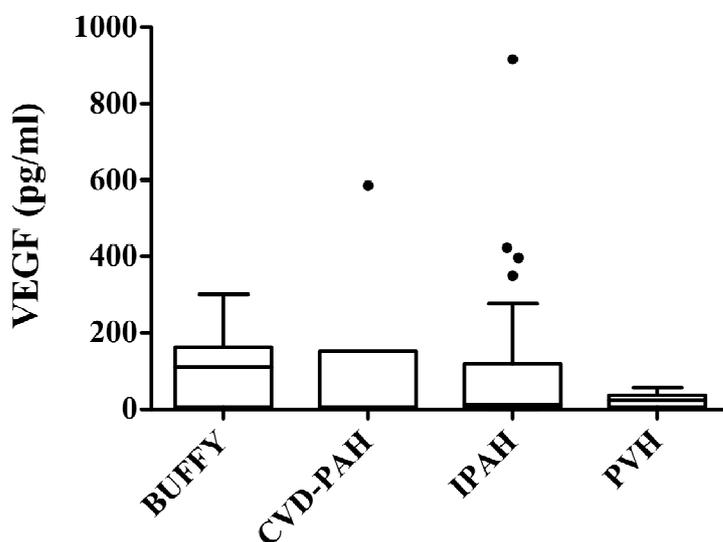
Eine anschließende statistische Analyse mittels ANOVA konnte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Zytokin-Konzentration im Studienkollektiv nachweisen. Zudem bestand keine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der Zytokin-Expression.



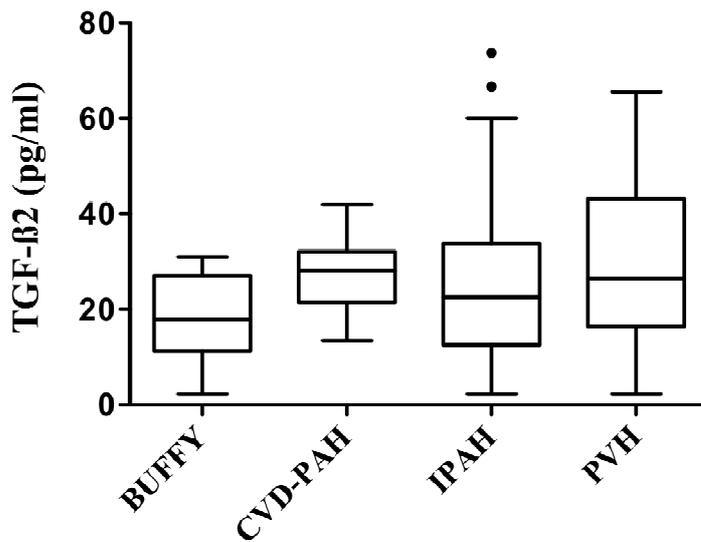
**Abb. 14** Box-Whisker-Plot Diagramm der Konzentration von PDGF-BB im Zellüberstand. Angabe der Medianwerte und Quartile. Ausreißer bzw. Extremwerte sind als Punkte dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven.  $p > 0,05$



**Abb. 15** Box-Whisker-Plot Diagramm der Konzentration von CXCL12 im Zellüberstand. Angabe der Medianwerte und Quartile. Ausreißer bzw. Extremwerte sind als Punkte dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven.  $p > 0,05$



**Abb. 16** Box-Whisker-Plot Diagramm der Konzentration von VEGF im Zellüberstand. Angabe der Medianwerte und Quartile. Ausreißer bzw. Extremwerte sind als Punkte dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven.  $p > 0,05$

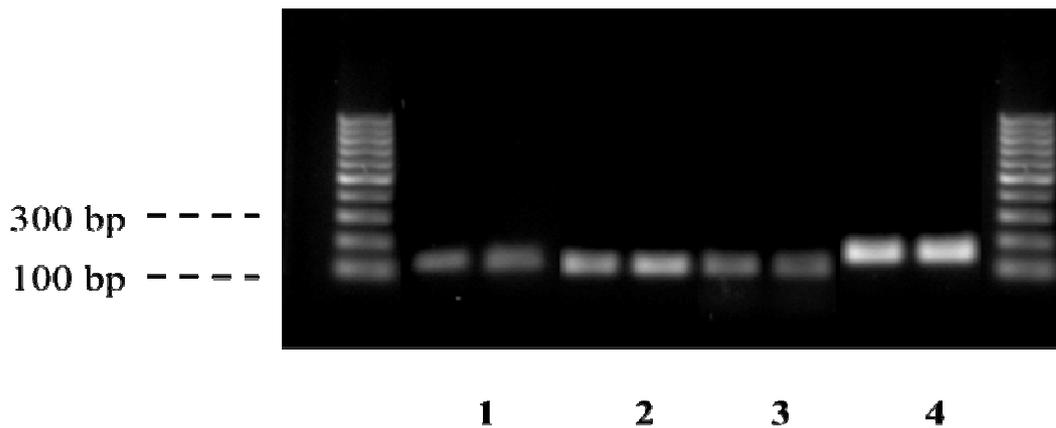


**Abb. 17** Box-Whisker-Plot Diagramm der Konzentration von TGF- $\beta$ 2 im Zellüberstand. Angabe der Medianwerte und Quartile. Ausreißer bzw. Extremwerte sind als Punkte dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven.  $p > 0,05$

### 3.4 Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR

Nach Bestimmung der Zytokine auf Proteinebene (ELISA) erfolgte eine weitere Analyse auf Transkriptionsebene mittels qRT-PCR für die Zielgene P4Hbeta, Coll-1, VEGF-A und TGF- $\beta$ 1. Die cDNA-Fragmente wurden amplifiziert und quantifiziert durch kontinuierliche Messung des zunehmenden Fluoreszenzsignals während der Amplifikation. Für jede cDNA-Probe wurde eine simultane Amplifikation der Zielgene und des Housekeeping-Gens (PBGD, GAPDH) durchgeführt, so dass die erhaltenen Ct-Werte der Zielgene normiert werden konnten. Dafür wurde die Differenz der Ct-Werte beider Reaktionen, der sog. delta Ct-Wert ( $\Delta$ Ct), bestimmt.  $\Delta$ Ct = Ct (Zielgen) – Ct (Referenzgen)

Die amplifizierten Fragmente wurden in einem 1%igem TAE-Agarosegel aufgetrennt und über eine Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Dabei zeigten sich die DNA-Fragmente der Gene P4HB, COL1A1, VEGF und TGF- $\beta$ 1 in der zu erwartenden Größe (Abb. 18).



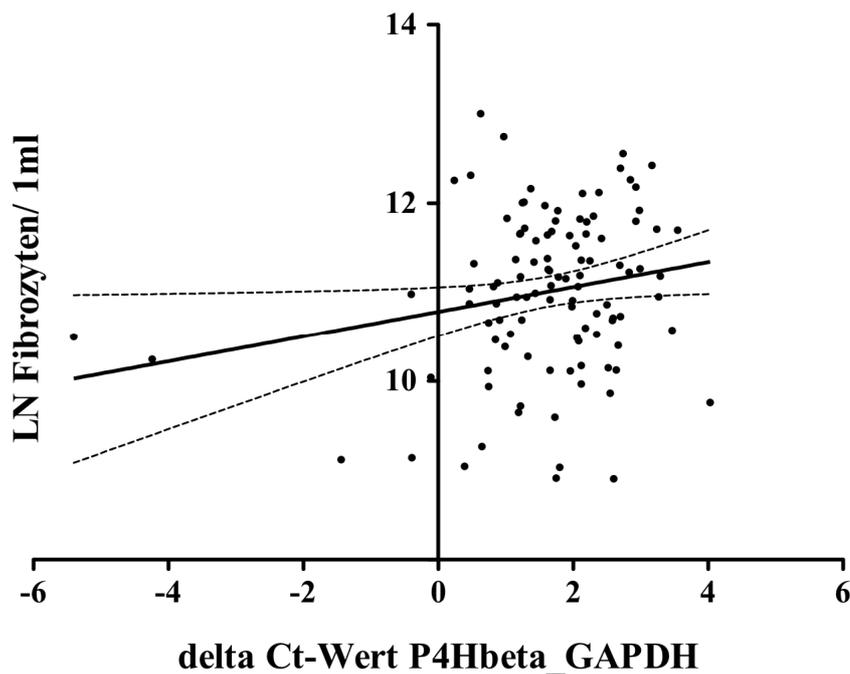
**Abb. 18** Nachweis der Amplifikate mittels Gelelektrophorese. 1, TGF $\beta$  132 bp; 2, P4Hbeta 115 bp; 3, Coll-1 127 bp; 4, VEGF 176 bp

Von den untersuchten Genen zeigten lediglich P4Hbeta und TGF $\beta$  einen signifikanten Unterschied in der Genexpression im Vergleich der einzelnen Kollektive. Die wichtigsten Ergebnisse sind in Abb. 19 und 20 in Form von Box-Plot-Diagrammen graphisch dargestellt.

Die Boxplots in Abb. 19 weisen eine Differenz in der Genexpression von P4Hbeta zwischen den einzelnen Kollektiven auf. Unter Verwendung des Tukey Post Hoc Tests ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der gesunden Kontrollgruppe und dem Patientenkollektiv CVD-PAH ( $p = 0,007$ ) bzw. IPAHA ( $p = 0,001$ ).

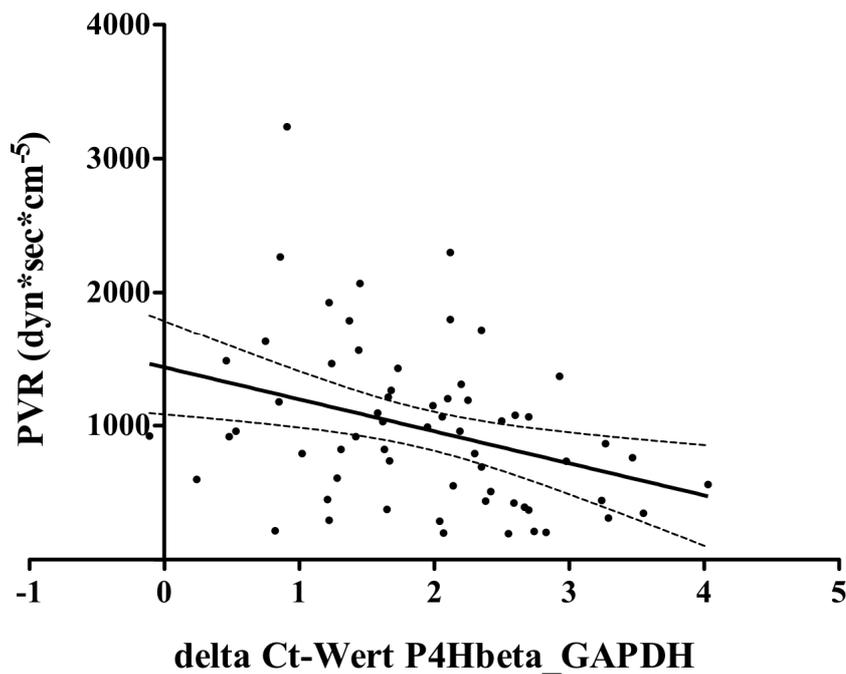




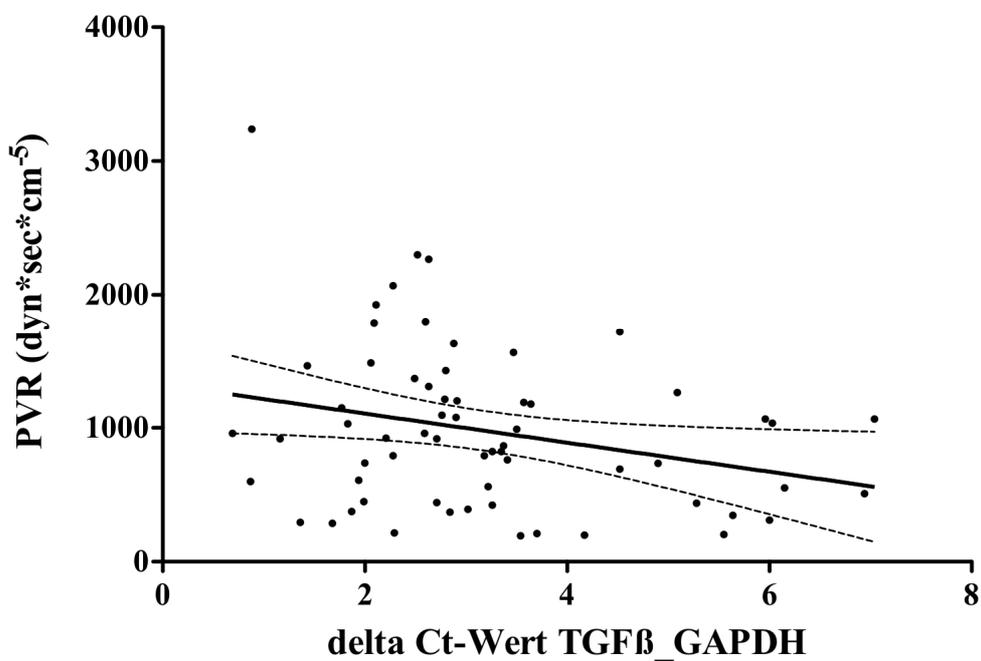


**Abb. 21** Scatterplot der Korrelationsanalyse zwischen Fibrozytenzahl und Genexpression von *P4Hbeta*. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95% Konfidenzintervall. Korrelationskoeffizient  $r = 0,2$ ; Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,04$ ;  $p < 0,05$

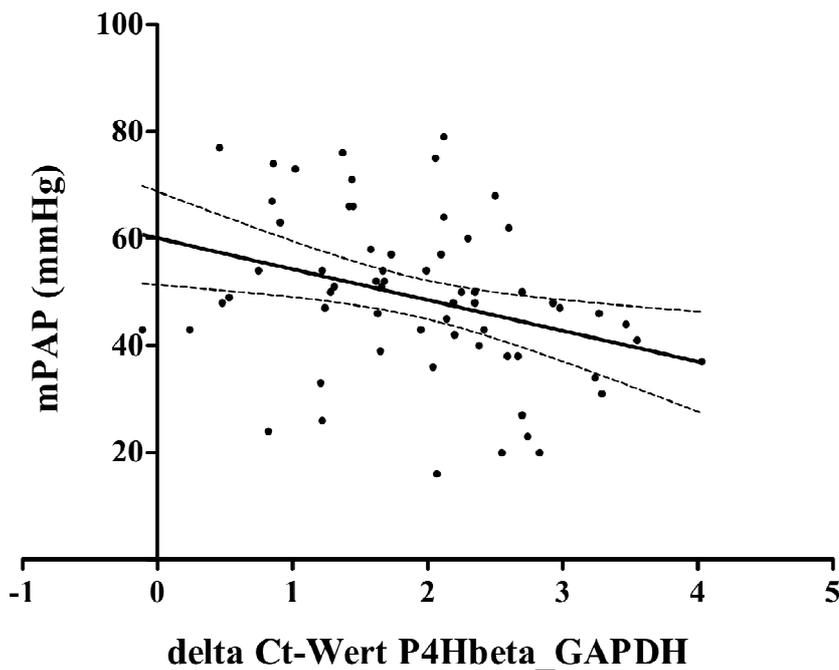
Ähnliche Resultate ergaben sich in der Analyse der Beziehung zwischen dem Schweregrad der PAH und der Genexpression der Zytokine. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Variablen PVR, mPAP bzw. CI und *P4Hbeta*, *Coll1* und *TGF- $\beta$ 1*, der allerdings nicht linear war. Die zugehörigen Abbildungen (Abb. 22 – 25) sind im Folgenden dargestellt.



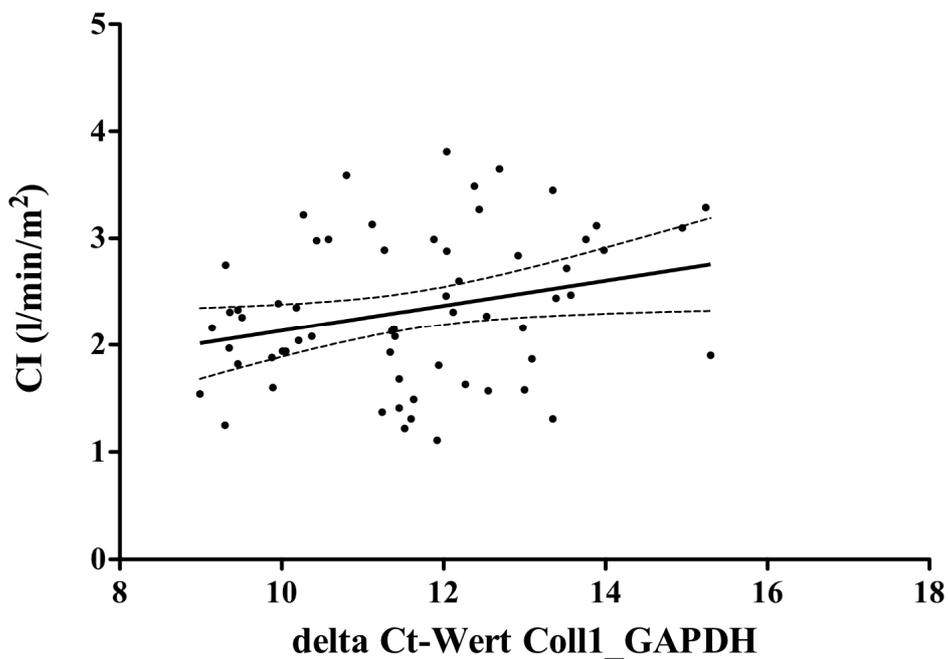
**Abb. 22** Scatterplot der Korrelationsanalyse zwischen PVR und Genexpression von P4Hbeta. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95% Konfidenzintervall. Korrelationskoeffizient  $r = -0,34$ ; Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,12$ ;  $p < 0,01$



**Abb. 23** Scatterplot der Korrelationsanalyse zwischen PVR und Genexpression von TGFB. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95% Konfidenzintervall. Korrelationskoeffizient  $r = -0,27$ ; Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,072$ ;  $p < 0,05$



**Abb. 24** Scatterplot der Korrelationsanalyse zwischen mPAP und Genexpression von P4Hbeta. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95% Konfidenzintervall. Korrelationskoeffizient  $r = -0,34$ ; Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,11$ ;  $p < 0,01$



**Abb. 25** Scatterplot der Korrelationsanalyse zwischen CI und Genexpression von P4Hbeta. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95% Konfidenzintervall. Korrelationskoeffizient  $r = 0,27$ ; Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,073$ ;  $p < 0,05$

## **4. Diskussion**

Die Pulmonale Hypertonie ist eine schwerwiegende Erkrankung, die durch eine Druck- und Widerstandserhöhung in den Pulmonalgefäßen gekennzeichnet ist. Pathophysiologisch liegt diesem Krankheitsbild eine proliferative Veränderung der distalen Pulmonalgefäße zugrunde. Vasokonstriktion, vaskuläres Remodelling und in-situ-Thrombosen führen letztendlich zu einer Erhöhung des pulmonal vaskulären Widerstandes und konsekutiv zu einer vermehrten Rechtsherzbelastung [9, 97].

Mit dem heutigen Erkenntnisstand über die verschiedenen pathogenetischen Mechanismen der PH haben wir die Möglichkeit medikamentös in den Krankheitsverlauf einzugreifen und die Lebenserwartung der Patienten zu verlängern. Die derzeitigen therapeutischen Interventionen beschränken sich hauptsächlich auf die Wiederherstellung der Balance zwischen vasodilatativen und vasokonstriktiven Mediatoren. Medikamente wie PDE5-Inhibitoren und Prostazykline, wirken zusätzlich antiproliferativ und inhibieren die Ausbildung struktureller Gefäßwandveränderungen. Sie vermitteln ihre Effekte durch indirekte Einwirkung auf lokale ortsständige Zellen (Myofibroblasten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) und hemmen auf diese Weise deren Migration und Proliferation [24, 47, 52].

Die Bedeutung extra-pulmonaler Zellen bei der Entstehung des vaskulären Remodellings in der PH stellt einen neuen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Forschung dar. Diverse Studien zeigen eine Beteiligung dieser Zellpopulation an pathologischen fibroproliferativen Umbauprozessen, wie sie bei Lungenfibrose, Nephrogener Fibrose oder Asthma zu finden sind [60, 82, 85]. Einer aktuellen Studie zufolge, kommt es im hypoxie-induzierten murinen Modell der PH zu einer vermehrten Invasion zirkulierender mesenchymaler Vorläuferzellen, sog. Fibrozyten, in das pulmonale Stromgebiet. Über autokrine und parakrine Signalwege begünstigen Fibrozyten die Initiation und Progression des vaskulären Remodellings. [73, 94, 95].

Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um die im Tiermodell gewonnenen Ergebnisse zu validieren und die zugrunde liegenden zellulären und parakrinen Mechanismen zu eruieren. Deshalb war es für uns von großem Interesse, die Relevanz zirkulierender Fibrozyten in der Pathogenese der humanen PAH zu untersuchen.

## **4.1 Einfluss zirkulierender Fibrozyten auf die Entstehung der Pulmonalen Hypertonie**

In der vorliegenden Arbeit wurden zirkulierende Fibrozyten aus peripher-venösem Blut von IPAH-Patienten (n = 54) und Patienten mit CVD assoziierter PAH (n = 12) isoliert und mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Als Kontrolle dienten altersgematchte gesunde Kontrollprobanden (n = 23) sowie Patienten mit PVH (n = 20). Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur der absolute Anteil zirkulierender Fibrozyten, sondern auch die Anzahl aller adhärenen Zellen bei Patienten mit PAH bzw. PVH im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Zwischen den einzelnen Patientenkollektiven ergab sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Zellzahl. Diese Daten decken sich mit den Forschungsergebnissen von Yeager et. al [92]. Auch diese Arbeitsgruppe kam zu dem Resultat, dass die Anzahl zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut von jugendlichen PH-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht ist. Innerhalb des Patientenkollektivs zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen Patienten mit PAH und PVH.

In verschiedenen Studien zur Pathogenese der PH wurde die Hypothese einer gesteigerten Rekrutierung von zirkulierenden mesenchymalen Vorläuferzellen sowie eine daraus resultierende strukturelle Gefäßwandveränderung diskutiert. Im Tierversuch konnten Nikam et al. [95] nachweisen, dass es unter hypoxischen Bedingungen zu einer massiven Rekrutierung und Akkumulation zirkulierender Fibrozyten kommt und diese Zellpopulation möglicherweise mit der Initiation des vaskulären Remodellings assoziiert ist [93, 94]. Ähnliche Beobachtungen machten bereits Frid et al. [94], die in Untersuchungen zum hypoxie-induzierten Remodelling distaler Pulmonalarterien eine vermehrte perivaskuläre Akkumulation zirkulierender mesenchymaler Vorläuferzellen feststellte, die durch Produktion von Zytokinen und extrazellulärer Matrix zum strukturellen Gefäßwandumbau beitrugen. Gleichermäßen konnten Stenmark et al. [9] diese Daten bestätigen.

Eine aktuelle Publikation von Overbeek et al. [98] brachte neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Pathogenese der Sklerodermie assoziierten PAH (SSc-PAH). Demnach konnte eine Lungengewebsanalyse von Patienten mit SSc-PAH zeigen, dass das vaskuläre Remodelling nicht nur auf den arteriellen Schenkel beschränkt ist, sondern auch das venöse Gefäßsystem betrifft. Interessanterweise waren diese strukturellen Veränderungen nicht auf fibrotisch veränderte Lungenareale begrenzt. Ergänzend

untersuchten Mathai et al. die Expression CD45+ Pro-Col1+ Zellen im peripheren Blut von SSc-Patienten mit ILD. Sie erbrachten den Nachweis, dass die Konzentration kollagen-produzierender Zellen, bestehend aus CD34+ zirkulierenden Fibrozyten und CD34+ CD14+ Monozyten, in diesem Kollektiv deutlich erhöht war im Vergleich zur Kontrollgruppe [79].

In der aktuellen Literatur gibt es immer mehr Hinweise auf die Beteiligung zirkulierender Fibrozyten am vaskulären Remodelling der PH. Auch unsere Daten zeigen eine erhöhte Präsenz dieser Zelllinie, die aufgrund ihrer proliferativen Funktion von zentraler Bedeutung für den strukturellen Gefäßwandumbau sein könnte.

#### **4.2 Korrelation zwischen der Anzahl zirkulierender Fibrozyten und dem Schweregrad der Pulmonalen Hypertonie**

Bei einer Vielzahl chronisch-progressiver Erkrankungen wie IPF oder Asthma ist der Anteil zirkulierender Fibrozyten stark erhöht und mit dem Grad der Fibrosierung vergesellschaftet. Eine Exazerbation führt demnach zu einer weiteren Zunahme der Fibrozytenzahl und einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufs [60, 84]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie mit jugendlichen PH-Patienten zeigte sich auch eine deutliche Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung, gemessen am mPAP, und der Anzahl zirkulierender Fibrozyten [92]. Die vorliegende Arbeit konnte allerdings keine lineare Korrelation zwischen hämodynamischen Parametern, die den Schweregrad der PH widerspiegeln (CI, PVR, mPAP, SvO<sub>2</sub>) und der Anzahl zirkulierender Fibrozyten bzw. der Zahl adhärenter Zellen nachweisen.

Aktuellen Publikationen zufolge führt eine gesteigerte Rekrutierung zirkulierender mesenchymaler Vorläuferzellen in die pulmonale Strombahn zur Initiation des pulmonal vaskulären Remodellings. Durch vermehrtes Zellwachstum und Deposition von ECM in die Pulmonalarterienwand kommt es zu einer konsekutiven Verengung des Lumens, verbunden mit einer Erhöhung des PVR und mPAP. Es erscheint daher durchaus denkbar, dass eine Korrelation zwischen der Anzahl zirkulierender Fibrozyten und dem Schweregrad der PH besteht. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium könnte möglicherweise primär die Differenzierung ortsständiger Zellen zur Progression der Erkrankung beitragen, weshalb hier keine Korrelation zwischen hämodynamischen Parametern und zirkulierenden Fibrozyten nachzuweisen ist. Eine weitere Hypothese ist, dass durch auto- und parakrine Signalwege eine stete Rekrutierung weiterer extra-

pulmonaler Zellen stattfindet. Diese üben allerdings nur noch einen geringen Effekt auf die Hämodynamik und somit auf die Progression der Krankheit aus.

Weitere klinische Studien sind notwendig, um die Relevanz zirkulierender Fibrozyten im Krankheitsverlauf der PH nachzuweisen.

### **4.3 Einfluss der Therapie auf die Anzahl zirkulierender Fibrozyten**

Das therapeutische Spektrum der PAH wird stetig erweitert. Heute stehen moderne Medikamente zur Verfügung, die nicht nur eine Senkung des pulmonalen Gefäßwiderstandes ermöglichen, sondern auch günstigen Einfluss auf die Progression der Erkrankung haben. PDE5-Inhibitoren wie z.B. Sildenafil gelten neben Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und inhalativen Prostanoiden als Substanz erster Wahl in der Behandlung des Lungenhochdrucks. Neben ihrer selektiven vasodilatierenden Wirkung scheinen PDE5-Inhibitoren einen direkten antiproliferativen Effekt auf pulmonale Gefäßmuskulzellen zu entfalten [38, 39]. Langzeitstudien wiesen eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit, der klinischen Symptomatik und der hämodynamischen Parameter nach [40]. Mit einer Kombinationstherapie aus Sildenafil und Bosentan bzw. Sildenafil und inhaliertem Iloprost konnte eine Belastungssteigerung über das Ausgangsniveau hinaus und eine dauerhafte Stabilisierung erzielt werden [99]. Trepostinil, ein stabiles Prostazyklinanalogon, weist eine stärkere pulmonale Selektivität und eine längere Wirkdauer auf als Iloprost. Bezüglich des 6MWD zeigte sich vor allem in Kombination mit Bosentan eine signifikante Steigerung der Belastbarkeit [100]. Auf zellulärer Ebene wurde im murinen Modell der hypoxie-induzierten PAH unter Behandlung mit Trepostinil ein deutlicher Rückgang der Rekrutierung und Differenzierung zirkulierender Fibrozyten registriert. Zusätzlich kam es zu einer Remission des pathologischen Gefäßumbaus [73, 94, 95]. Basierend auf den beschriebenen Veränderungen wurde der Einfluss ausgewählter Therapeutika auf die Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten untersucht. Im Gegensatz zu kürzlich veröffentlichten *in vitro* Studien fand sich eine widersprüchliche Datenlage. Die Ergebnisse zeigten in Bezug auf die Zellzahl keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen therapeutischen Mitteln. Selbst eine Kombinationstherapie konnte keinen registrierbaren Unterschied im Vergleich zu unbehandelten Patienten erzielen. Eine vor kurzem erschienene ähnliche Studie mit jugendlichen PH-Patienten als Probanden kam zu demselben Ergebnis [92]. Weitere *in vitro* und *in vivo* Studien sind nötig, um gezielt

die Wirksamkeit der bisher zugelassenen Medikamente auf die Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten zu untersuchen.

#### **4.4 Einfluss zirkulierender Fibrozyten auf verschiedene Regulatorproteine**

##### PDGF-BB

Peptidgerge Wachstumsfaktoren wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF) sind potente Mitogene für Zellen mesenchymalen Ursprungs. Durch Stimulation der Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten induzieren sie das der PAH zugrunde liegende vaskuläre Remodelling. Diese Wachstumsfaktoren vermitteln ihre Effekte über Rezeptor-Tyrosinkinasen, deren Inhibition durch PDGF-Rezeptorantagonisten wie Imatinib eine überragende antiproliferative Wirkung mit Induktion eines Reverse Remodelling zeigt [46]. Die funktionelle Rolle von PDGF bei der Regulierung der strukturellen Gefäßwandveränderungen in der Lungenstrombahn konnte in experimentellen Modellen der PH und in humanem Gewebe von PAH-Patienten aufgeklärt werden. Jankov et al. [101] konnten am Tiermodell den Beweis erbringen, dass PDGFR- $\beta$  und sein Ligand PDGF-BB von großer Relevanz für die Pathogenese proliferativer Vorgänge der PAH sind. In kleinen Pulmonalarterien von IPAH-Patienten wies die Arbeitsgruppe um Perros eine hochregulierte Expression von PDGF und PDGFR mRNA in der Umgebung glatter Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen nach [13]. Auf diesen Ergebnissen basierend bestimmten Selimovic et al. [102] die Konzentration von PDGF-BB im arteriellen und gemischt-venösen Serum von PAH-Patienten und fanden eine signifikant erhöhte Expression von PDGF im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Zwischen den Patientenkollektiven IPAH und CVD-PAH zeigte sich allerdings keine Differenz. In anderen Publikationen finden sich hierzu widersprüchliche Daten. Eddahibi et al. [103] beschrieben eine unveränderte Expression von PDGF im peripher-venösen Blut von PAH-Patienten. Möglicherweise spiegelt jedoch die periphere Zirkulation nicht die zentral-pulmonalen Veränderungen wider.

Neben Thrombozyten, Makrophagen und Endothelzellen besitzen auch Fibrozyten die Fähigkeit PDGF zu sezernieren, um parakrin die Proliferation pulmonaler glatter Muskelzellen und Fibroblasten zu stimulieren [73]. Die von uns erhobenen Daten zeigten jedoch keine signifikante Veränderung der Proteinmenge von PDGF-BB im

Zellüberstand kultivierter zirkulierender Fibrozyten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse die Vermutung zu, dass der erhöhte Serumspiegel von PDGF-BB im Blut von PAH-Patienten nicht durch eine vermehrte Rekrutierung mesenchymaler Vorläuferzellen erklärt werden kann. Möglicherweise tragen zirkulierende Fibrozyten über die Sekretion diverser proliferativer Faktoren zum vaskulären Remodelling der PH bei. Um dies zu untersuchen, ist die Durchführung weiterer ELISA erforderlich.

#### VEGF

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Endothelzellen-spezifisches Mitogen und ein potentes angiogenetisches Peptid. Speziell VEGF-A zeigt eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten und Makrophagen. Dieser Wachstumsfaktor ist stark exprimiert in plexiformen Läsionen, die charakteristisch sind für pulmonal-vaskuläre Umbauprozesse der PH [104]. Experimentelle Studien am hypoxie-induzierten Modell der PAH postulierten eine protektive Funktion von hochreguliertem VEGF in der Progression des vaskulären Remodellings und Manifestation der Erkrankung [105]. Weiterführend konnten erhöhte Serumspiegel von VEGF im peripher-venösen Blut von PAH-Patienten nachgewiesen werden [103]. Andere Arbeitsgruppen kamen zu gegensätzlichen Ergebnissen. Bentisty et al. [106] beschrieben keinen signifikanten Unterschied von VEGF im Plasma von Patienten und gesunden Probanden. Die Vermutung liegt allerdings nahe, dass es während der Probenaufbereitung zu falsch negativen Ergebnissen gekommen ist, da VEGF von Thrombozyten gespeichert werden kann. Hartlapp et al. [73] untersuchten den Zellüberstand kultivierter, nicht stimulierter Fibrozyten und stellten eine Sekretion angiogenetischer Mediatoren fest.

Unsere Untersuchungen bestätigen diese Theorie, dennoch waren weder auf Proteinebene noch auf Transkriptionsebene signifikante Unterschiede in den verschiedenen Patientenkollektiven nachweisbar. Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass PAH-Patienten vermutlich vermehrt VEGF exprimieren, dieser Zustand allerdings nicht allein auf die sekretorische Aktivität zirkulierender Fibrozyten zurückzuführen ist. Möglicherweise spielen primär ortsständige Zellen eine tragende Rolle im Prozess des vaskulären Remodellings.

## TGF BETA

Die Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )-Superfamilie umfasst verschiedene multifunktionale Polypeptide, die als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren diverse (patho)physiologische Funktionen erfüllen. Dazu gehören 3 TGF- $\beta$  Isoformen, Aktivine, GDF und Bone Morphogenetic Proteins (BMP). Als pleiotroper Wachstumsfaktor ist TGF- $\beta$  an der frühen Embryogenese sowie an der Morpho- und Organogenese beteiligt. Dabei reguliert TGF- $\beta$ 1 die Proliferation und Differenzierung einer Vielzahl von Zellen, die Synthese von Matrixproteinen, immunologische Reaktionen, Angiogenese und Apoptose. Eine Fehlregulation des TGF- $\beta$  Signalwegs ist folglich mit pathologischen Prozessen wie Atherosklerose, Fibrose und Tumorgenese assoziiert [107].

Aktuellen Publikationen zufolge spielt dieser Signalweg eine zentrale Rolle bei der Entstehung der PH. Studien am Tiermodell belegen, dass es unter hypoxischen Bedingungen zu einer vermehrten Expression von TGF- $\beta$ 1 und Deposition von ECM kommt [108-110]. Dieses Ergebnis wurde von der Arbeitsgruppe um Selimovic bestätigt [102]. Sie konnten im Serum von PAH-Patienten wesentlich höhere TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen nachweisen als im Kontrollkollektiv. In weiteren Untersuchungen an isolierten pulmonalen Gefäßmuskelzellen von IPAH-Patienten konnte nach Stimulation mit den wachstumsinhibierenden Faktoren TGF- $\beta$ 1 und BMPs eine abnorme Proliferation dieser Zellen beobachtet werden. In der Kontrollgruppe führten diese Faktoren zu einer Hemmung des vaskulären Remodellings [111]. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass eine Dysregulation des TGF- $\beta$  Signalwegs, beispielsweise durch eine Mutation im *BMPR2*-Gen, die Entwicklung pathophysiologischer Vorgänge begünstigt. Möglicherweise trägt eine Interaktion des TGF- $\beta$ /BMP Signalwegs mit proliferativen Faktoren zur Entstehung des vaskulären Remodellings bei.

Von zentraler Bedeutung könnte hierfür die Präsenz zirkulierender Fibrozyten sein. Zellen hämatopoetischen Ursprungs sind in der Lage, den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  zu produzieren. Diese Fähigkeit wurde in verschiedenen *in vitro* Studien auch für zirkulierende Fibrozyten belegt [71, 74]. Demnach könnte die TGF- $\beta$  induzierte Rekrutierung dieser Zellen zu einem weiteren Anstieg der TGF- $\beta$ 1 Konzentration führen, mit der Folge einer vermehrten Zelldifferenzierung und erhöhten Produktion und Deposition von Kollagen durch Inhibition matrixabbauender Matrixmetalloproteinasen.

Die vorliegende Arbeit beweist, dass unstimulierte zirkulierende Fibrozyten autokrin TGF- $\beta$  sezernieren. Dabei war die Genexpression von TGF- $\beta$ 1 bei IPAH-Patienten vermindert im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, während die Proteinmenge von TGF- $\beta$ 2 nicht variierte. In Bezug auf die bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Rolle von TGF- $\beta$  in der Pathogenese der PH legt dieses Ergebnis die Vermutung nahe, dass zirkulierende Fibrozyten nicht ausschlaggebend für den erhöhten Serumspiegel von TGF- $\beta$ 1 bei PAH-Patienten sein können. Neben jenem Wachstumsfaktor scheint diese Zelllinie noch weitere proliferative Faktoren zu sezernieren, die zu einer vermehrten Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten beitragen. Um welche Faktoren es sich dabei genau handelt, muss in weiteren Studien geprüft werden

#### SDF-1 $\alpha$ (CXCL12)

Stromal-derived-factor (SDF) 1 $\alpha$  ist ein körpereigener Botenstoff der CXC-Motiv-Chemokine. Diesem Peptid wird eine wesentliche Rolle hinsichtlich des Lymphozyten-/Monozyten-Homings zu Orten vaskulärer Schädigung zugeschrieben. Zudem wird nach Freisetzung des Chemokins auch die Rekrutierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark zu Reparatur-, Remodelling- und Revaskularisationsprozessen gefördert. SDF-1 $\alpha$  vermittelt seine Effekte durch Bindung an zwei verschiedene Chemokinrezeptoren, CXCR4 und CXCR7 [65].

Verschiedene Laboratorien konnten einen migratorischen Effekt von SDF-1 $\alpha$  auf CXCR4+ zirkulierende humane Fibrozyten bestätigen [65, 69]. Im hypoxie-induzierten murinen Modell der PH resultierte eine Hochregulierung des Wachstumsfaktors VEGF in einer verstärkten Expression von SDF-1 $\alpha$  und führte letztlich zur vermehrten Mobilisierung und Retention mesenchymaler Vorläuferzellen in das pulmonale Stromgebiet [112-114]. Aus dieser Erkenntnis schlussfolgerten Young et al. [115], dass die CXCL12/CXCR4-Achse somit entscheidend für vaskuläre Umbauprozesse ist. Durch Inhibition dieser Achse gelang es der Arbeitsgruppe, die Rekrutierung von Progenitorzellen einzuschränken und ein vaskuläres Remodelling der Pulmonalarterien zu verhindern.

Die von uns erhobenen Daten zeigen, dass unstimulierte CXCR4+ Fibrozyten den Liganden CXCL12 produzieren. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kollektiven wurden nicht dokumentiert. Zu diesem Ergebnis kam auch die Arbeitsgruppe von Yeager et al. [92], die jugendliche Patienten mit PH untersuchten.

Vorausgesetzt, dass die Konzentration von CXCL12 im Serum von PH-Patienten erhöht ist, könnten zirkulierende Fibrozyten entlang dieses Gradienten zur Lunge migrieren und durch Rekrutierung weiterer Zellen den Fibrosierungsprozess unterhalten. Aufgrund der ungenügenden Datenlage war es uns allerdings nicht möglich, diese Hypothese zu beweisen.

#### P4HB (PROLYL-4-HYDROXYLASE BETA)

Prolyl-4-Hydroxylase beta (P4HB; P4Hbeta) ist das kodierende Gen für die  $\beta$ -Untereinheit der P4H, einem Schlüsselenzym in der Kollagensynthese, durch dessen Einwirkung Prolin-Reste in Alpha-Monomeren von Kollagen hydroxyliert werden. Dieser Syntheseschritt sichert die thermische Stabilität der Kollagen-Tripelhelix für die Freisetzung in die ECM [75].

Bereits 1997 publizierten Aiba und Kollegen [75], dass zirkulierende Fibrozyten nach Stimulation mit TGF- $\beta$  bzw. PDGF in geschädigtes Gewebe invadieren und durch die Expression von P4H die Gewebereparation unterstützen. Die Differenzierung dieser Vorläuferzellen spiegelte sich dabei in einem Verlust des Stammzellmarkers CD34 und einer vermehrten Sekretion von Kollagen wider [68]. Vor dem Hintergrund einer Dysregulation des TGF- $\beta$  bzw. PDGF-Signalwegs in der Pathogenese der PH lässt sich argumentieren, dass zirkulierende Fibrozyten über eine verstärkte Expression von P4H und einer damit verbundenen Produktion von Kollagen zum vaskulären Remodelling der Pulmonalgefäße beitragen könnten.

Wir konnten mittels qRT-PCR beweisen, dass unstimulierte zirkulierende Fibrozyten die beiden Gene P4HB und Kollagen exprimieren. Im Gegensatz zur Genexpression von Kollagen zeigten sich für P4HB signifikante Unterschiede zwischen PAH-Patienten und dem Kontrollkollektiv. Fibrozyten, die aus peripherem Blut von PAH-Patienten isoliert wurden, wiesen eine deutlich höhere Expression von PH4B auf als Zellen gesunder Probanden. Dies gibt Grund zur Annahme, dass zirkulierende Fibrozyten von PAH-Patienten durch eine vermehrte Aktivität von P4HB zum pulmonal vaskulären Remodelling beitragen. Es bleibt allerdings ungeklärt, warum dieser Mechanismus scheinbar nicht auf die postkapilläre Form der PH zutrifft. Unseren Daten zufolge korrelierte weder P4HB noch Kollagen mit der Zahl zirkulierender Fibrozyten. Interessanterweise kam die Arbeitsgruppe um Phillips zu einem konträren Ergebnis [65]. Im bleomycin-induzierten Modell der Lungenfibrose konnten sie eine Korrelation zwischen der Anzahl zirkulierender Fibrozyten und der Expression von Prokollagen 1

und 3 nachweisen. Allerdings kann diese Beobachtung nur bedingt auf diese Arbeit übertragen werden, da die IPF einer divergenten Pathogenese unterliegt.

## 5. Zusammenfassung

Die Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine vaskuloproliferative Erkrankung, die durch eine Druck- und Widerstandserhöhung in der pulmonalen Zirkulation charakterisiert ist. Heterogene strukturelle Veränderungen der distalen Pulmonalgefäße führen zu einer progredienten Obliteration des Lumens mit konsekutiver Erhöhung des pulmonal vaskulären Widerstands und einer vermehrten Rechtsherzbelastung. An der Progression des vaskulären Remodellings sind verschiedene zelluläre Mediatoren und Signalmechanismen beteiligt, die Hypertrophie, Hyperplasie und Deposition extrazellulärer Matrix-Komponenten induzieren.

Aktuelle Untersuchungen implizieren, dass die Rekrutierung von zirkulierenden mesenchymalen Vorläuferzellen, genannt Fibrozyten, zur Manifestation der PAH beiträgt. Diese fibroproliferativen Zellen begünstigen über autokrine und parakrine Signalwege die Initiation und Progression des vaskulären Remodellings der distalen Pulmonalgefäße und könnten somit ein interessantes pharmakologisches Target darstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle zirkulierender Fibrozyten in der Pathogenese der PAH zu untersuchen. Dazu wurden Fibrozyten aus peripher-venösem Blut von IPAH-Patienten (n = 54) und Patienten mit CVD assoziierter PAH (n = 12) isoliert, kultiviert und nach 7 Tagen mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Als Kontrolle dienten altersgematchte gesunde Kontrollprobanden (n = 23) sowie Patienten mit PVH (n = 20). Eine signifikante Erhöhung der Anzahl zirkulierender Fibrozyten bzw. adhärenter Zellen konnte bei Patienten mit PAH und PVH im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Interessanterweise konnte von einer vermehrten Rekrutierung dieser Vorläuferzellen nicht zwingend auf eine gesteigerte Expression der Zytokine PDGF-BB, VEGF-A, TGF- $\beta$  und SDF-1 $\alpha$  im Zellüberstand geschlossen werden. Lediglich für die Genexpression des Kollagen-I Schlüsselenzyms P4HB ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen PAH-Patienten und Kontrollkollektiv. In Bezug auf die klinische Bedeutung von Fibrozyten zeigte sich keine Korrelation zwischen Zellzahl und hämodynamischen Parametern, die den klinischen Schweregrad der PH widerspiegeln. Die Rekrutierung dieser Zellen konnte durch den Einsatz etablierter Medikamente in der Behandlung der PH nicht beeinflusst werden.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass zirkulierende Fibrozyten bei Patienten mit PAH vermehrt rekrutiert werden und zu einem gewissen Grad an pulmonalen

Gefäßumbauprozessen beteiligt sein können. Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen sind allerdings nur ansatzweise geklärt und müssen in weiterführenden Studien untersucht werden. Limitationen der Arbeit sind die relativ niedrigen Patientenzahlen in den einzelnen Subgruppen.

## **Summary**

Pulmonary Hypertension (PH) is a vasculoproliferative disorder, which is characterized by increased pulmonary artery pressure and pulmonary vascular resistance. Heterogeneous structural changes of distal pulmonary arteries are leading to a progressive obliteration of the vascular lumen associated with an elevation of pulmonary vascular resistance and subsequent right ventricular dysfunction. Different cellular mediators and signaling pathways induce the progression of pulmonary vascular remodelling via hypertrophy, hyperplasia and deposition of extracellular matrix proteins.

Recent studies provide evidence that the recruitment of circulating mesenchymal progenitor cells, named fibrocytes, contribute to the manifestation of PAH. These fibroproliferative cells have the ability to promote the initiation and progression of the vascular remodelling and seem to be an interesting pharmacological target.

Based on this background, the current thesis aimed to elucidate the role of circulating fibrocytes in the pathogenesis of PAH. Therefore we isolated fibrocytes from peripheral venous blood of patients suffering from IPAH (n = 54) and from CDV associated PAH (n = 12). After 7 days of cultivation the cells were quantified by fluorescence microscopy. We used healthy age-matched volunteers and patients with PVD (n = 20) as control subjects.

Fibrocytes resp. adherent cells were significantly elevated in patients with PAH and PVH compared to healthy control subjects. Interestingly fibrocytes numbers were not correlated with the expression of cytokines such as PDGF-BB, VEGF-A, TGF- $\beta$  and SDF-1 $\alpha$  recovered from cell culture supernate. The gene expression only for P4HB showed a significant difference between PAH patients and control subjects. Concerning the clinical value of fibrocytes we found no correlation between cell count and hemodynamic parameters, which reflect the clinical severity of the disease. The recruitment of these cells was not influenced by any established medications used in the treatment of pulmonary hypertension.

We have shown that the number of circulating fibrocytes is elevated in patients suffering from PH and these cells contribute to a certain extent to the pulmonary vascular remodelling.

Further investigations with respect to the kinetics of recruitment and their effect on vascular remodelling will be needed to understand the significance of this cell type in

the pathogenesis of pulmonary hypertension. The limitations of this study that need to be acknowledged are the relatively small numbers of patients in the particular subgroups.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	Alpha smooth muscle actin
ALK1	Activin receptor-like kinase 1
AUC	Area under the curve
BAL	Bronchiolo-alveoläre-Lavage
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMPR	Bone Morphogenic Protein Rezeptor
Bp	Basenpaare
CCR	C-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
cDNA	Komplementäre DNA
CI	Herzindex
CO	Herzeitvolumen
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1
CREST	Limitierte systemische Sklerodermie
CTEPH	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
CVD	Collagen vascular disease, bindegewebsassoziiert
CVP	Zentraler Venendruck
Cy3	Carboocyanin 3
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
ENG	Endoglin-Gen
ET-1	Endothelin-1
FCS	Foetal Bovine Serum
GDF	Growth and Differentiation Factor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor

GR	Glukokortikoidrezeptor
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HHT	hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPAH	Hereditäre pulmonal arterielle Hypertonie
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IN	Interferon
IPAH	Idiopathisch pulmonal arterielle Hypertonie
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
LSP-1	Lymphozytenspezifisches Protein 1
LUFU	Lungenfunktionstest
MCDT	Mischkollagenose
MCP	Makrophagen chemotaktisches Protein
MCSF	Makrophagen koloniestimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
M-MLV	Moloney- Murine-Leukemia Virus
mPAP	Mittlerer pulmonal arterieller Druck
mRNA	Messenger RNA
NO	Stickstoffmonoxid
PAH	Pulmonal arterielle Hypertonie
PAP	Pulmonal arterieller Druck
PBMC	Periphere blutmononukleäre Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
PCH	Pulmonale kapilläre Hämangiomatose
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PCWP	Pulmonalkapillardruckes
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PH	Pulmonale Hypertonie
PPH	Primäre pulmonale Hypertonie
PPV	Positiver prädiktiver Wert
PVH	Pulmonal venöse Hypertonie

PVOD	Pulmonal venookklusive Erkrankung
PVR	Pulmonal vaskulärer Widerstand
P4h	Prolyl-4-Hydroxylase
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
RAP	Rechtsatrialer Druck
RHK	Rechtsherzkatheter
RNA	Ribonukleinsäure
rT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
SAP	Serum Amyloid P
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SSc	systemische Sklerodermie
SvO <sub>2</sub>	Pulmonalarterielle (gemischtvenöse) Sauerstoffsättigung
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
tRNA	Transfer RNA
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
6 MWD	6-min-Gehtest

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktioneller Schweregrad der pulmonalen Hypertonie .....	3
Abbildung 2: Pathogenese der Pulmonalen Hypertonie .....	7
Abbildung 3: Fibrozytendifferenzierung, Migration und Funktion .....	14
Abbildung 4: Ficoll- Gradient nach Zentrifugation .....	27
Abbildung 5: Prinzip des Sandwich-ELISAs .....	34
Abbildung 6: Histogramm. Absolute Häufigkeitsverteilung des Studienkollektivs .....	37
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen zirkulierender Fibrozyten nach 7 Tagen Kultur .....	38
Abbildung 8: Box-Whisker-Plot Diagramm des absoluten Anteils zirkulierender Fibrozyten in 1ml Spender-Vollblut .....	40
Abbildung 9: Box-Whisker-Plot Diagramm des absoluten Anteils adhärenter Zellen in 1ml Spender-Vollblut.....	41
Abbildung 10: Box-Whisker-Plot Diagramm des absoluten Anteils zirkulierender Fibrozyten in 1ml Spender-Vollblut in Abhängigkeit von der Therapie .....	42
Abbildung 11: Box-Whisker-Plot Diagramm des absoluten Anteils adhärenter Zellen in 1ml Spender-Vollblut in Abhängigkeit von der Therapie.....	43
Abbildung 12: Scatterplot Zusammenhang Fibrozytenzahl – PVR.....	44
Abbildung 13: Scatterplot Zusammenhang Fibrozytenzahl – CI.....	45
Abbildung 14: Box-Whisker-Plot Diagramm der Konzentration von PDGF-BB .....	46
Abbildung 15: Box-Whisker-Plot Diagramm der Konzentration von CXCL12.....	47
Abbildung 16: Box-Whisker-Plot Diagramm der Konzentration von VEGF.....	47
Abbildung 17: Box-Whisker-Plot Diagramm der Konzentration von TGF- $\beta$ 2 .....	48
Abbildung 18: Nachweis der Amplifikate mittels Gelelektrophorese .....	49
Abbildung 19: Box-Whisker-Plot Diagramm der delta Ct-Werte von P4Hbeta in Bezug auf das Housekeepinggen GAPDH .....	50
Abbildung 20: Box-Whisker-Plot Diagramm der delta Ct-Werte von TGF $\beta$ in Bezug auf auf Housekeeping-Gen PBGD.....	51
Abbildung 21: Scatterplot Zusammenhang Fibrozytenzahl-Genexpression von P4Hbeta .....	52
Abbildung 22: Scatterplot Zusammenhang PVR – Genexpression von P4Hbeta .....	53
Abbildung 23: Scatterplot Zusammenhang PVR – Genexpression von TGF $\beta$ .....	53
Abbildung 24: Scatterplot Zusammenhang mPAP – Genexpression von P4Hbeta.....	54
Abbildung 25: Scatterplot Zusammenhang PVR – Genexpression von P4Hbeta .....	54

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie .....	4
Tabelle 2: Chemikalien .....	23
Tabelle 3: Pufferlösungen, Reaktionsansätze und Zellmedium .....	24
Tabelle 4: Antikörper, Enzyme und Markerproteine .....	25
Tabelle 5: Gebrauchsfertige Kits.....	25
Tabelle 6: Geräte .....	26
Tabelle 7: Zielsequenz der humanen Genome .....	31
Tabelle 8: Primersequenzen .....	31
Tabelle 9: Zytokine .....	34
Tabelle 10: Messwerte der Rechtsherzkatheter-Untersuchung.....	36

## 9. Literaturverzeichnis

1. Galie, N., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2009. **34**(6): p. 1219-63.
2. Peacock, A.J., et al., *An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension*. Eur Respir J, 2007. **30**(1): p. 104-9.
3. D'Alonzo, G.E., et al., *Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry*. Ann Intern Med, 1991. **115**(5): p. 343-9.
4. Olschewski, H., et al., *[Diagnosis and therapy of chronic pulmonary hypertension]*. Clin Res Cardiol, 2007. **96**(5): p. 301-30.
5. Barst, R.J., et al., *Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(12 Suppl S): p. 40S-47S.
6. Simonneau, G., et al., *Clinical classification of pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(12 Suppl S): p. 5S-12S.
7. Simonneau, G., et al., *Updated clinical classification of pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(1 Suppl): p. S43-54.
8. Humbert, M., et al., *Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(12 Suppl S): p. 13S-24S.
9. Stenmark, K.R., K.A. Fagan, and M.G. Frid, *Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms*. Circ Res, 2006. **99**(7): p. 675-91.
10. Pietra, G.G., et al., *Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(12 Suppl S): p. 25S-32S.
11. Stenmark, K.R., et al., *Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 134-45.
12. Stenmark, K.R., et al., *Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation*. J Appl Physiol, 2005. **98**(2): p. 715-21.
13. Perros, F., et al., *Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(1): p. 81-8.
14. Jiang, Y.L., et al., *Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts in hypoxic pulmonary vascular remodeling*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2006. **38**(1): p. 29-36.
15. Budhiraja, R., R.M. Tuder, and P.M. Hassoun, *Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension*. Circulation, 2004. **109**(2): p. 159-65.
16. Machado, R.D., et al., *Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(1 Suppl): p. S32-42.
17. 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*. Eur Heart J, 2004. **25**(24): p. 2243-78.
18. Schermuly, R.T., et al., *Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(8): p. 443-55.

19. McLaughlin, V.V., et al., *Prognosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines*. Chest, 2004. **126**(1 Suppl): p. 78S-92S.
20. Sitbon, O., et al., *Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Circulation, 2005. **111**(23): p. 3105-11.
21. Rich, S., E. Kaufmann, and P.S. Levy, *The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension*. N Engl J Med, 1992. **327**(2): p. 76-81.
22. Mereles, D., et al., *Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension*. Circulation, 2006. **114**(14): p. 1482-9.
23. Spisni, E., et al., *Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) synthase is a constitutively expressed enzyme in human endothelial cells*. Exp Cell Res, 1995. **219**(2): p. 507-13.
24. Moncada, S. and J.R. Vane, *Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin*. Pharmacol Rev, 1978. **30**(3): p. 293-331.
25. Barst, R.J., et al., *A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 296-302.
26. Barst, R.J., et al., *Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin*. Ann Intern Med, 1994. **121**(6): p. 409-15.
27. Simonneau, G., et al., *Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(6): p. 800-4.
28. Galie, N., et al., *Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(9): p. 1496-502.
29. Olschewski, H., et al., *Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension*. N Engl J Med, 2002. **347**(5): p. 322-9.
30. Voswinckel, R., et al., *Metered dose inhaler delivery of treprostinil for the treatment of pulmonary hypertension*. Pulm Pharmacol Ther, 2009. **22**(1): p. 50-6.
31. Tapsos, V.F., et al., *Oral Treprostinil for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension in Patients on Background Endothelin Receptor Antagonist and/or Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor Therapy (The FREEDOM-C Study): A Randomized Controlled Trial*. Chest, 2012.
32. Dupuis, J. and M.M. Hoeper, *Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension*. Eur Respir J, 2008. **31**(2): p. 407-15.
33. Giaid, A., et al., *Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension*. N Engl J Med, 1993. **328**(24): p. 1732-9.
34. Stewart, D.J., et al., *Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?* Ann Intern Med, 1991. **114**(6): p. 464-9.

35. Rubens, C., et al., *Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension*. Chest, 2001. **120**(5): p. 1562-9.
36. Galie, N., et al., *Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial*. Lancet, 2008. **371**(9630): p. 2093-100.
37. Ghofrani, H.A., I.H. Osterloh, and F. Grimminger, *Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(8): p. 689-702.
38. Sebkhi, A., et al., *Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Circulation, 2003. **107**(25): p. 3230-5.
39. Wharton, J., et al., *Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(1): p. 105-13.
40. Galie, N., et al., *Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension*. N Engl J Med, 2005. **353**(20): p. 2148-57.
41. Galie, N., et al., *Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension*. Circulation, 2009. **119**(22): p. 2894-903.
42. Jing, Z.C., et al., *Vardenafil treatment for patients with pulmonary arterial hypertension: a multicentre, open-label study*. Heart, 2009. **95**(18): p. 1531-6.
43. Schermuly, R.T., et al., *Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension*. Eur Respir J, 2008. **32**(4): p. 881-91.
44. Dumitrascu, R., et al., *Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling*. Circulation, 2006. **113**(2): p. 286-95.
45. Grimminger, F., et al., *First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2009. **33**(4): p. 785-92.
46. Schermuly, R.T., et al., *Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2811-21.
47. Patterson, K.C., et al., *Imatinib mesylate in the treatment of refractory idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Ann Intern Med, 2006. **145**(2): p. 152-3.
48. Souza, R., et al., *Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension*. Thorax, 2006. **61**(8): p. 736.
49. Ghofrani, H.A., W. Seeger, and F. Grimminger, *Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension*. N Engl J Med, 2005. **353**(13): p. 1412-3.
50. Herve, P., et al., *Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension*. Am J Med, 1995. **99**(3): p. 249-54.
51. Eddahibi, S., et al., *Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension*. J Clin Invest, 2001. **108**(8): p. 1141-50.
52. Guignabert, C., et al., *Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Circulation, 2005. **111**(21): p. 2812-9.

53. Bucala, R., et al., *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair*. Mol Med, 1994. **1**(1): p. 71-81.
54. Abe, R., et al., *Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7556-62.
55. Bucala, R., *Circulating fibrocytes: cellular basis for NSF*. J Am Coll Radiol, 2008. **5**(1): p. 36-9.
56. Bellini, A. and S. Mattoli, *The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses*. Lab Invest, 2007. **87**(9): p. 858-70.
57. Keeley, E.C., B. Mehrad, and R.M. Strieter, *The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of fibrotic disorders*. Thromb Haemost, 2009. **101**(4): p. 613-8.
58. Pilling, D., et al., *Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5537-46.
59. Pilling, D., et al., *Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7475.
60. Moeller, A., et al., *Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(7): p. 588-94.
61. Niedermeier, M., et al., *CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17892-7.
62. Pilling, D., N.M. Tucker, and R.H. Gomer, *Aggregated IgG inhibits the differentiation of human fibrocytes*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1242-51.
63. Herzog, E.L. and R. Bucala, *Fibrocytes in health and disease*. Exp Hematol, 2010.
64. Shao, D.D., et al., *Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(6): p. 1323-33.
65. Phillips, R.J., et al., *Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **114**(3): p. 438-46.
66. Moore, B.B., et al., *The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(2): p. 175-81.
67. Sakai, N., et al., *Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14098-103.
68. Quan, T.E., et al., *Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 598-606.
69. Mehrad, B., et al., *Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(1): p. 104-8.
70. Mehrad, B., M.D. Burdick, and R.M. Strieter, *Fibrocyte CXCR4 regulation as a therapeutic target in pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(8-9): p. 1708-18.
71. Chesney, J., et al., *Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 419-25.

72. Chesney, J., et al., *The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6307-12.
73. Hartlapp, I., et al., *Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo*. FASEB J, 2001. **15**(12): p. 2215-24.
74. Yang, L., et al., *Peripheral blood fibrocytes from burn patients: identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells*. Lab Invest, 2002. **82**(9): p. 1183-92.
75. Aiba, S. and H. Tagami, *Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids*. J Cutan Pathol, 1997. **24**(2): p. 65-9.
76. Yang, L., et al., *Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar*. Wound Repair Regen, 2005. **13**(4): p. 398-404.
77. Cowper, S.E., R. Bucala, and P.E. LeBoit, *Case 35-2004: nephrogenic fibrosing dermatopathy*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1723-4; author reply 1723-4.
78. Russo, R., et al., *Lack of increased expression of cell surface markers for circulating fibrocyte progenitors in limited scleroderma*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(7): p. 1136-41.
79. Mathai, S.K., et al., *Circulating monocytes from systemic sclerosis patients with interstitial lung disease show an enhanced profibrotic phenotype*. Lab Invest, 2010. **90**(6): p. 812-23.
80. Grobner, T., *Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermatopathy and nephrogenic systemic fibrosis?* Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(4): p. 1104-8.
81. Vakil, V., et al., *Gadolinium-containing magnetic resonance image contrast agent promotes fibrocyte differentiation*. J Magn Reson Imaging, 2009. **30**(6): p. 1284-8.
82. Cowper, S.E. and P.J. Boyer, *Nephrogenic systemic fibrosis: an update*. Curr Rheumatol Rep, 2006. **8**(2): p. 151-7.
83. Jimenez, S.A., et al., *Dialysis-associated systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermatopathy): study of inflammatory cells and transforming growth factor beta1 expression in affected skin*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(8): p. 2660-6.
84. Schmidt, M., et al., *Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 380-9.
85. Nihlberg, K., et al., *Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane?* Respir Res, 2006. **7**: p. 50.
86. Wang, C.H., et al., *Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(6): p. 583-91.
87. Saunders, R., et al., *Fibrocyte localization to the airway smooth muscle is a feature of asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(2): p. 376-84.
88. Pereira, R.F., et al., *Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4857-61.
89. Hashimoto, N., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 243-52.

90. Andersson-Sjoland, A., et al., *Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2129-40.
91. Moore, B.B., *Fibrocytes as potential biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(7): p. 524-5.
92. Yeager, M.E., et al., *Circulating fibrocytes are increased in children and young adults with pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2012. **39**(1): p. 104-11.
93. Hayashida, K., et al., *Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Chest, 2005. **127**(5): p. 1793-8.
94. Frid, M.G., et al., *Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage*. Am J Pathol, 2006. **168**(2): p. 659-69.
95. Nikam, V.S., et al., *Treprostinil inhibits the recruitment of bone marrow derived circulating fibrocytes in chronic hypoxic pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2010.
96. Quan, T.E. and R. Bucala, *Culture and analysis of circulating fibrocytes*. Methods Mol Med, 2007. **135**: p. 423-34.
97. Rubin, L.J., *Primary pulmonary hypertension*. N Engl J Med, 1997. **336**(2): p. 111-7.
98. Overbeek, M.J., et al., *Pulmonary arterial hypertension in limited cutaneous systemic sclerosis: a distinctive vasculopathy*. Eur Respir J, 2009. **34**(2): p. 371-9.
99. Ghofrani, H.A. and M.M. Hoeper, *[Drug combination treatment for pulmonary arterial hypertension]*. Dtsch Med Wochenschr, 2006. **131**(49 Suppl 9): p. S330-3.
100. McLaughlin, V.V., et al., *Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled clinical trial*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(18): p. 1915-22.
101. Jankov, R.P., et al., *A role for platelet-derived growth factor beta-receptor in a newborn rat model of endothelin-mediated pulmonary vascular remodeling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(6): p. L1162-70.
102. Selimovic, N., et al., *Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2009. **34**(3): p. 662-8.
103. Eddahibi, S., et al., *Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension. Effect of prostacyclin therapy*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(4 Pt 1): p. 1493-9.
104. Hirose, S., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension*. Pathol Int, 2000. **50**(6): p. 472-9.
105. Partovian, C., et al., *Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(6): p. 762-71.
106. Benisty, J.I., et al., *Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension*. Chest, 2004. **126**(4): p. 1255-61.

107. Clark, D.A. and R. Coker, *Transforming growth factor-beta (TGF-beta)*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(3): p. 293-8.
108. Bartram, U. and C.P. Speer, *The role of transforming growth factor beta in lung development and disease*. Chest, 2004. **125**(2): p. 754-65.
109. Rabinovitch, M., *The mouse through the looking glass: a new door into the pathophysiology of pulmonary hypertension*. Circ Res, 2004. **94**(8): p. 1001-4.
110. Deindl, E., et al., *Effect of intermittent high altitude hypoxia on gene expression in rat heart and lung*. Physiol Res, 2003. **52**(2): p. 147-57.
111. Morrell, N.W., et al., *Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins*. Circulation, 2001. **104**(7): p. 790-5.
112. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 858-64.
113. Burke, D.L., et al., *Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(2): p. L238-50.
114. Grunewald, M., et al., *VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells*. Cell, 2006. **124**(1): p. 175-89.
115. Young, K.C., et al., *Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Circ Res, 2009. **104**(11): p. 1293-301.

## 10. Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig 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. internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 11. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. med. R. Voswinkel für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Hilfestellungen sowie die hervorragende Betreuung bei der Entstehung dieser Dissertation. Besonders möchte ich ihm für seine freundschaftlichen Ratschläge in jeder Phase meiner Ausbildung danken.

Herrn Prof. Dr. med. W. Seeger danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung von technischen Mitteln im Labor.

Außerdem danke ich ganz herzlich Jens Wolff, Kirsten Szelepusa und der AG Mayer für die sorgfältige Einarbeitung in grundlegende Arbeitstechniken, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die zahlreichen Gespräche.

Weiterhin gilt mein ausdrücklicher Dank Herrn Dr. med. H. Gall. Ohne seine statistischen Kenntnisse und seine ausdauernde Hilfestellung wäre manches Problem wohl unüberwindbar geblieben.

Besonders erwähnt sei auch an dieser Stelle die gute Zusammenarbeit mit dem Team der Ambulanz für Pulmonale Hypertonie.

Nicht zuletzt gilt der größte Dank meiner Familie und meinem Freund, die mir immer eine unverzichtbare Unterstützung waren. Ich durfte zu jeder Zeit meiner Ausbildung uneingeschränkten Rückhalt erfahren und danke Euch hierfür aus tiefstem Herzen.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5949-1



9 783835 195949 1



