

Die Rolle der Mastzellen im vaskulären Remodelling bei Lungenhochdruck infolge von Linksherzerkrankung

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Julia Hoffmann
aus Ochsenhausen

Berlin, Januar 2012

1. Gutachter: Thomas Blankenstein
2. Gutachter: Wolfgang M. Kübler

Disputation am 12.10.2012

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------------------------|--|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS..... | I | |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | V | |
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Lungenhochdruck..... | 1 |
| 1.1.1 | Definition, Klassifizierung, Pathogenese | 1 |
| 1.1.2 | WHO-Klassifizierung..... | 2 |
| 1.1.2.1 | <i>Pulmonalerterielle Hypertonie (PAH)</i> | <i>3</i> |
| 1.1.2.2 | <i>Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen.....</i> | <i>4</i> |
| 1.1.2.3 | <i>Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des respiratorischen Systems und/oder Hypoxämie.....</i> | <i>4</i> |
| 1.1.2.4 | <i>Pulmonale Hypertonie bei chronisch thrombotischen und/oder embolischen Erkrankungen (CTEPH)</i> | <i>5</i> |
| 1.1.2.5 | <i>Pulmonale Hypertonie aufgrund anderer Erkrankungen.....</i> | <i>6</i> |
| 1.1.3 | Prävalenz, derzeitige Therapien | 6 |
| 1.1.3.1 | <i>Hoch-Dosis-Kalziumantagonisten</i> | <i>7</i> |
| 1.1.3.2 | <i>Prostazyklin und Prostazyklin-Analoga</i> | <i>7</i> |
| 1.1.3.3 | <i>Endothelin-Rezeptorantagonisten</i> | <i>8</i> |
| 1.1.3.4 | <i>Phosphodiesterase-5-Hemmer</i> | <i>9</i> |
| 1.1.3.5 | <i>Atriale Septostomie</i> | <i>10</i> |
| 1.1.3.6 | <i>Lungentransplantation.....</i> | <i>10</i> |
| 1.2 | Pulmonale Hypertonie mit Linksherzinsuffizienz | 10 |
| 1.3 | Kongestives Herzversagen | 12 |
| 1.4 | Vaskuläres Remodelling | 14 |
| 2 | ZIEL DER ARBEIT..... | 17 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 18 |
| 3.1 | Tiere..... | 18 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2 | Materialien | 18 |
| 3.2.1 | Chemikalien, Lösungen, Antikörper..... | 18 |
| 3.2.2 | PCR-Primer..... | 18 |
| 3.2.3 | Kommerziell erworbene Kits | 19 |
| 3.3 | Modell der pulmonalen Hypertonie infolge Linksherzinsuffizienz (suprakoronares Aortenbanding) | 19 |
| 3.4 | Modell der pulmonalarteriellen Hypertonie (Monocrotalininjektion) | 20 |
| 3.5 | Behandlung mit Ketotifen | 20 |
| 3.6 | Behandlung mit Cromoglicinsäure | 20 |
| 3.7 | Behandlung mit dem c-Kit spezifischen Inhibitor PLX..... | 20 |
| 3.8 | Hämodynamische Messungen..... | 21 |
| 3.9 | Kardiopulmonale Charakterisierung..... | 21 |
| 3.10 | Bestimmung des Lungenödems..... | 21 |
| 3.11 | Echokardiographie | 21 |
| 3.12 | Microarray Analysen | 22 |
| 3.13 | Bioinformatische Analysen..... | 22 |
| 3.14 | Real Time RT-PCR | 23 |
| 3.15 | Western Blot Analysen..... | 23 |
| 3.16 | Histologie, Immunhistologie und Analyse des vaskulären Remodellings | 24 |
| 3.17 | Mastzellakkumulation und Degranulation..... | 24 |
| 3.18 | Statistik | 25 |
| 4 | ERGEBNISSE..... | 26 |
| 4.1 | Differentiell regulierte Gene in PH mit Linksherzinsuffizienz | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2 | Akkumulation pulmonaler Mastzellen in Ratten mit PH..... | 29 |
| 4.3 | Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen auf den pulmonalen Gefäßumbau und die Entwicklung der PH bei Linksherzinsuffizienz | 31 |
| 4.4 | Vaskuläres Remodelling und PH mit Linksherzinsuffizienz in mastzelldefizienten Ws/Ws Ratten..... | 37 |
| 4.5 | Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen in der Monocrotalin-induzierten PH | 41 |
| 4.6 | Vaskuläres Remodelling und Monocrotalin-induzierte PH in mastzelldefizienten Ws/Ws Ratten..... | 42 |
| 4.7 | Auswirkungen des Mastzellstabilisators Cromoglicinsäure (Cromolyn Sodium Salt (CSS)) oder des c-Kit spezifischen Inhibitors PLX in der Monocrotalin-induzierten PH..... | 44 |
| 4.7.1 | Hämodynamik, Rechtsventrikelhypertrophie und pulmonalvaskuläres Remodelling | 44 |
| 4.7.2 | Mastzellzahlen und Ganulationsindizes..... | 46 |
| 5 | DISKUSSION..... | 48 |
| 5.1 | PH..... | 48 |
| 5.2 | Diskussion der eingesetzten Methoden und ihrer potentiellen Limitationen | 48 |
| 5.2.1 | Rattenmodell der PH mit Linksherzinsuffizienz durch Aortenbanding..... | 50 |
| 5.2.2 | Rattenmodell der PAH durch Monocrotalin | 51 |
| 5.2.3 | Verwendete Interventionen | 52 |
| 5.2.3.1 | <i>Mastzellstabilisatoren</i> | 52 |
| 5.2.3.2 | <i>Mastzelldefiziente Ratten</i> | 52 |
| 5.2.4 | Untersuchte Parameter | 53 |
| 5.3 | Mastzellen..... | 54 |
| 5.3.1 | Hintergrund | 54 |
| 5.3.2 | Herkunft..... | 55 |
| 5.3.3 | Heterogenität..... | 55 |
| 5.3.4 | Aktivierung | 56 |
| 5.3.5 | Produkte der Mastzelle | 57 |
| 5.3.6 | Funktionen | 58 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.4 | Mastzellen und PH..... | 59 |
| 5.5 | Abschließende Betrachtungen und Ausblick..... | 65 |
| 6 | REFERENZEN | 67 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG | 79 |
| 8 | SUMMARY..... | 80 |
| 9 | PUBLIKATIONSVERZEICHNIS | I |
| 9.1 | Originalarbeiten und Reviews | I |
| 9.2 | Kurzveröffentlichungen und Posterabstracts..... | II |
| 9.3 | Auszeichnungen und Preise | IV |
| | DANKSAGUNG | |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| AO | engl.: aortic banding, Aortenbanding |
| AP | engl.: arterial pressure, arterieller Druck |
| BSA | engl.: bovine serum albumin, bovines Serumalbumin |
| bw | engl.: body weight, Körpergewicht |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| cDNA | copyDNA |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat |
| CHF | engl.: congestive heart failure, kongestives Herzversagen |
| COPD | engl.: chronic obstructive pulmonary disease, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EC | engl.: endothelial cell, Endothelzelle |
| ECL | engl.: enhanced chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EKG | Elektrokardiographie |
| FCS | engl.: fetal calf serum, fötales Kälberserum |
| FGF | engl.: Fibroblast Growth Factor |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GM-CSF | engl.: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor |
| GMP | Guanosinmonophosphat |
| GO | engl.: gene ontology class, Genklasse |
| Hg | lat.: hydrargyrum, Quecksilber |
| IgG | Interleukin G |
| IOG | engl.: index of granulation, Granulationsindex |
| kDa | Kilodalton |

| | |
|---------------------------|--|
| KG | Körpergewicht |
| KH_2PO_4 | Kaliumhydrogenphosphat |
| LAP | engl.: left atrial pressure, linksatrialer Druck |
| LV | engl.: left ventricle, linker Ventrikel |
| MCT | Monocrotalin |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaHCO_3 | Natriumhydrogencarbonat |
| Na_2HPO_4 | Natriumhydrogenphosphat |
| NaOH | Natronlauge |
| NGF | engl.: Nerve Growth Factor |
| NO | engl.: nitric oxide, Stickstoffmonoxid |
| NP | engl.: natriuretic peptide, natriuretisches Peptid |
| NYHA | New York Heart Association |
| OD | optische Dichte |
| PAH | pulmonalarterielle Hypertonie |
| PAPm | pulmonalarterieller Mitteldruck |
| PAPs | systolischer pulmonalarterieller Mitteldruck |
| PBS | engl.: phosphate buffered saline |
| PDE5 | Phosphodiesterase 5 |
| PDGF | engl.: Platelet Derived Growth Factor |
| PEA | pulmonale Endarteriektomie |
| PH | engl.: pulmonary hypertension, pulmonale Hypertonie/pulmonaler Lungenhochdruck |
| PVR | engl.: pulmonary vascular resistance, pulmonalvaskulärer Widerstand |
| ROS | engl.: reactive oxygen species, reactive Sauerstoffspezies |
| rpm | engl.: rotations per minute, Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RV | engl.: right ventricle, rechter Ventrikel |
| RVSP | engl.: right ventricular systolic pressure, rechtsventrikulärer systolischer Druck |

| | |
|---------------|---|
| SAP | engl.: systemic arterial pressure, systemischer arterieller Druck |
| SCF | engl.: stem cell factor, Stammzellfaktor |
| SD | engl.: standard deviation, Standardabweichung |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SEM | engl.: standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes |
| SMC | engl.: smooth muscle cell, glatte Muskelzelle |
| SVR | engl.: systemic vascular resistance, systemisch vaskulärer Widerstand |
| TBST | engl.: Tris buffered saline Tween20 |
| TGF | engl.: Transforming Growth Factor |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor alpha |
| üN | über Nacht |
| VEGF | engl.: Vascular Endothelial Growth Factor |
| WHO | engl.: world health organization |
| WT | Wildtyp |

1 EINLEITUNG

1.1 Lungenhochdruck

1.1.1 Definition, Klassifizierung, Pathogenese

Lungenhochdruck (pulmonale Hypertonie, PH) ist definiert als eine chronische Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (PAP) auf mehr als 25 mmHg im Ruhezustand oder mehr als 30 mmHg bei Belastung (1).

Klinisch kann die PH unabhängig von ihrer Ursache nach rein funktionellen Kriterien eingeteilt werden: **Schweregrad**, **Reversibilität** und **zeitlicher Verlauf** (1;2).

Je nach Ausprägung der pulmonalarteriellen Drucksteigerung lassen sich vier funktionelle **Schweregrade** der PH unterscheiden, die den WHO-Gruppen I bis IV entsprechen. Bei der Klasse I, der asymptomatischen PH, sind minimale Symptome und bei normaler Anstrengung keine Beschwerden zu erwarten. Bei der Klasse II, der leichten (latenten) PH liegt der PAP in Ruhe im Normalbereich unter 20 mmHg, erreicht aber unter Belastung Werte über 28 mmHg. Dyspnoe und Erschöpfungszustände sind bereits bei normaler Anstrengung zu verzeichnen. In Klasse III, der mittelschweren (manifesten) PH, liegt der PAP bereits in Ruhe über 20 mmHg und es kommt bereits bei minimaler Belastung zu Dyspnoe, Erschöpfung und Brustschmerzen. Außerdem fällt der pulmonalvaskuläre Widerstand (PVR) unter Belastung deutlich weniger ab, entsprechend steigt der PAP steil an. Die Klasse IV, die schwere PH ist dadurch charakterisiert, dass schon in Ruhe das Herzminutenvolumen stark reduziert ist und unter Belastung kaum ansteigt. Diese Patienten sind kaum noch körperlich belastbar, ihre venöse Sauerstoffsättigung liegt auch in Ruhe unter 60% bei massiv erhöhtem pulmonalarteriellem Druck.

Die pulmonale Drucksteigerung findet mehrheitlich in den kleinen Arterien und Arteriolen der Lungenstrombahn statt. Diese Gefäße bilden mit ihrer muskelstarken Media die eigentlichen Widerstandsgefäße. Die chronische Drucksteigerung kommt im Wesentlichen über drei pathogenetische Faktoren zustande, nämlich über

- eine Mikrothrombosierung der Gefäßbahn

- eine übermäßige Engstellung der Gefäße durch ein Ungleichgewicht von vasokonstriktiven und vasodilatativen Faktoren
- einen fibrotischen Gefäßumbau („Remodelling“) mit Bildung einer dicken Innenschicht (Neo-Intima) und Hyperplasie der Gefäßmuskelzellen in der Gefäßmedia.

Die **Reversibilität** umfasst ein weiteres funktionelles Kriterium in der Einteilung der PH. Bei der *Reversibilitätsprüfung* wird mit Sauerstoffinsufflation oder der inhalativen bzw. systemischen Gabe eines Vasodilatators getestet, ob eine diagnostizierte Erhöhung des PVR entweder partiell oder vollständig reversibel oder aber irreversibel ist und damit ein funktionell fixierter Gefäßumbau vorliegt.

Eine andere klinische Einteilung der PH orientiert sich am **zeitlichen Verlauf** der Erkrankung. Man unterscheidet hierbei chronische (Monate bis Jahre) und akute (sprunghafter Anstieg des PAP) PH. Die akute Form tritt als Folge einer größeren Embolisation der Lungenstrombahn durch Einschwemmung von thrombotischem oder nicht-thrombotischem Material, durch eine akute pulmonalhypertensive Krise bei bereits persistierender chronischer PH oder in Form des Endstadiums einer chronischen PH mit irreversibler Überschreitung der Toleranzwerte auf.

1.1.2 WHO-Klassifizierung

Klassischerweise wurde die PH früher in primäre (kein Auslöser des Gefäßumbaus bekannt) und sekundäre PH (bekannter Auslöser) untergliedert.

Heutzutage orientiert man sich an der klinischen Klassifizierung der pulmonalen Hypertonie (Abbildung 1), die 2008 auf dem vierten Weltsymposium für PH der WHO in Dana Point, USA vorgestellt wurde (3). Entsprechend der Pathogenese, Pathophysiologie und spezifischer therapeutischer Interventionen kann die chronische PH nun, wesentlich präziser, in fünf Klassen eingeteilt werden. Die klassische Form der primären PH ist nach dieser Einteilung nur eine Unterform der Klasse 1 (PAH). Die ehemals sekundären Formen der PH befinden sich nun in den Klassen 2-5, die durch unterschiedliche Grunderkrankungen bedingt werden.

- 1. pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)**
 - 1.1 idiopathische PAH (IPAH)
 - 1.2 familiäre PAH (FPAH) - genetische Determination
 - 1.3 PAH assoziiert mit anderen Erkrankungen, Medikamenten / Drogen / Toxinen, (APAH) - Bindegewbserkrankungen / Kollagenosen, angeborene Shuntvitien, portale Hypertension, HIV- Infektion
 - 1.4 PAH mit venöser / kapillärer Manifestation - pulmonal venookklusive Erkrankungen (PVOD), pulmonalkapilläre Hämangiomatose (PCH)
 - 1.5 Persistierende PH des Neugeborenen (PPHN)
- 2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen**
 - 2.1 atrial
 - 2.2 ventrikulär
 - 2.3 valvulär
- 3. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des respiratorischen Systems und / oder Hypoxämie**
 - 3.1 COPD
 - 3.2 interstitielle Lungenerkrankungen
 - 3.3 Schlafapnoesyndrom
 - 3.4 Hypoventilation
 - 3.5 Höhenbewohner
 - 3.6 andere Lungenerkrankungen
- 4. Pulmonale Hypertonie bei chronisch thrombotischen u. / o. embolischen Erkrankungen (CTEPH)**
 - 4.1 thromboembolische Obstruktion der proximalen / distalen Pulmonalarterien
 - 4.2 Tumormaterial
 - 4.3 Parasiten
 - 4.4 Fremdkörper
- 5. Pulmonale Hypertonie aufgrund anderer Erkrankungen**
 - 5.1 Sarkoidose
 - 5.2 Langerhanszell - Histiozytose
 - 5.3 Kompression der Pulmonalgefäße u. a.

Abbildung 1: Einteilung der pulmonalen Hypertonie in Anlehnung an die Klassifikation der WHO (Dana Point 2008). Je nach zugrundeliegender Erkrankung wird die PH in 5 Klassen unterteilt, die wiederum zahlreiche Unterkategorien haben.

1.1.2.1 Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

PAH ist eine seltene und schwerwiegende Erkrankung mit einer geschätzten Häufigkeit von 2-6 per 1.000.000 Individuen pro Jahr (4). In 6-10% aller Fälle wurde mindestens ein betroffener Verwandter diagnostiziert. Dies legt nahe, dass es eine erbliche genetische Komponente in einer Subpopulation dieser Form der PH, der FPAH (familial pulmonary arterial hypertension) gibt. Im Jahr 2000 identifizierten zwei Gruppen unabhängig voneinander in Patienten mit FPAH heterozygote Keimzellmutationen im bone morphogenetic protein type II Rezeptor (BMPRII), einem Rezeptor der transforming growth factor (TGF)- β Superfamilie (5). Seitdem wurden 144 eindeutige Mutationen in 210 unabhängigen Patienten mit FPAH nachgewiesen (6). Ähnliche Mutationen wurden in ca. 25% aller IPAH Patienten gefunden. Andere, bereits nachgewiesene Mutationen in IPAH

Patienten schließen einen anderen TGF- β Rezeptor und die Activin-Rezeptor ähnliche Kinase Typ 1 ein (7). Des Weiteren wurde erforscht, dass eine Variante des Serotonintransporter 5-HTT Promoters in 65% der IPAH Patienten im Vergleich zu 27% der Kontrollen homozygot vorliegt (8). In dieser Klasse befinden sich auch PH Erkrankungen, die mit einer Begleiterkrankung einhergehen. Eine Assoziation der PH mit Bindegewebserkrankungen (CREST-Syndrom) (9), mit portaler Hypertension (10) und Leberzirrhose (11), mit HIV- (12) oder Hepatitis-C-Infektionen (13) oder diätetisch, medikamentös und toxisch ausgelöster PH ist bekannt. Obwohl die Inzidenz der PAH verhältnismäßig gering ist, wurden bereits zahlreiche präklinische und klinische Studien durchgeführt, die wie in 1.1.3 beschrieben, zu einer Vielzahl an verfügbaren Therapien geführt haben.

1.1.2.2 Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen

In chronischer Linksherzinsuffizienz wird die PH einerseits durch einen kongestiven Anstieg der pulmonalvaskulären Drücke bedingt. Oft kommt allerdings andererseits noch erschwerend eine gleichzeitige Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstandes hinzu, welche die rechtsventrikuläre Nachlast noch weiter erhöht, die rechtsventrikuläre Leistung limitiert und im Endstadium zum rechtsventrikulären Versagen führt (14). Ausführlich wird diese Klasse der PH in 1.2 beschrieben.

1.1.2.3 Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des respiratorischen Systems und/oder Hypoxämie

Grundsätzlich lassen sich hier zwei Gruppen unterscheiden. Zum einen, die Hypoventilation bei Lungenerkrankungen, in die die chronisch obstruktive Bronchitis, die Bronchiolitis, das chronisch obstruktive Emphysem, das chronische Asthma bronchiale sowie zystische Fibrose und andere Lungenfibrosen fallen. Die zweite Gruppe der Hypoventilation aufgrund extrapulmonaler Erkrankungen beinhalten Schlafapnoe sowie Störungen der Atmung durch knöchernerne, muskuläre, pleurale oder neurologische Funktionseinschränkungen. Beim gesunden Menschen kann eine chronisch alveoläre Hypoxie auch durch Aufenthalte in großen Höhenlagen bedingt sein.

Neben erblichen Ursachen und Mutationen konnte gezeigt werden, dass Hypoxie eine vorrangige pathologische Rolle in vielen PH-Fällen spielt (15). Während akute

Hypoxie systemisch Gefäße dilatiert, resultiert chronische Hypoxie in pulmonalen Arterien und Venolen in massiver Vasokonstriktion (hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV). Zelluläre und molekulare Mechanismen, die der HPV zugrunde liegen, stehen seit mehreren Dekaden im Fokus intensiver Forschungsbemühungen. Aktuelle Konzepte sprechen den Redoxereignissen beim Sauerstoffsensing in pulmonalen glatten Muskelzellen eine zentrale Rolle zu (16). Dabei stehen sich zwei gegensätzliche Modelle gegenüber: einerseits soll ein Abfall an PO_2 die Bildung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verringern, andererseits soll Hypoxie einen paradoxen Anstieg der mitochondrialen ROS Produktion bedingen.

1.1.2.4 Pulmonale Hypertonie bei chronisch thrombotischen und/oder embolischen Erkrankungen (CTEPH)

Die Inzidenz der Erkrankung wird in den USA auf 2.500 neue Fälle pro Jahr, die theoretische Prävalenz auf 3,8 Fälle pro hundert Pulmonalembolien (20/Million Einwohner) geschätzt (17). Das Spektrum des venösen Thromboembolismus umfasst die tiefe Beinvenenthrombose, den akuten Thrombus in Transit durch das rechte Herz, die akute Pulmonalembolie sowie die chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH). Die Pulmonalembolie kann rezidivieren und schwere Spätfolgen wie das postthrombotische Syndrom und CTEPH nach sich ziehen. Sie entsteht durch Obstruktion der Lungengefäße mit organisierten Gerinnseln. Es wird heute auf der Basis einer prospektiven Langzeituntersuchung an rund 300 Patienten vermutet, dass in 3,8% der Patienten mit symptomatischen, überlebten Pulmonalembolien innerhalb von zwei Jahren nach dem ersten Ereignis eine CTEPH resultiert. Eine frühere Pulmonalembolie, junges Alter, ein großer Perfusionsdefekt und idiopathische Präsentation waren mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für ein späteres Auftreten einer CTEPH assoziiert. Trotz dieser Beobachtungen bleibt die Pathogenese der CTEPH ungeklärt. Ansatzpunkte für pathophysiologische Konzepte sind die Beschreibung bakterieller Infektionen, nicht auflösender Thromben und abnormer Fibrinogenvarianten bzw. abnormer Spaltbarkeit von Fibrinogen durch Plasminogenaktivatoren. Im Gegensatz zur PAH, die sich in Gefäßen manifestiert die $<300\mu\text{m}$ im Querschnitt messen, wird die CTEPH durch die primäre Betroffenheit der großen Pulmonalgefäße charakterisiert. Die Diagnose und

Therapie der CTEPH sind eine interdisziplinäre Leistung. Die Diagnose wird auch heute noch auf einen positiven Perfusionsscan bei Lungenhochdruck gestützt. Die Therapie der Wahl ist die chirurgische Endarteriektomie des pulmonalokklusiven Materials (PEA), die in 80 Prozent aller Patienten zu einer funktionellen Heilung führt. Sie ist mit einer Operationsmortalität von vier bis zehn Prozent und einer hohen Lebensqualität, Belastbarkeit und häufig Normalisierung der Ruhe-Hämodynamik gut geeignet (18).

1.1.2.5 Pulmonale Hypertonie aufgrund anderer Erkrankungen

Einige insgesamt seltene Erkrankungen können sich direkt an den Lungengefäßen manifestieren und so eine pulmonale Hypertonie bedingen. Sie sind in dieser Klasse 5 zusammengefasst. Hierzu zählen inflammatorische Erkrankungen mit bekanntem infektiösem (Schistosomiasis) (19) oder unbekanntem (Sarkoidose) Auslöser (20). Des Weiteren ist in dieser Gruppe die pulmonalkapilläre Hämangiomatose angesiedelt. Die Okklusion des pulmonalen Strombettes kommt bei dieser Erkrankung durch eine proliferative Gefäßwandveränderung im Kapillarbett der Lunge zustande (21).

1.1.3 Prävalenz, derzeitige Therapien

Die Inzidenzrate der PH liegt bei 1,9/ Millionen Einwohnern (22;23). Die Prävalenz variiert stark zwischen den PH-Klassen: Gruppe 1 ist mit 30-135/Mio. eine seltene Erkrankung, Gruppe 2 mit ca. 4000/Mio. die Gruppe mit der höchsten Prävalenz. Gruppe 3 liegt bei 2266-5948/Mio., Gruppe 4 bei 52-70/Mio. Erkrankungen und über Gruppe 5 konnten bislang keine zuverlässigen Daten erhoben werden (24). Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer. Die Erkrankung manifestiert sich üblicherweise zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr.

Trotz eindeutiger Zahlen die Prävalenz betreffend, wurden zur Gruppe 1 der PH in der Vergangenheit mehr als 2000 vorklinische Studien durchgeführt, in der am häufigsten betroffenen Gruppe 2 der PH hingegen weniger als 50 vorklinische Studien.

Eine Heilung der PH ist bis heute (unabhängig von der Form) jedoch nicht möglich. Gezielte Therapieverfahren können allerdings insbesondere bei der PAH zu einer deutlichen Verbesserung der Lebenserwartung, der körperlichen

Belastbarkeit und der Lebensqualität führen. Hauptansatzpunkte sind dabei die Vasodilatation und die Verhinderung oder Verlangsamung des Gefäßumbaus.

Eine dauerhaft erfolgreiche Behandlung setzt voraus, dass eine zur PH führende Grunderkrankung rechtzeitig erkannt und therapiert wird, bevor eine fixierte pulmonale Hypertonie eintritt. Geschieht das zu spät oder ist es medizinisch nicht möglich, ist lediglich eine palliative Behandlung mit Medikamenten oder eine Lungen- oder Herz-Lungen-Transplantation möglich.

Die medikamentöse Therapie des pulmonalen Hochdrucks ist schwierig. Es sind einige Arzneistoffe für die Therapie der PAH, teilweise mit Einschränkungen, zugelassen (25). Für andere Formen der pulmonalen Hypertonie besteht keine behördliche Zulassung.

Es kommt daher allenfalls eine Behandlung im Rahmen eines Therapieversuchs (sogenannter off-label use) in Frage. Während Thrombosierung und Vasokonstriktion mit oralen Antikoagulantien und modernen Vasorelaxantien wie Bosentan, Sildenafil und Prostanoiden therapeutisch beeinflusst werden können, sind die Faktoren, die das Remodelling der Gefäße steuern, noch weitgehend unklar.

1.1.3.1 Hoch-Dosis-Kalziumantagonisten

Hochdosierte Kalziumantagonisten wie Nifedipin, Diltiazem, Verapamil oder Amlodipin können bei Patienten mit idiopathischer und familiärer PAH mit starker pulmonaler Vasoreaktivität zu einer sehr guten langfristigen Verbesserung der Hämodynamik und der Belastbarkeit führen, indem sie den transmembranären Einstrom von Kalziumionen in die Gefäßmuskelzellen hemmen. Generell finden sich Patienten mit akuter Vasoreaktivität und gutem Ansprechen auf die chronische Gabe von Kalziumkanalblockern vor allem in der Gruppe der IPAH Patienten (26).

1.1.3.2 Prostazyklin und Prostazyklin-Analoga

Prostaglandine, insbesondere Prostazykline, sind wichtige Stoffwechselprodukte von Eikosanoiden, vor allem der Arachidonsäure, die durch das Enzym Phospholipase A₂ vermehrt aus der Zellmembran freigesetzt wird. Im Gefäßendothel wirken Prostazykline relaxierend auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand, indem sie die intrazelluläre Produktion von zyklischem

Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert (27). Zudem verhindern sie das Wachstum von Gefäßmuskelzellen und hemmen die Aggregation von Blutplättchen (28).

Intravenös verabreichtes Prostazyklin (Epoprostenol, Flolan®) wird seit den frühen 1980er Jahren in vielen Ländern als Standardtherapie der schweren PAH eingesetzt. Aufgrund seiner kurzen Plasmahalbwertszeit von drei Minuten kann Epoprostenol nur kontinuierlich intravenös infundiert werden. Für eine Langzeittherapie wird es deshalb über eine tragbare Infusionspumpe verabreicht. Dies ist mit vielen Nebenwirkungen und Komplikationen verbunden und führte zur Entwicklung der Prostazyklin-Analoga, die subkutan, oral oder per Inhalation verabreicht werden können.

Intravenös appliziertes Iloprost (Ventavis®, Ilomedin®), ein chemisch stabiles Prostazyklin-Analogon, ist eine solche Alternative zum intravenös verabreichten Epoprostenol und wird in Deutschland trotz des niedrigen Evidenzgrades bevorzugt.

Inhalatives Iloprost wird seit Mitte der 90er Jahre in Deutschland für die Therapie der PAH verwendet und verspricht eine pulmonal selektive Aktivität. 2009 konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass inhaliertes Iloprost auch für die Klasse 2 der PH therapeutischen Nutzen haben kann (29).

1.1.3.3 Endothelin-Rezeptorantagonisten

Endotheline sind potente vasokonstriktorische Proteine, von denen drei humane Isoformen bekannt sind: ET₁, ET₂ und ET₃ (30). ET₁ soll in der Pathogenese der PAH eine wichtige Rolle spielen und übt seine Effekte über zwei Rezeptorsubtypen aus: ET_A (lokalisiert auf glatten Muskelzellen der Gefäße) sowie ET_B (auf glatten Muskelzellen und Gefäßendothelien).

Bosentan (Tracleer®) ist seit 2002 in Europa zugelassen. Es ist ein dual selektiver Endothelin-Rezeptorantagonist, der einerseits die Antagonisierung der vasokonstriktiv wirksamen Endothelin-A-Rezeptoren aktiviert sowie andererseits B- Rezeptoren der Gefäßmuskelzellen aktiviert und die Proliferation dieser hemmt (31). Sitaxentan (Thelin®) (32) und Ambrisentan (33) hingegen antagonisieren selektiv die Endothelin-A-Rezeptoren der Gefäßmuskelzellen, zeigten in klinischen Studien gegenüber Bosentan allerdings kein überlegenes Wirkungsprofil.

1.1.3.4 Phosphodiesterase-5-Hemmer

Sildenafil (Revatio®) inhibiert die Phosphodiesterase 5, Guanysinmonophosphat (GMP) wird nicht mehr zu cyclischem Guanysinmonophosphat (cGMP) abgebaut und somit kommt zu einem Anstieg des cGMP in den Gefäßmuskelzellen. Ein Anstieg an intrazellulärem cGMP verhindert den Kalziumeinstrom in die Zelle. Niedrige intrazelluläre Kalziumkonzentrationen resultieren in einer Entspannung der glatten Gefäßmuskelzellen.

Kombinationstherapien von Sildenafil mit Bosentan (34) oder Prostanoiden (35) werden empfohlen. 2011 konnte in präklinischen Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Sildenafil auch für die Klasse 2 der PH präventiv (36) und therapeutisch eingesetzt werden kann.

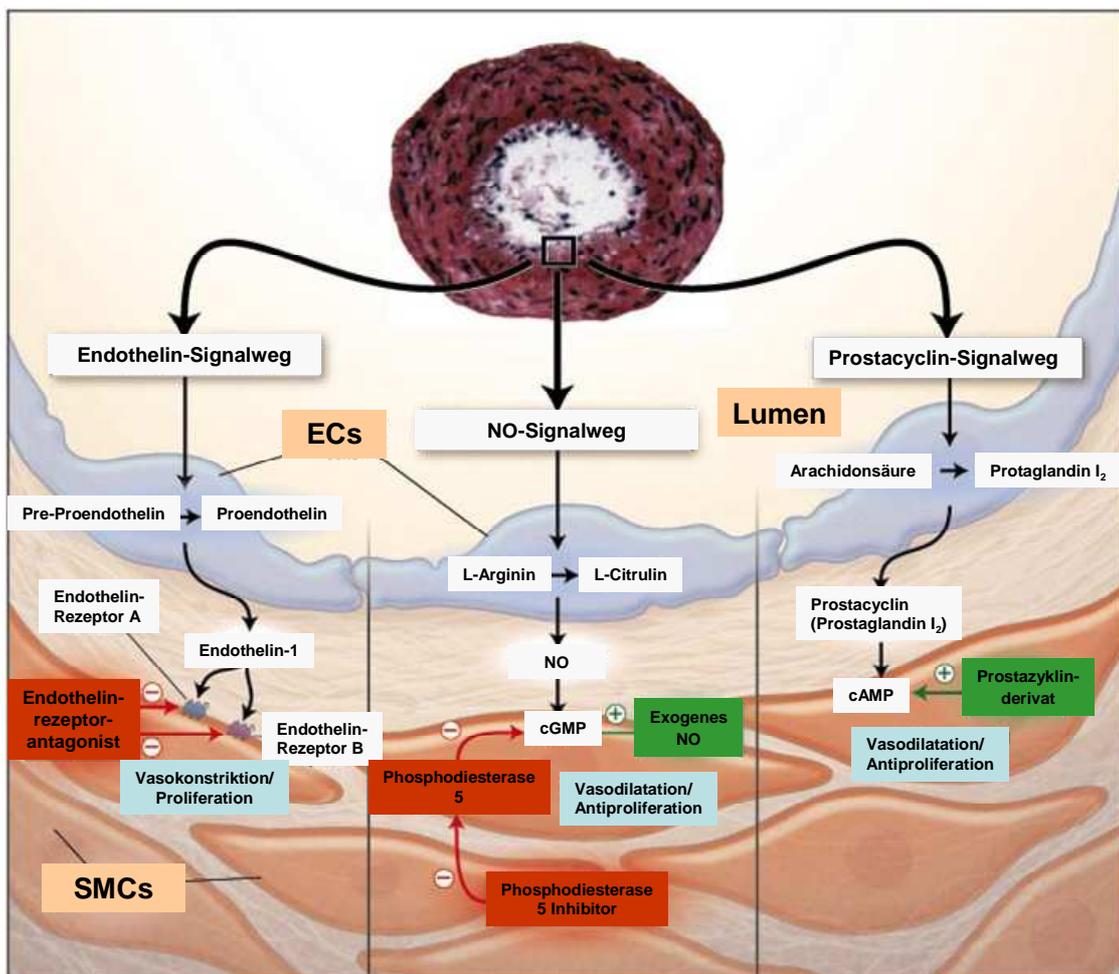


Abbildung 2: Pharmakologische Ansätze heutiger Therapien bei PH, nach Humbert *et al.* (37). Angriffspunkte für pharmakologische Interventionen bei PH sind in rot (Inhibitoren) und grün (Aktivatoren) dargestellt. SMCs: glatte Muskelzellen, ECs: Endothelzellen.

1.1.3.5 Atriale Septostomie

Dieser sekundär verursachte Vorhofseptumdefekt (Shuntverbindung zwischen dem großen und kleinen Kreislauf) kann Prognose und Symptome der PH verbessern. Dabei wird ein Ballonkatheter transseptal platziert und im Vorhofseptum schrittweise aufdilatiert, bis die arterielle Sauerstoffsättigung deutlich abfällt. Trotz dieses Abfalls in der arteriellen Sauerstoffsättigung steigt der Sauerstofftransport an, es kommt zu einer Entlastung des rechten Herzens durch einen Rechts-links-Shunt und zur Zunahme des Herzminutenvolumens (38).

1.1.3.6 Lungentransplantation

Wenn medikamentöse Behandlungen nicht mehr ansprechen, bleibt als *ultima ratio* die Lungentransplantation. Jedoch liegt die Mortalitätsrate bei 25% in den ersten Wochen nach OP, bei 35-40% nach einem Jahr. Das mittlere Überleben beträgt ein Jahr (39).

1.2 Pulmonale Hypertonie mit Linksherzinsuffizienz

Obwohl es noch keine verlässlichen statistischen Daten für diese Gruppe des Lungenhochdrucks gibt, wird die Linksherzinsuffizienz als eine der häufigsten Ursachen für PH angesehen (22;40). 60-80% der Patienten mit chronischem Herzversagen systolischen oder diastolischen Ursprungs entwickeln eine PH (41). Dies macht PH zu einem unabhängigen Prädiktor für die Mortalität in dieser Patientenpopulation (42-44).

Linksseitige atriale, ventrikuläre oder valvuläre Herzerkrankungen stellen die häufigste Ursache für PH dar und resultieren in pulmonaler endothelialer Dysfunktion, erheblichen vaskulären und interstitiellen Umbauprozessen, einschließlich medialer Hypertrophie und septaler, ventrikulärer Verdickung (40). Eine endotheliale Dysfunktion der pulmonalen Mikrogefäße beschleunigt den Prozess des Gefäßumbaus (Remodelling) und erhöht den vaskulären Tonus. Folglich entsteht eine PH und es erhöht sich das Risiko des Rechtsherzversagens (Abbildung 3).

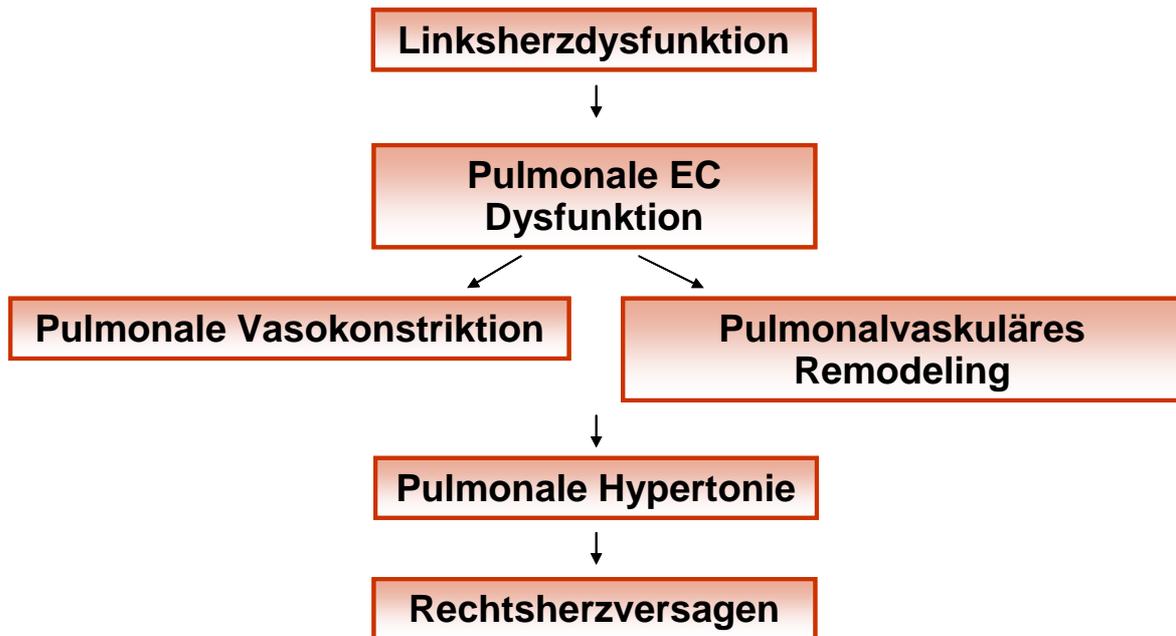


Abbildung 3: Entstehung einer PH durch Linksherzversagen. Adaptiert von Moraes DL *et al.* (45). Zusammenhang zwischen Linksherzdysfunktion und der Entstehung einer PH mit darauffolgendem Rechtsherzversagen. EC: Endothelzelle.

PH mit Linksherzinsuffizienz wird nicht allein durch einen „passiven“ kongestiven Anstieg der pulmonalvaskulären Drücke bedingt, sondern häufig durch einen gleichzeitigen Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes (PVR) verstärkt (46-48). Die Erhöhung des PVR erhöht die rechtsventrikuläre Nachlast zusätzlich und begünstigt somit die Entwicklung eines Rechtsherzversagens. Endotheliale Dysfunktion, Erhöhung des vaskulären Gefäßtonus und extensives vaskuläres Remodelling tragen zur Erhöhung des PVR in Patienten mit Linksherzversagen bei (Abbildung 3). Im Gegensatz zu anderen Formen der PH gibt es für PH mit Linksherzinsuffizienz noch keine effizienten oder anerkannten Behandlungsstrategien. Obwohl sich bereits einige klinische Studien mit der Behandlung des kongestiven Herzversagens mit systemischen Vasodilatoren beschäftigt haben, mussten diese Studien zumeist aufgrund einer erhöhten Mortalität und damit eines verschlechterten klinischen Ausgangs abgebrochen werden. Aufgrund ihrer selektiv pulmonalen Wirkungsweise könnten inhalierte Vasodilatoren eine neue therapeutische Herangehensweise darstellen und die rechtsventrikuläre Nachlast im Herzversagen verringern. In einem Rattenmodell des kongestiven Herzversagens konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das repetitive Inhalieren von Milrinon, einem Phosphodiesterase-3

Inhibitor, zu einer signifikanten Reduktion des pulmonalen arteriellen Drucks führt und gleichzeitig die Bildung eines Lungenödems verhindert (49). Diese Daten werden durch einige kleinere klinische Studien unterstützt, die inhalierte Vasodilatoren als gültige Behandlungsstrategie in PAH und PH mit Linksherzversagen lancieren.

1.3 Kongestives Herzversagen

Kongestives Herzversagen (CHF) ist mit einer Prävalenz von 10 per 1000 bei den über 65-Jährigen eine bedeutende und zudem stetig zunehmende Ursache für Morbidität und Mortalität in den meisten Industrieländern (49).

Beim kongestiven Herzversagen ist das Herz nicht mehr in der Lage, den Organismus mit ausreichend Blut und damit mit genügend Sauerstoff zu versorgen. Klinisch liegt eine Herzinsuffizienz vor, wenn typische Symptome wie z.B. Dyspnoe, Müdigkeit und Flüssigkeitsretention aufgrund einer kardialen Funktionsstörung bestehen.

Bei einem Rückwärtsversagen des Herzens ist die Auswurfleistung normal, so dass die Körperperipherie normal versorgt wird. Es kommt jedoch zu einem Blutrückstau vor dem rechten und/oder linken Ventrikel.

Es existieren verschiedene Differenzierungen bei der Herzinsuffizienz. Zunächst kann eine Herzinsuffizienz nur die linke Herzhälfte (Linksherzinsuffizienz), nur die rechte Herzhälfte (Rechtsherzinsuffizienz) oder beide Herzhälften (globale Herzinsuffizienz) betreffen. Eine weitere Differenzierung berücksichtigt, dass sich eine Herzinsuffizienz entweder über einen längeren Zeitraum entwickeln kann (chronische Herzinsuffizienz) oder durch ein plötzlich einsetzendes Ereignis (z. B. massiver Herzinfarkt, akute bradykarde oder tachykarde Herzrhythmusstörung) auftritt (akute Herzinsuffizienz).

Die Unterscheidung verschiedener Stadien der Herzinsuffizienz ist eine wichtige Hilfestellung bei Therapie, Verlaufskontrolle und Prognose. Die NYHA-Klassifikation geht auf Empfehlungen der New York Heart Association (NYHA) zurück und ist heute das etablierte Klassifikationssystem für die Herzinsuffizienz. Die Zuordnung der Stadien orientiert sich ausschließlich an der Leistungsfähigkeit der Patienten. Aufgrund der Ausrichtung an der Leistungsfähigkeit und Symptomatik ist, je nach Therapieerfolg und Progression, ein mehrfacher Wechsel

zwischen den Stadien in dieser Klassifikation möglich. Die Orientierung an der Symptomatik hat zur Folge, dass in der NYHA-Klassifikation unter einer asymptomatischen Herzinsuffizienz (NYHA I) auch jene Patienten eingeordnet werden, die erst unter medikamentöser Therapie wieder symptomfrei werden (Abbildung 4).

| | |
|-----------------------------------|--|
| NYHA I (asymptomatisch) | Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris. |
| NYHA II (leicht) | Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe und bei geringer Anstrengung. Stärkere körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris, z. B. Bergaufgehen oder Treppensteigen. |
| NYHA III (mittelschwer) | Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris, z. B. Gehen in der Ebene. |
| NYHA IV (schwer) | Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe, Bettlägerigkeit. |

Abbildung 4: NYHA-Klassifikation für Herzinsuffizienz. Je nach Leistungsfähigkeit der Patienten unterteilt man die Herzinsuffizienz in vier Klassen, wobei Klasse vier die schwerste Stufe darstellt.

Bislang existiert kein allgemeingültiges pathophysiologisches Modell der chronischen Herzinsuffizienz. Bekannt sind allerdings einige pathophysiologische Mechanismen, die Teil des komplexen Entstehungsmechanismus des Syndroms der „chronischen Herzinsuffizienz“ sind und die die Grundlage unterschiedlicher Interventionsansätze bilden.

Grundsätzlich beginnt eine chronische Herzinsuffizienz mit einer myokardialen Schädigung, z. B. durch Druck- bzw. Volumenbelastung oder Gewebeverlust. Die daraus resultierende Verminderung der linksventrikulären Funktion aktiviert Gegenregulationsmechanismen, die zwar kurzfristig das Herzminutenvolumen verbessern, aber langfristig zu einer weiteren myokardialen Zellschädigung und einer Manifestation der Herzinsuffizienz führen.

Die aktuellen Therapiekonzepte zielen deshalb auf die Unterdrückung der schädlichen Folgen und die Linderung der Symptome der verminderten linksventrikulären Leistungsfähigkeit ab. Zu den bisher bekannten

Gegenregulationsmechanismen gehört z. B. die Aktivierung des sympatho-adrenergen Systems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Pharmakologische Therapieansätze bestehen daher aus ACE (Angiotensin Converting Enzyme)-Hemmern (50), Beta-Rezeptorenblockern (51) und Aldosteron-Antagonisten (52).

1.4 Vaskuläres Remodelling

Pulmonalvaskuläres Remodelling bezeichnet strukturelle und funktionelle Veränderungen und Umbauprozesse in der Architektur der Wände von Pulmonalarterien.

Bei den Frühformen der PH kommt es pathologisch zur Vasokonstriktion, zur Hypertrophie der glatten Muskelzellen und zur Intimaproliferation in den pulmonalen Gefäßen. In späteren Stadien und bei stark ausgeprägtem Remodelling findet man morphologisch zusätzlich adventitielle Proliferation, *in situ* Thrombosen und plexiforme Läsionen. Dieser Prozess tritt in den Widerstandsgefäßen der Lunge als primäre Antwort auf Schädigung oder Stimuli wie Hypoxie auf. Um einem chronischen Druckanstieg im Lumen standzuhalten, verdickt sich die Gefäßwand und wird stärker. Diese „Aufrüstung“ der Gefäßwand durch zusätzliche glatte Muskelzellen und extrazelluläre Matrix führt zu einer Verkleinerung des Innendurchmessers und zu einer verminderten vasodilatatorischen Kapazität. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands und, als Konsequenz, zu einem anhaltenden Lungenhochdruck. Diese progressive Obstruktion von Pulmonalarterien ist charakteristisch für die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie. Ein gemeinsames Merkmal aller Formen der pulmonalarteriellen Hypertonie ist die distale Ausbreitung glatter Muskelzellen in kleine, physiologischerweise nicht muskularisierte Pulmonalarterien und wird auch als ‚*de novo*-Muskularisierung‘ bezeichnet (Abbildung 5). Das pulmonalvaskuläre Remodelling umfasst jedoch alle Schichten der Gefäßwand und diverse vaskuläre Zelltypen sind an diesem Prozess beteiligt. Je größer der Grad der strukturellen Gefäßveränderungen ist, umso stärker ist die Druckerhöhung bei einem gegebenen Herzzeitvolumen.

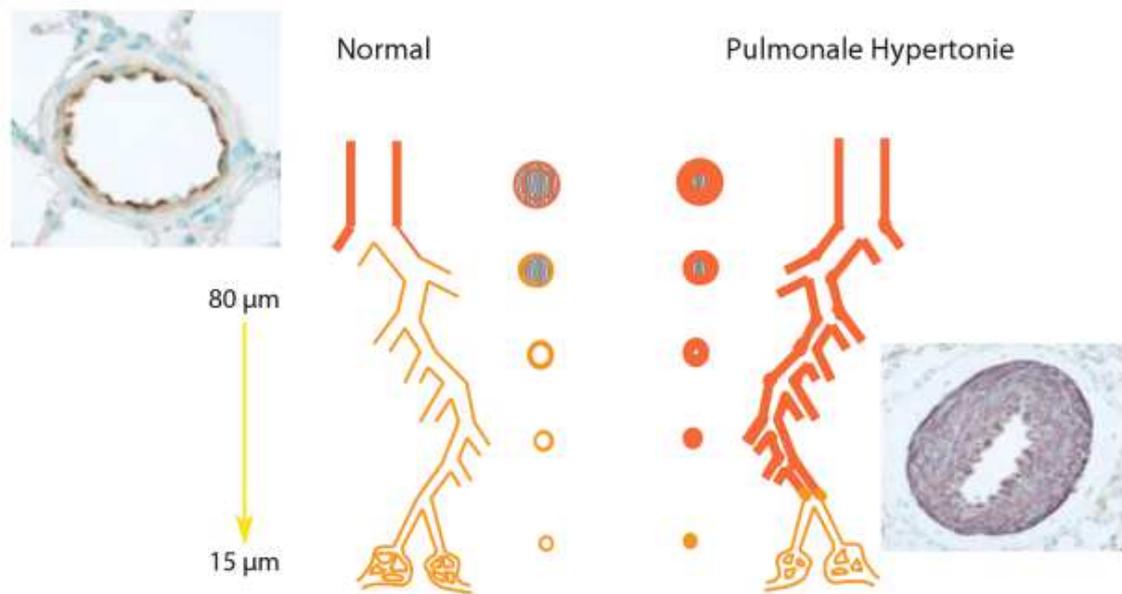


Abbildung 5: Schematische Darstellung des vaskulären Remodellings im Gefäßlängs- und Gefäßquerschnitt. Beim gesunden Menschen (Normal) ist der präkapilläre Gefäßbaum nur bis zu einem Gefäßquerschnitt von ca. 80 µm komplett muskularisiert. Im Rahmen des vaskulären Remodellings kommt es zu einer *de novo*-Muskularisierung auch kleinerer arterieller Gefäßabschnitte bis zu einem Durchmesser von 15 µm (53) .

Typische pathohistologische Charakteristika des vaskulären Remodellings (53) sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Am Endothel kommt es unter anderem zur Adhäsivität von Thrombozyten und Granulozyten und Endothelzellproliferation, an der Intima zur Fibroblastenproliferation und Einwanderung glatter Muskelzellen, in der Media zur Proliferation glatter Muskelzellen sowie Elastindeposition und an der Adventitia zur Fibroblastenproliferation.

| | |
|-------------------|--|
| Endothel | Adhäsivität von Thrombozyten und Granulozyten |
| | Antikoagulatorische wird zu prokoagulatorischer Aktivität |
| | Biochemische Modifikation der Glykokalixschicht |
| | Endothelproliferation (Läsionen) |
| Intima | Fibroblastenproliferation |
| | Proliferation von intermediären Zellen |
| | Pathologische Kollagen-, Proteoglykan- und Polyamindeposition |
| | Einwanderung von glatten Muskelzellen |
| Media | Proliferation von glatten Muskelzellen |
| | Myozytenwanderung nach distal (<i>de novo</i> -Muskularisierung der Arteriolen) |
| | Myozytenwanderung zur Intima (Intimaprolieration) |
| | Elastindeposition |
| Adventitia | Fibroblastenproliferation |
| | Pathologische Kollagendeposition |

Tabelle 1: Pathohistologische und pathobiochemische Charakteristika des vaskulären Remodellings im Rahmen der Ausbildung einer chronischen pulmonalen Hypertonie (53). In den unterschiedlichen Schichten der Gefäßwand laufen die genannten Prozesse ab.

2 ZIEL DER ARBEIT

Pulmonale Hypertonie mit Linksherzerkrankung (Klasse 2 der PH) führt zu beträchtlichem pulmonalvaskulären Remodelling, das schlussendlich im Rechtsherzverzversagen und damit tödlich endet. Derzeit gibt es, trotz einer hohen Inzidenz, keine zugelassenen, lungenspezifischen Therapieoptionen für die Klasse 2 der PH. Genomische und molekulare Pathomechanismen, die dem strukturellen Remodelling und der funktionellen Adaptation der pulmonalen Blutgefäße bei pulmonaler Hypertonie mit Linksherzerkrankung unterliegen, sind unbekannt. Zur Identifikation potentieller neuer therapeutischer Strategien ist es unerlässlich, die zugrundeliegenden Mechanismen, Signalwege und Effektorzellen zu kennen.

In einem Gene Array Ansatz, der das gesamte Rattengenom von 31.000 Genen umfasst, sollen differentiell regulierte Gene zwischen Kontroll- und PH-Rattenlungen identifiziert werden, die neue therapeutische Angriffspunkte darstellen könnten. Diese sollen verifiziert und funktionell getestet werden.

Die spezifischen Ziele dieser Arbeit sind:

1. Identifikation und Verifizierung neuer Zielgene bei PH mit Linksherzinsuffizienz
2. Funktionelle Testung dieser Gene in verschiedenen PH-Rattenmodellen mit einem pharmakologischen Ansatz
3. Funktionelle Testung dieser Gene in verschiedenen PH-Rattenmodellen mit einem genetischen Ansatz
4. Identifikation möglicher Signaltransduktionswege bei pulmonal-vaskulärem Remodelling und der Entstehung der PH

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere

Männliche Sprague-Dawley[®] Ratten wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die männlichen *Ws/Ws* Ratten mit einer homozygoten Mutation im „White spotting (*Ws*)“ Locus sowie die entsprechenden *BN/fMai* Wildtypen (*WT*) stammten von TGC Inc. (Kanagawa, Japan). Alle Tiere erhielten Pflege entsprechend den Leitlinien des LAGeSo (Berlin).

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien, Lösungen, Antikörper

Salze und Puffersubstanzen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Antikörper wurden von Sigma-Aldrich, Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Deutschland) oder Abcam (Cambridge, England) bezogen.

3.2.2 PCR-Primer

Die Primerpaare zur Durchführung von RT-PCR Untersuchungen wurden von der Firma Eurofins MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

| Gen | Zugang #* | [bp] [†] | F/R [‡] | Sequenz (5' → 3') |
|----------------------------------|---------------|-------------------|--------------------|----------------------|
| Mast Cell Chymase 1 | NM_01309 2 | 245 119 | F _{outer} | CCTCTGACACACTGCAGGAA |
| | | | R _{outer} | CCAGGGTCTGTAATGGGAGA |
| | | | F _{inner} | TCCTGCAAACACTTCACCAG |
| | | | R _{inner} | GCTATCCCAGCACACAGGAG |
| Mast Cell Peptidase 2 | NM_17204 4 | 282 118 | F _{outer} | CGAGAATCCACACAGCAGAA |
| | | | R _{outer} | GTCCACACAGGCCTTTTCAT |
| | | | F _{inner} | CAACTCCGTTCCCAATCTTC |
| | | | R _{inner} | CCCAGGGTGGATAAAGTCAG |

Tabelle 2: verwendete Primer. Primersequenzen für RT-PCR von Mast Cell Chymase 1 und Mast Cell Peptidase 2. #*Zugangsnummer der NCBI Datenbank; †Produktgröße in Basenpaaren (bp); ‡“forward“ und „reverse“ Primer der genutzten Sequenz.

3.2.3 Kommerziell erworbene Kits

- Absolutely RNA Miniprep Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
- QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland)
- QuantiTect SYBR Green PCR (Quiagen, Hilden, Deutschland)
- BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, USA)

3.3 Modell der pulmonalen Hypertonie infolge

Linksherzinsuffizienz (suprakoronares Aortenbanding)

Zur Induktion einer pulmonalen Hypertonie infolge von Linksherzinsuffizienz wurde kongestives Herzversagen (congestive heart failure, CHF) an jungen Ratten mit einem Körpergewicht von 91 ± 9 g induziert, indem ein Titanclip mit einem residualen Innendurchmesser von 0,8 mm suprakoronar (oberhalb der Öffnungen der Koronargefäße) um die Aorta geclipt wurde (Abbildung 6, (29)). Die Operation erfolgte nach der von uns publizierten Methode (29;49;54) unter Vollnarkose (intraperitoneale Verabreichung von Ketamin (87 mg/kg KG) und Xylazin (13 mg/kg KG)) und sterilen Bedingungen in einem extra dafür eingerichteten Operationsraum. Innerhalb von neun Wochen entwickelten diese Tiere eine pathologisch ausgeprägte PH mit CHF und konnten in die finalen Experimente eingebracht werden (49). Sham-operierte Ratten mit ähnlichen Körpergewichten dienten als Kontrolltiere. Bei der Sham-Operation wurde entsprechend des Protokolls des Aortenbandings verfahren, allerdings wurde der Clip nicht um die Aorta, sondern in den Thymus geclipt.

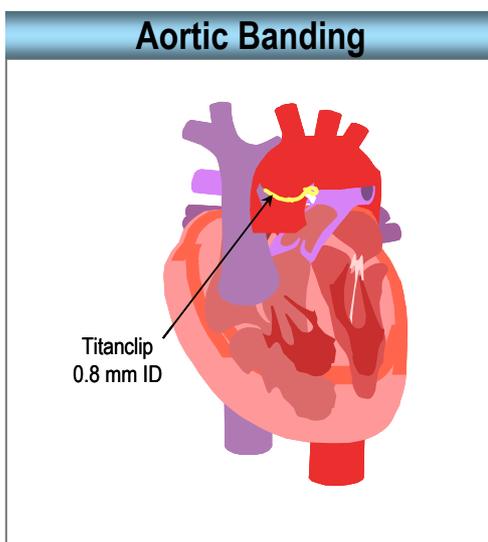


Abbildung 6: Aortenbanding (AO). Schematische Darstellung der Plazierung des Titanclips suprakoronar um die Aorta.

3.4 Modell der pulmonalarteriellen Hypertonie (Monocrotalininjektion)

Für das nicht-kardiogene Modell der pulmonalen Hypertonie erhielten Ratten (320±4 g Körpergewicht) eine einmalige, subkutane Injektion von 60 mg/kg Monocrotalin (MCT; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). In *Ws/Ws* und *BN/fMai* Ratten wurde die Dosis aufgrund hoher initialer Mortalität bei *Ws/Ws* Ratten, die 60mg/kg MCT injiziert bekamen, auf 40 mg/kg MCT reduziert.

3.5 Behandlung mit Ketotifen

Ketotifen (4-(1-Methyl-4-piperidyliden)-9,10-dihydro-4H- benzol[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10-on) ist ein H1-Antihistaminikum der zweiten Generation und zeigt eine Aktivität als Antihistaminikum mit einer starken Spezifität für H1-Rezeptoren sowie schwache anticholinerge Wirkung. Bislang wird es vorbeugend bei allergischem Asthma und zur Behandlung von allergischen Hauterkrankungen, allergischer Bronchitis und allergischem Schnupfen eingesetzt.

Zu Stabilisierung der Mastzellen und zur Verhinderung der Degranulierung dieser wurde es hier im AO- und MCT-Rattenmodell präventiv ab Tag 1 mit dem Trinkwasser in einer Konzentration von 1 mg/kg KG verabreicht.

3.6 Behandlung mit Cromoglicinsäure

Cromoglicinsäure (engl.: Cromolyn sodium salt) gehört zur Wirkstoffgruppe der Cromone und ist eine chemisch hergestellte Substanz, die gegen die Entzündungsmechanismen bei allergischem Asthma bronchiale und Allergie zur Anwendung kommt.

Zur Stabilisierung der Mastzellen und zur Verhinderung der Degranulierung dieser wurde es hier im MCT-Rattenmodell präventiv ab Tag 1 nach MCT-Injektion mit einer Konzentration von 40 mg/kg KG pro Tag mittels intraperitonealer Injektion verabreicht.

3.7 Behandlung mit dem c-Kit spezifischen Inhibitor PLX

Der selektive c-Kit-Inhibitor PLX (freundlicherweise von Plexxikon Inc. zur Verfügung gestellt), wurde in 5% DMSO und 1% Methylcellulose gelöst und den

Ratten in einer Konzentration von 50 mg/kg KG oral und präventiv ab Tag 1 nach MCT-Injektion verabreicht.

3.8 Häodynamische Messungen

Neun Wochen nach Induktion der PH durch Aortenbanding (bzw. Sham-Operation) bzw. 3 Wochen nach MCT-Injektion wurden die Ratten in die finalen Experimente eingebracht. Für die häodynamischen Messungen wurden die Ratten anästhesiert (Dreifachkombination von Medetomidin (0.5 mg/kg KG, Domitor®), Fentanyl (0.05 mg/kg KG) und Midazolam (5 mg/kg KG, Dormicum®)), die ausreichende Narkosetiefe repetitiv durch ein Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes überprüft und ventiliert wie ausführlich in von uns publizierten Studien beschrieben (29;49). Arterieller Druck (AP), zentralvenöser Druck (CVP), pulmonalarterieller Druck (PAP) und linksatrialer Druck (LAP) sowie der Aortenfluss (AF) wurden über Katheter in der Aorta, Vena cava, der Pulmonalarterie und dem linkem Atrium sowie einen Flussmesskopf (Transonic®, Transonic Systems Inc., Ithaca, UY), der um die aufsteigende Aorta implantiert worden ist, kontinuierlich gemessen.

3.9 Kardiopulmonale Charakterisierung

Der Fulton-Index als Maß für Rechtsherzhypertrophie wurde als Quotient aus Gewicht des rechten Ventrikels und linkem Ventrikel plus Septum ($RV/(LV+S)$) berechnet.

3.10 Bestimmung des Lungenödems

Als Maß für das Lungenödem wurde das Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht der Lunge (engl.: wet-to-dry lung weight ratio) bestimmt, indem die Lunge zunächst feucht gewogen, dann getrocknet und anschließend erneut gewogen wurde.

3.11 Echokardiographie

Spontan atmende Ratten wurden wie beschrieben (49) narkotisiert und in eine linkslaterale Lage gebracht. Mithilfe eines mit einem 10-MHz Transducer ausgestatteten, VIVID 7-Ultraschallgeräts (General Electric, Fairfield, CT) wurden transthorakal 2-dimensionale (2D) und M-Mode Aufnahmen erstellt. Rechts- und

linksventrikuläre enddiastolische Flächen wurden dargestellt und vermessen. Im Anschluss wurde die Basis-zu-Apex-Bewegung während der Systole in Form der sogenannten „tricuspid annular plane systolic excursion“ (TAPSE) als echokardiographisches Maß der rechtsventrikulären systolischen longitudinalen Funktion bestimmt.

3.12 Microarray Analysen

Lungen von AO- sowie Kontrollratten bzw. mit Ketotifen behandelten AO-Ratten sowie Kontrollratten wurden entnommen und die komplette RNA extrahiert (Stratagene Absolutely RNA Miniprep Kit). 3 µg RNA von jeweils 3 AO- sowie Kontrollratten wurden nach dem One-Cycle Target Labeling Protokoll (GeneChip Expression Analysis, Affymetrix, Santa Clara, USA) aufgearbeitet. Vor und nach der Amplifikation wurde die Konzentration totaler RNA/komplementärer RNA mit Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) überprüft und die Qualität kontrolliert (Experion electrophoresis station, BioRad; Hercules, USA). Die Proben wurden auf die GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Arrays hybridisiert (Affymetrix; Santa Clara, USA), die 31.000 Proben enthalten und mehr als 28.000 Rattengene abdecken.

3.13 Bioinformatische Analysen

Die Genexpressionsdaten wurden mit der Software Bioconductor Kollektion für R (version 2.5.0) (55) analysiert und präprozessiert sowie mittels GeneChip Robust Multiarray Averaging (GC-RMA) log-transformiert. Gene wurden als differentiell exprimiert definiert, wenn die Expressionslevel zwischen Kontroll- und AO-Ratten eine log₂-Ratio von weniger als -2 (herunterreguliert) oder größer als +2 (hochreguliert) bei einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (two-tailed Student's t-test) aufwiesen.

Differentiell exprimierte Gene wurden in Heatmaps visualisiert, die für die Log-Ratio Werte (berechnet aus den einzelnen Genexpressionswerten und dem mittleren Genexpressionsniveau des korrespondierenden Arrays) farbkodiert sind. Differentiell exprimierte Gene wurden außerdem bezüglich ihrer Anreicherung in Gene Ontology (GO) Klassen analysiert.

3.14 Real Time RT-PCR

Primer (Tabelle 2) wurden mit Hilfe des Programms Primer (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entwickelt und durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) hergestellt. cDNA wurde mit 2µg RNAM-MLV Reverser Transkriptase (Promega, WI, USA) und dNTP (Promega, WI, USA) in einem Gesamtvolumen von 25µl für 1h bei 42°C umgeschrieben. Die PCR wurde mit einem Rotor Gene 2000 Cycler (LTF, Wasserburg, Germany) bei 94°C für 900 s, gefolgt von 45 Zyklen bei 94°C für 30 s, 56°C für 30 s und 72°C für 60s durchgeführt. Die Amplifikationsreaktionen wurden mit dem Mastermix SYBR-Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen) durchgeführt und die Messwerte relativ zu den entsprechenden GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-Werten normalisiert. GAPDH diente hier als Housekeeping-Gen.

3.15 Western Blot Analysen

Für Analysen auf Proteinebene wurde gefrorenes Lungengewebe pulverisiert, lysiert und in Extraktionspuffer (20 mmol/L Na₃PO₄ (pH 7,8), 1% Triton-100, 2,5 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Phenylmethansulphonylfluorid (PMSF), 10 µg/mL Aprotinin, 10 µg/mL Leupeptin und 10 µg/ml Pepstatin) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben drei Mal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Durch Zentrifugation bei 19.800 g für 15 min wurden die Lysate durch Pelletieren der Zelltrümmer gesammelt und die Gesamtproteinkonzentration mit dem Bradford Protein Assay (Bio-rad Protein Assay; Bio-Rad, Munich, Germany) bestimmt. Pro Tasche wurden 50 µg Probe und pro Gel ein vorgefärbter Proteingewichtsmarker (Bio-Rad, Munich, Germany) aufgetragen und mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit einem Protean II Wet Blotter (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Durch eine Ponceau-Färbung (Sigma) der Nitrocellulosemembran wurde die gleichmäßige Beladung der Bahnen überprüft. Die Membran wurde mit 5% Milchpulver (Töpfer, Dietmannsried, Germany) in PBS mit 1% Tween (PBST) für 1,5 h bei RT geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in entsprechender Konzentration in 5% Milchpulver in PBST über Nacht bei 4°C bzw. für 3h bei RT. Der Blot wurde dann drei Mal für jeweils 5min mit PBST gewaschen

und anschließend mit dem passenden Sekundärantikörper für 45min bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang (5x5min) mit PBST wurden die Proteinbanden mit ECL (Perkin Elmer GmbH, Freiburg, Germany) bzw. Femto (Fisher Scientific, Schwerte, Germany) auf einem Fotofilm visualisiert.

3.16 Histologie, Immunhistologie und Analyse des vaskulären Remodellings

Rattenlungen wurden durch Perfusion mit 4% Paraformaldehyd (PFA) über die Pulmonalarterie für 30min fixiert, Gewebeabschnitte von 1 cm³ ausgeschnitten und erneut für 16h fixiert. Die entwässerten Gewebeabschnitte wurden in Paraffin eingebettet, 5 µm dünne Schnitte wurden angefertigt und auf einen mit 10% Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich) beschichteten Objektträger aufgebracht. Lungenschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin zur Analyse des vaskulären Remodellings bzw. Toluidinblau zur Visualisierung der Mastzellen gefärbt. Die Analyse des vaskulären Remodellings wurde mit einem computerisierten morphometrischen System (QWin; Leica) wie beschrieben (56) durchgeführt. In jeder Gruppe wurden 800 bis 1000 pulmonale Arteriolen analysiert und die Gefäße wurden je nach Außendurchmesser als klein (20-50 µm Durchmesser), mittel (50-100 µm Durchmesser) oder groß (>100 µm Durchmesser) in drei Kategorien eingeteilt. Die kleinen Gefäße wurden zudem eingeteilt in muskularisiert (mit einer kompletten medialen Muskelschicht), teil-muskularisiert (mit nur einer sichelförmigen Muskelschicht) oder nicht-muskularisiert (keine offensichtliche Muskelschicht). Die mediale Wandstärke wurde als Anteil des Gefäßaußendurchmessers berechnet. In kleinen pulmonalen Arteriolen wurde zudem die Lumenfläche (Fläche innerhalb der Lamina elastica interna) gemessen. In den mit Ketotifen behandelten MCT Ratten wurde die Anzahl analysierter Arteriolen auf 100 bis 200 limitiert und die mediale Wandstärke für alle analysierten Gefäße ohne Unterkategorisierung angegeben.

3.17 Mastzellakkumulation und Degranulation

Für die Mastzellfärbung wurden die Paraffin-eingebetteten Lungengewebschnitte entwacht, rehydriert und mit 0,05% w/v Toluidinblau für drei Minuten inkubiert. Die Mastzellichte wurde durch Zählung Toluidinblau-positiver Mastzellen in

einem Gewebeschnitt bestimmt und als Mastzellen pro Fläche ausgedrückt. Perivaskuläre Mastzellen wurden für verschiedene Gefäßgrößen (20-50 μm , 50-150 μm und $>150 \mu\text{m}$ im Durchmesser) gezählt und als Mastzellen pro Gefäß dargestellt. Jede Mastzelle wurde aufgrund ihres Gehalts an sekretorischen Granula als granuliert oder degranuliert eingestuft und ein Granulationsindex (IOG), als Quotient aus granulierten und degranulierten Mastzellen, errechnet. Für jede Versuchsreihe wurde der IOG als Prozentsatz der jeweiligen Kontrollgruppe, die auf 100% gesetzt wurde, dargestellt.

3.18 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEMs dargestellt. Unterschiedliche Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test (SigmaStat 3.10; Systat Software Inc., Erkrath, Germany) verglichen. Ein statistisch relevantes Ergebnis wurde, wie in der Literatur bereits hinreichend beschrieben, bei einem p-Wert $< 0,05$ definiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Differentiell regulierte Gene in PH mit Linksherzinsuffizienz

Zur Identifizierung differentiell regulierter Gene im Rattenmodell der PH mit Linksherzinsuffizienz wurden genomische Microarray-Analysen des gesamten Rattengenoms durchgeführt. Drei Lungenhomogenate von Sham-operierten Kontrollratten (Kontrolle) sowie drei Lungenhomogenate von AO-Ratten wurden prozessiert. Das Klippen der Aorta in juvenilen Ratten zur Induktion einer PH infolge von Linksherzinsuffizienz führt zu einer moderaten PH mit deutlichem Anstieg des pulmonal-vaskulären Widerstandes und einem Anstieg des RV Gewichts als Ausdruck einer rechtsventrikulären Hypertrophie und wurde hier als Modell eingesetzt.

Das gesamte Datenset der Microarrayanalysen ist bei Gene Expression Omnibus (GEO) des Nationalen Zentrums für Biotechnologie Information mit der Zugangsnummer GSE16624

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE16624>) zugänglich. Von insgesamt 28.000 analysierten Genen waren 120 Gene differentiell exprimiert (≥ 4 facher Unterschied mit $p < 0.05$). Von diesen 120 Genen waren in Lungen von AO-Ratten im Vergleich zu Kontrollratten 76 hoch- und 44 runterreguliert wie im Volcano Blot farblich dargestellt (Abbildung 7).

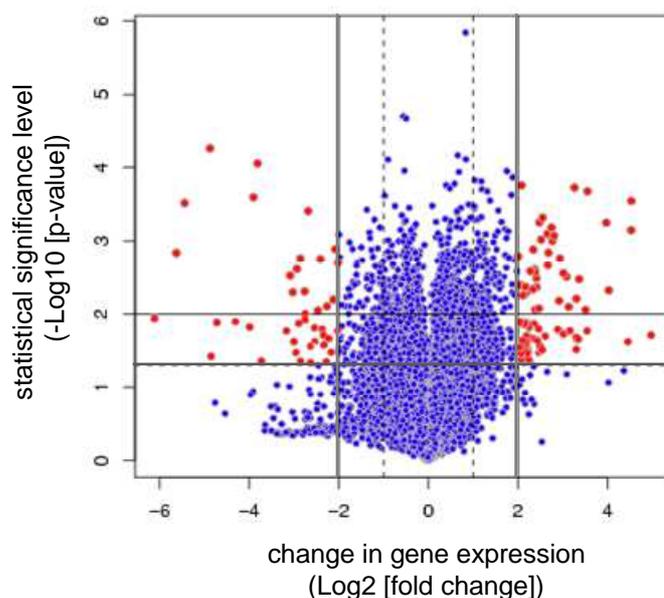


Abbildung 7: Gene Array Analyse. Der Volcano Blot der Gene Array Analysen des Gesamtgenoms der Ratte zeigt die differentielle Genexpression in Lungenhomogenaten von AO- und Kontrollrattenlungen (je n=3). Rote Punkte stellen die 120 Gene dar, die signifikant ($p < 0.05$ entsprechend $\text{Log}_{10} > 1.3$) und mehr als 4-fach hoch- ($\text{Log}_2 > 2$) oder runterreguliert ($\text{Log}_2 < -2$) in AO- im Vergleich zu Kontrollratten sind.

Differentiell hoch- bzw. runterregulierte Gene aus den Microarrayanalysen wurden in Abbildung 8 als Heatmap dargestellt. Eine Heatmap generiert aus Microarrayanalysen eine graphische Darstellung, in der die Expression der Variablen zweidimensional in Farbe wiedergegeben wird.

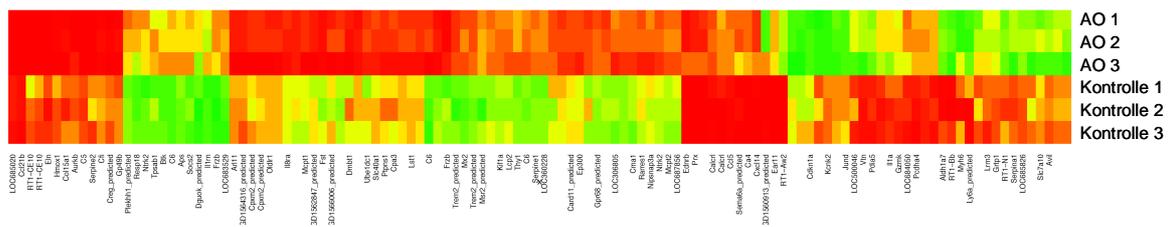


Abbildung 8: Gene Array Analyse. Diese Heatmap bildet die Expressionsmuster der 120 differentiiell regulierten Gene der 3 AO-Lungen sowie der 3 Kontrolllungen ab. Die Farbkodierung (rot hoch-, grün runterreguliert) zeigt die individuelle Genexpressionen relativ zur mittleren Genexpression des gesamten Arrays. Beschriftungen nach NCBI Gensymbolen.

Die 120 differentiiell regulierten Gene kodieren für Proteine, die an Entzündungs- und Entwicklungsprozessen sowie Komplement- oder Gerinnungskaskaden, vaskulärer Regulation oder der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Tabelle 3).

| Kategorie | Gen | ↑/↓* | x-facher Unterschied [†] | p |
|-----------------------------|----------------------------|------|-----------------------------------|-------|
| Entzündung/ Immunantwort | Interleukin 1 alpha | ↓ | 0.17 | 0.009 |
| | Il-1 Rezeptor | | | |
| | Antagonist | ↑ | 4.43 | 0.025 |
| | Il-8 Rezeptor alpha | ↑ | 8.65 | 0.003 |
| | oxLDL Rezeptor 1 | ↑ | 5.65 | 0.025 |
| | Mastzellprotease 1 | ↑ | 10.31 | 0.030 |
| | Mastzellpeptidase 2 | ↑ | 4.53 | 0.003 |

| | | Ergebnisse | | |
|----------------------------------|--------------------------|------------|-------|--------|
| | Tryptase | ↑ | 4.12 | 0.013 |
| | Chymase 1 | ↑ | 6.81 | 0.001 |
| | Complement Factor 1 | ↑ | 5.71 | <0.001 |
| Komplementsystem | Complement component 6 | ↑ | 31.77 | 0.020 |
| Gerinnungssystem | PAI-1 | ↑ | 6.47 | <0.001 |
| | ET _B Rezeptor | ↓ | 0.23 | 0.049 |
| Vaskuläre Regulation | Hämoxxygenase 1 | ↑ | 6.98 | 0.016 |
| | Endotheliale Lipase | ↓ | 0.17 | 0.019 |
| Extrazelluläre Matrixkomposition | Vitronectin | ↓ | 0.05 | 0.007 |
| | Procollagen Typ XV | ↑ | 4.42 | 0.040 |
| | Elastin | ↑ | 4.58 | 0.030 |
| Entwicklungssignalweg | Semaphorin 6A | ↓ | 0.12 | 0.014 |

Tabelle 3: Ausgewählte differentiell regulierte Gene im Rattenmodell der PH mit Linksherzinsuffizienz. Auswahl repräsentativer Gene mit differentieller Expression in AO-Rattenlungen im Vergleich zu Kontrolllungen. Die differentielle Expression wurde definiert als ≥ 4 fache Veränderung mit $p < 0.05$. Daten von je $n=3$ Tieren. \uparrow/\downarrow^* symbolisieren Hoch- und Runterregulation in AO- im Vergleich zu Kontrollratten; \uparrow x-fache Veränderung, dargestellt als Quotient der Genexpression in AO/Kontrolle; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1 (serpinE1); ETB Rezeptor, Endothelin-1 type B Rezeptor. Mastzellspezifische Gene wurden hervorgehoben.

Auffällig ist, dass die Gene Ontology (GO) Klasse mit der ausgeprägtesten differentiellen Regulation im Vergleich zwischen AO- und Kontrolllungen auf Genebene die GO Klasse der "Mastzellaktivierung" ist, in der 13 von 20 Genen signifikant hochreguliert waren. Diese GO Klasse wird in Abbildung 9 rot dargestellt und ist eine Unterklasse der Prozesse des Immunsystems und der myeloiden Leukozytenaktivierung.

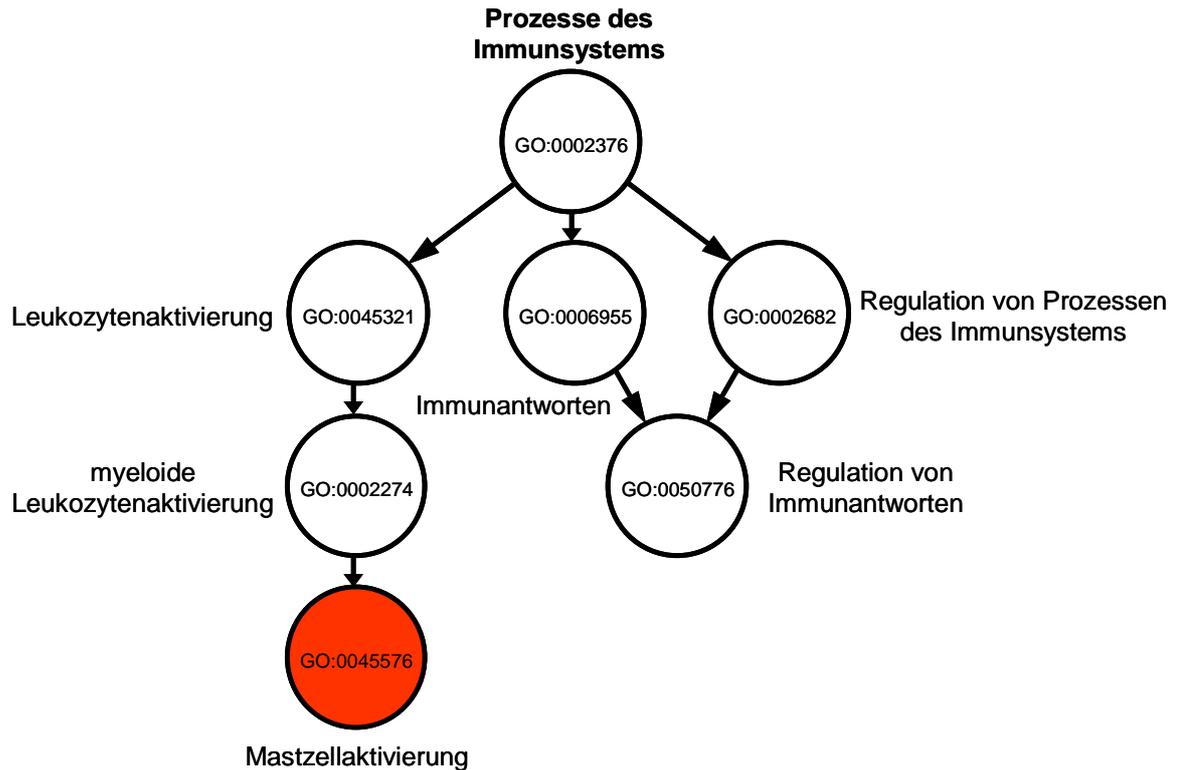


Abbildung 9: Dendrogramm des gene ontology (GO) Clusters "Prozesse des Immunsystems" mit entsprechenden GO Bezeichnungen und Zugangsnummern. Innerhalb des gesamten Gene Arrays war die differentielle Regulation am deutlichsten in der GO Klasse der "Mastzellaktivierung".

4.2 Akkumulation pulmonaler Mastzellen in Ratten mit PH

Um die sich daraus ableitende Hypothese, dass die Expression von Mastzellgenen bzw. -proteinen in PH mit Linksherzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Lungen hochreguliert ist, zu testen, wurde dies für ausgewählte Mastzellgene auf Gen- und Proteinebene verifiziert. RT-PCR (Abbildung 10) und Western Blot Analysen (Abbildung 11) zeigten eine Hochregulation der Mastzellchymase und Mastzellpeptidase 2 in PCR und Western Blot Analysen in AO- im Vergleich zu Kontrolllungen.

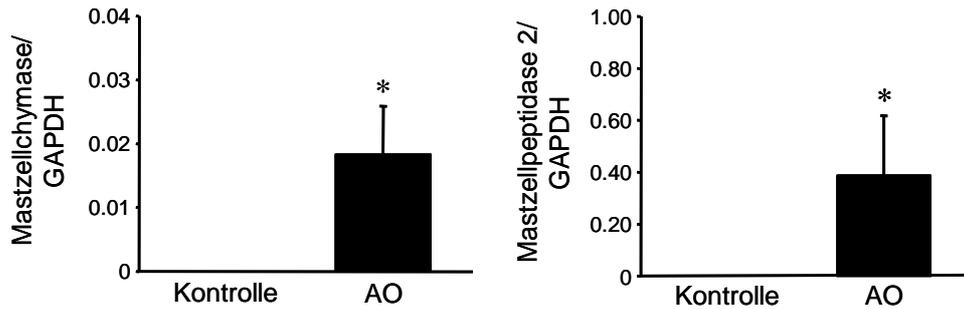


Abbildung 10: RT-PCR der Mastzellchymase und Mastzellpeptidase 2 in Lungen von Kontroll- und AO-Ratten. Signifikante Hochregulation der Mastzellgene Mastzellchymase und Mastzellpeptidase 2 in AO- im Vergleich zu Kontrolllungen. Daten der RT-PCR von Lungenhomogenat wurden quantifiziert im Vergleich zu Standardkurven, die unter denselben Bedingungen hergestellt wurden, und wurden relativ zur GAPDH-Expression aus demselben Experiment normalisiert. Daten von je n=3 Tieren; *p<0.05 versus Kontrolle.

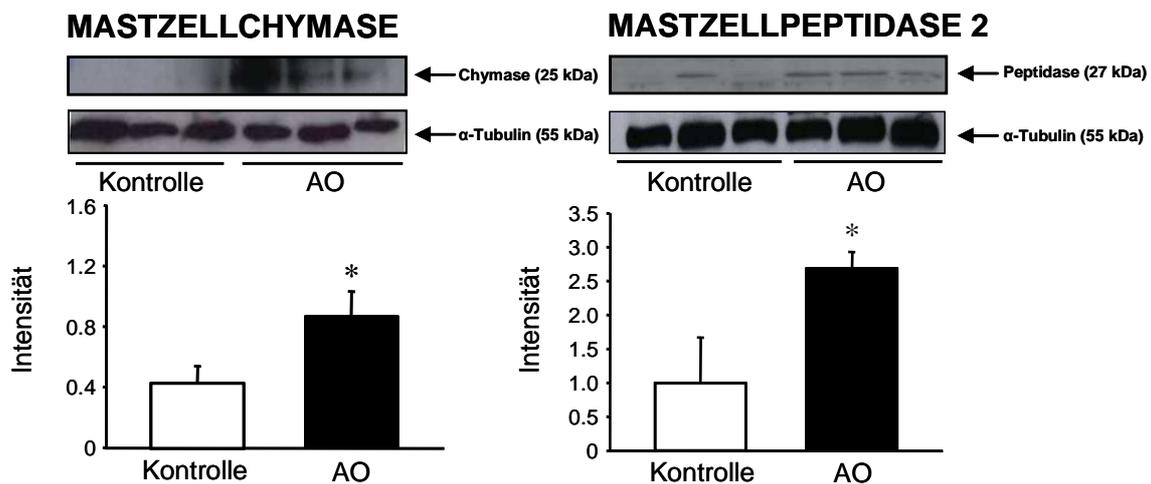


Abbildung 11: Western Blot Analysen von Mastzellchymase und Mastzellpeptidase 2 in Kontroll- und AO-Ratten. Repräsentative Western Blots sowie quantitative Darstellungen der Expression in Lungen von AO- und Kontrollratten. Als Beladungskontrolle diente α -Tubulin. Daten von je n=3 Tieren; *p<0.05 versus Kontrolle.

Histochemische Analysen mit Toluidinblau zeigten eine perivaskuläre Akkumulation von Mastzellen in direkter Nähe zu pulmonalen Arterien mit medialer Hypertrophie in Lungen von AO- im Vergleich zu Kontrollratten (Abbildung 12).

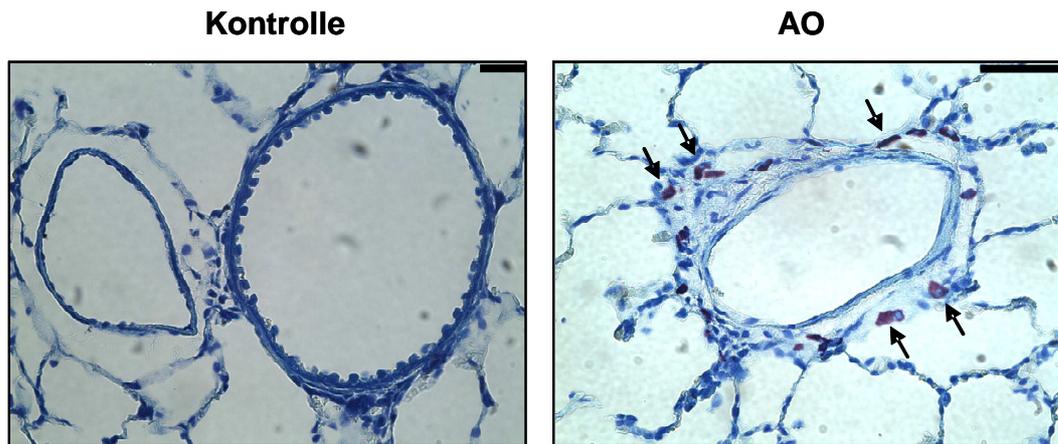


Abbildung 12: Perivaskuläre Akkumulation pulmonaler Mastzellen in Ratten mit AO. Repräsentative histologische Bilder von Lungenschnitten von Kontroll- (links) und AO (rechts) - Ratten gefärbt mit dem Mastzellfarbstoff Toluidinblau. Bemerkenswert ist die verdickte vaskuläre Media in den AO-Rattenlungen und die Gegenwart von zahlreichen Mastzellen (Pfeile) in direkter Nähe zu den umgebauten Gefäßen während in dem Kontrollschnitt kaum Mastzellen zu finden sind. Jeweils oben rechts befindet sich der Maßstab, 50 µm. Repliziert in je n=5 Lungen.

4.3 Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen auf den pulmonalen Gefäßumbau und die Entwicklung der PH bei Linksherzinsuffizienz

Bislang konnte gezeigt werden, dass Mastzellgene und –proteine signifikant hochreguliert sind in AO- im Vergleich zu Kontrollratten. Auch die perivaskuläre Akkumulation von Mastzellen in umgebauten Pulmonalgefäßen von AO-Ratten lässt auf eine entscheidende Rolle von Mastzellen bei der Entstehung der PH infolge von Linksherzinsuffizienz schließen.

Um eine mögliche funktionelle Rolle der Mastzellen beim vaskulären Remodelling und der Entwicklung einer PH infolge einer Linksherzinsuffizienz zu untersuchen, wurde einerseits ein pharmakologischer Ansatz in Form einer chronischen Behandlung von AO-Ratten mit dem Mastzellstabilisator Ketotifen und andererseits eine genetische Strategie durch Verwendung mastzelldefizienter *Ws/Ws* Ratten gewählt.

Die Behandlung mit 1 mg/kg KG Mastzellstabilisator Ketotifen im Trinkwasser vom postoperativen Tag 1 an konnte die Entwicklung der PH und der rechtsventrikulären Hypertrophie über den Zeitraum von 9 Wochen nach AO

signifikant herabsetzen. Dies zeigte sich durch reduzierte pulmonalarterielle Drücke, pulmonalvaskuläre Widerstände (PVR) und rechtsventrikuläre (RV) Gewichte in mit Ketotifen behandelten AO-Ratten im Vergleich zu unbehandelten AO-Ratten (Abbildung 13).

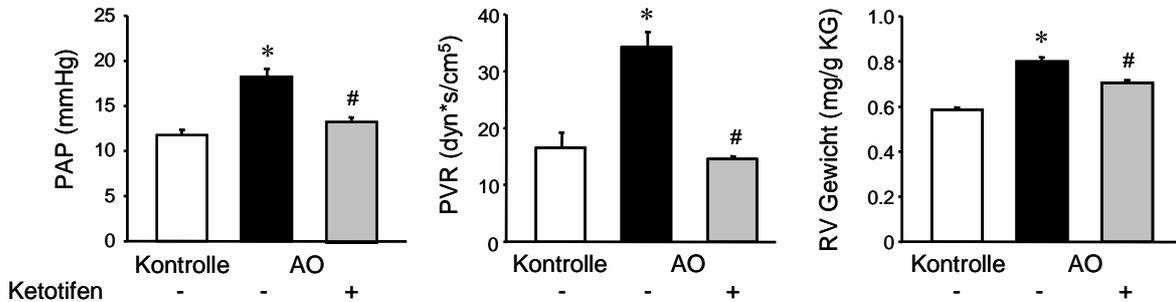


Abbildung 13: Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen auf pulmonale Hämodynamik und rechtsventrikuläre Hypertrophie im Rattenmodell der PH mit Linksherzinsuffizienz. PAP, PVR und RV Gewicht in Kontroll-, AO- und Ketotifen-behandelten AO-Ratten. Daten von je n=6 Tieren; *p<0.05 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. AO.

In Sham-operierten Kontrollratten ohne AO hatte die Ketotifenbehandlung keinen detektierbaren Effekt auf die pulmonale Hämodynamik (n=6, Daten nicht gezeigt). Die Verminderung der PH durch die Behandlung mit Ketotifen konnte im Wesentlichen auf die Normalisierung des PVR zurückgeführt werden. Linksatrialer Druck sowie Aortenfluss zeigten keinen Unterschied zwischen mit Ketotifen behandelten und unbehandelten Ratten. Dies impliziert, dass Ketotifen nicht das zugrundeliegende kongestive Herzversagen abschwächt. Übereinstimmend mit unseren vorangegangenen Erkenntnissen bleibt die systemische Hämodynamik in AO Ratten unverändert. Der arterielle Druck und der systemische vaskuläre Widerstand (SVR) wiesen keinen Unterschied zwischen AO- und Kontrollratten, sowie keinen Effekt der Ketotifenbehandlung auf (Tabelle 4).

| | Kontrolle | | AO | |
|--------------------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|
| | unbehandelt | Ketotifen | unbehandelt | Ketotifen |
| AP (mmHg) | 92.4±1.2 | 92.9±2.2 | 89.8±1.7 | 88.7 ±2.1 |
| Aortenfluss (mL/min) | 53.9±3.8 | 55.3±4.7 | 49.6±2.5 | 53.6±3.2 |
| SVR (dyn·s·cm ⁻⁵) | 136.4±5.4 | 138.3±6.5 | 141.2±4.8 | 139.8±5.2 |
| LAP (mmHg) | 1.5±0.2 | 1.8±0.3 | 4.2±0.2* | 4.3±0.3* |

Tabelle 4: Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen auf die systemische Hämodynamik im Rattenmodell der PH mit Linksherzinsuffizienz. Systemische hämodynamische Parameter von Kontroll- und AO-Ratten mit und ohne Ketotifenbehandlung. AP, arterieller Druck; SVR, systemischer vaskulärer Widerstand; LAP, Linksatrialer Druck. Daten von je n=5 Tieren; *p<0.05 vs. entsprechende Kontrollratten.

In AO- im Vergleich zu Kontrollratten war ein beträchtlicher pulmonalvaskulärer Gefäßumbau als eine Verdickung der Media der Gefäßwand (Abbildung 14) bei allen untersuchten Gefäßgrößen (kleine pulmonale Arteriolen mit 20-50 µm, mittlere pulmonale Arteriolen mit 50-100 µm und große Arteriolen mit einem Durchmesser von >100 µm) zu sehen (Abbildung 15).

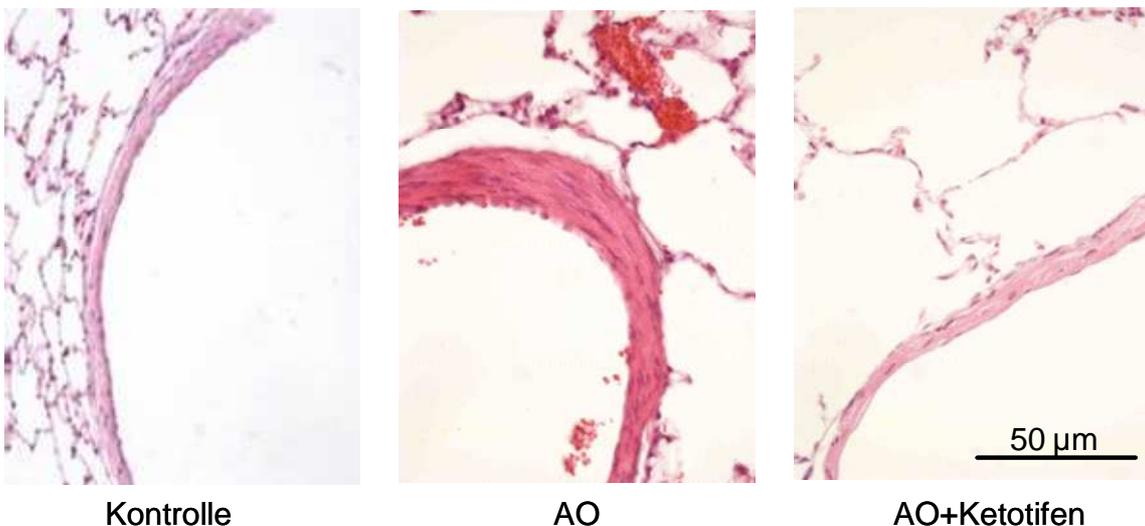


Abbildung 14: Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen auf das vaskuläre Remodelling. Repräsentative Bilder HE-gefärbter Lungenschnitte von Kontroll-, AO- und Ketotifen-behandelten AO-Ratten zeigen eine deutliche Mediaverdickung in AO- im Vergleich zu Kontroll- oder mit Ketotifen-behandelten AO-Ratten. Repliziert in je n=5 Tieren.

Durch Behandlung der AO-Ratten mit Ketotifen vom postoperativen Tag 1 an konnte die Media der Gefäßwand als Maß des vaskulären Remodellings in allen untersuchten Gefäßgrößen signifikant reduziert werden (Abbildung 15).

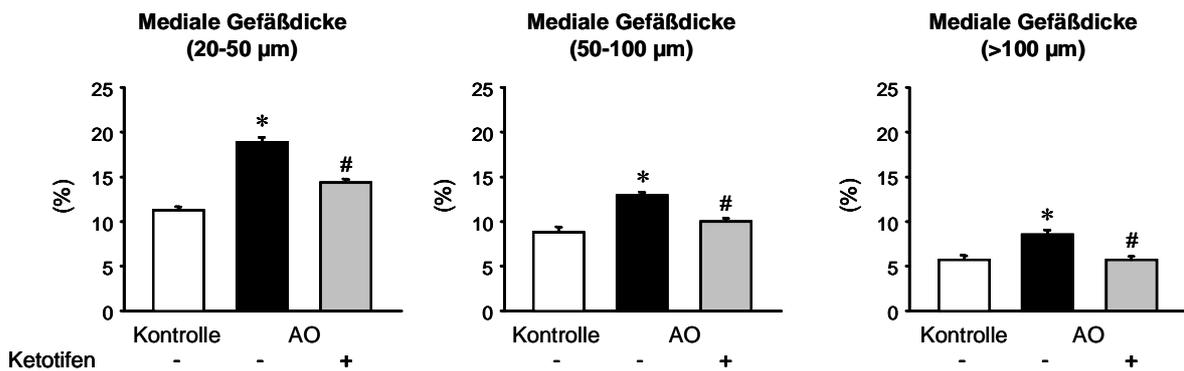


Abbildung 15: Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen auf die Mediaverdickung in den Pulmonalgefäßwänden. Die Abbildungen zeigen die Gefäßwanddicke in Arterien der Größe 20–50 µ, 50-100 µm und >100 µm im Durchmesser in Lungen von Kontroll-, AO- und Ketotifen-behandelten AO-Ratten. Daten von je n=5 Tieren; *p<0.05 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. AO.

Die Mehrheit der kleinen pulmonalen Arteriolen war in Kontrollratten nicht-muskularisiert oder nur teilweise muskularisiert, während in AO-Ratten signifikant mehr pulmonale Gefäße voll-muskularisiert waren. Dies ging mit einer Abnahme der Fläche des Gefäßlumens einher (Abbildung 16).

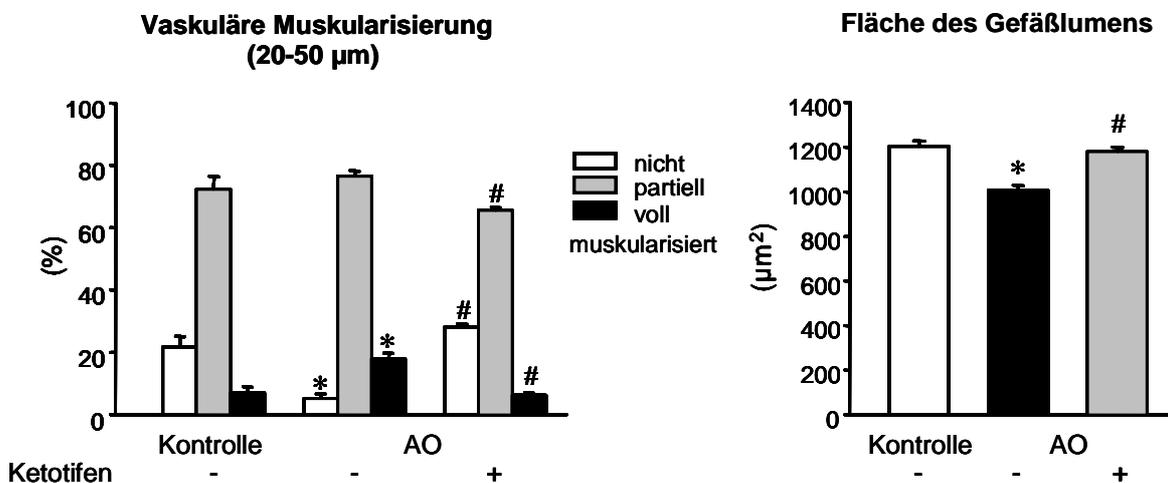


Abbildung 16: Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen auf das vaskuläre Remodelling. Die Abbildungen zeigen den Grad der vaskulären Muskularisierung und die Fläche des Gefäßlumens von Arteriolen von 20-50µm im Durchmesser in Kontroll-, AO- und Ketotifen-behandelten AO-Rattenlungen. Der Grad der vaskulären Muskularisierung ist als Anteil nicht-, partiell- oder voll-muskularisierter pulmonaler Arteriolen in Prozent zum gesamten Schnitt angegeben. Daten von je n=5 Tieren; *p<0.05 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. AO.

Die Behandlung von AO-Ratten mit Ketotifen verringerte die Zunahme der Mediaschicht der Pulmonalgefäße in allen analysierten Gefäßkategorien im Vergleich zu Kontrollratten, reduzierte die mikrovaskuläre Muskularisierung, vergrößerte das mikrovaskuläre Gefäßlumen und konnte somit das pulmonale mikrovaskuläre Remodelling in AO-Ratten größtenteils verhindern (Abbildung 15, Abbildung 16).

Desweiteren interessierten uns direkte Effekte des Mastzellstabilisators Ketotifen auf pulmonale Mastzellzahlen, Granulationsstatus der Mastzellen sowie die Effekte auf die perivaskuläre Verteilung der Mastzellen in verschiedenen Gefäßgrößen.

Eine signifikante Akkumulation von Mastzellen sowie eine deutliche Mastzelldegranulation war in AO-Ratten im Vergleich zu Kontrollratten in Form einer erhöhten Mastzellichte im Lungengewebe, einer reduzierten Granulation der vorhandenen Mastzellen und einer Akkumulation perivaskulärer Mastzellen um Arteriolen aller Gefäßgrößen nachweisbar (Abbildung 17). Ketotifen reduzierte anschließend die Mastzellanzahl in der Lunge, verhinderte, wie erwartet, die Degranulation der pulmonalen Mastzellen und verringerte die Anzahl perivaskulärer Mastzellen, vor allem im mikrovaskulären Bereich, signifikant.

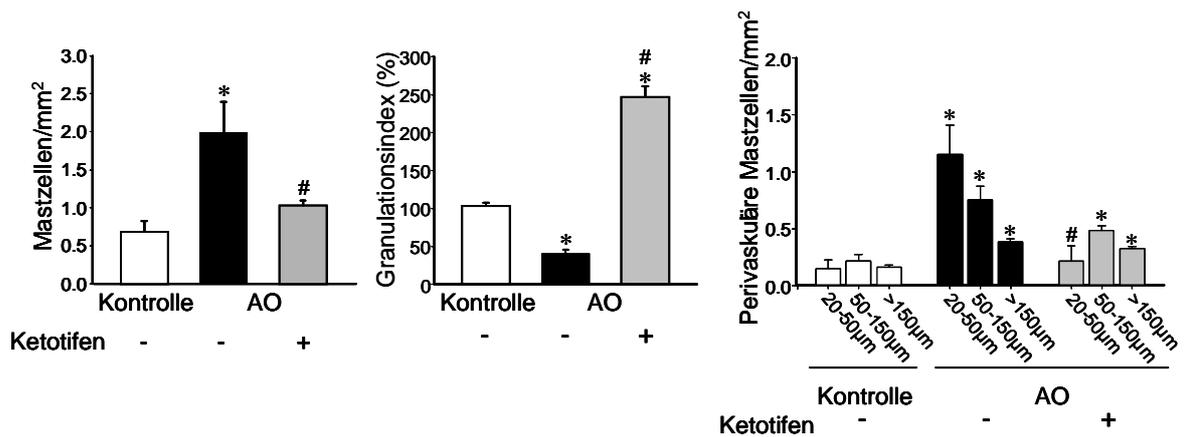


Abbildung 17: Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen auf die Mastzellakkumulation. Die Abbildungen zeigen die Mastzellendichte in Lungenschnitten, den Granulationsindex und die Anzahl an perivaskulären Mastzellen, die sich um die pulmonalen Gefäße mit Durchmessern von 20-50µm, 50-150µm und >150µm in Kontroll-, AO und Ketotifen behandelten AO-Ratten akkumulieren. Daten von je n=8 Tieren; *p<0.05 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. AO.

Echokardiographische Analysen 9 Wochen nach PH-Induktion durch AO oder Sham-Operation zeigten in AO-Ratten im Vergleich zu Kontrollratten eine vergrößerte rechtsventrikuläre (RV) enddiastolische Fläche als Charakteristikum für die Entwicklung eines *Cor Pulmonale* (Abbildung 18).

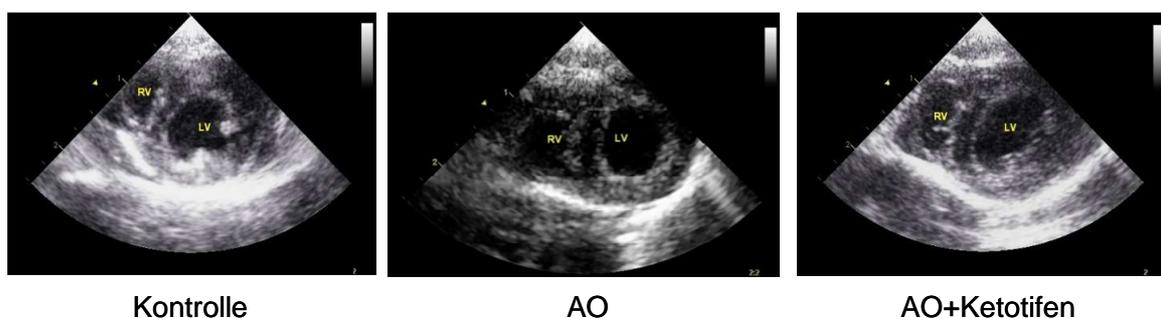


Abbildung 18: Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen auf rechts- und linksventrikuläre Dimensionen in der Echokardiographie. Repräsentative echokardiographische 2D-Bilder zeigen den linken (LV) und rechten (RV) Ventrikel in der Enddiastole in Kontroll-, AO- und in mit Ketotifen behandelten AO-Ratten. Auffällig ist die Dilatation des rechten Ventrikels in AO-Ratten, die durch Ketotifenbehandlung reduziert wird. Repliziert in je n=10 Tieren.

Die Behandlung der AO-Ratten mit Ketotifen normalisierte die rechtsventrikuläre Dilatation größtenteils auf ein Niveau, das jenen der Kontrolltiere vergleichbar war. Die linksventrikuläre enddiastolische Fläche zeigte einen Trend zur Vergrößerung

in AO-Ratten unabhängig von der Ketotifenbehandlung, dieser erreichte aber nicht Signifikanzniveau. Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) als Maß der rechtsventrikulären systolischen Funktion war in AO-Ratten im Vergleich zu Kontrollratten verringert. Dieser Effekt wurde durch Ketotifengabe teilweise antagonisiert (Abbildung 19).

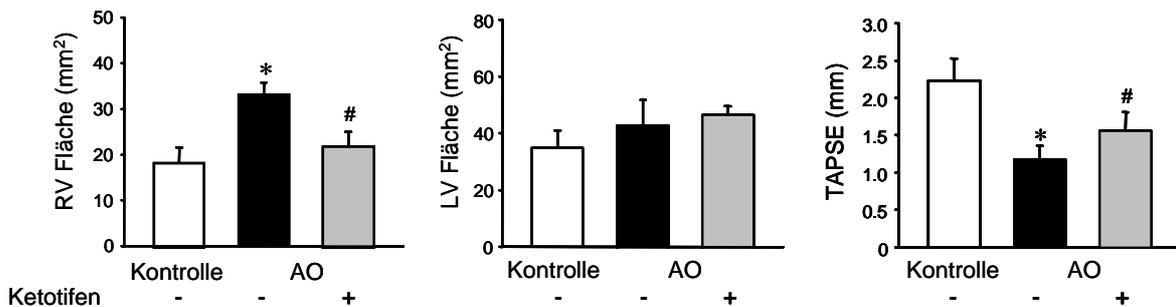


Abbildung 19: Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen auf echokardiographische Parameter. Rechtsventrikuläre (RV) und linksventrikuläre (LV) enddiastolische Fläche und TAPSE in Kontroll-, AO- und in mit Ketotifen behandelten AO-Ratten. Daten von je n=10 Tieren; *p<0.05 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. AO.

4.4 Vaskuläres Remodelling und PH mit Linksherzinsuffizienz in mastzelldefizienten *Ws/Ws* Ratten

In einem zweiten nicht-pharmakologischen Ansatz untersuchten wir die funktionelle Rolle der Mastzellen für den pulmonalen Gefäßumbau und die Entwicklung der PH infolge von Linksherzerkrankung, indem wir bei mastzelldefizienten *Ws/Ws* und entsprechenden BN/fMai Wildtypmatten (WT) ein AO durchführten und die Entwicklung von PH und pulmonalem Gefäßumbau nach 9 Wochen analysierten. Sham-operierte *Ws/Ws* Ratten unterschieden sich in keinem der vermessenen Parametern von den Wildtypmatten und werden folglich hier nicht dargestellt.

Im Vergleich zu Wildtypmatten war der Anstieg von PAP, PVR und RV Gewicht (als Anzeichen für Rechtsherzhypertrophie) infolge AO in *Ws/Ws* Ratten signifikant geringer ausgeprägt (Abbildung 20).

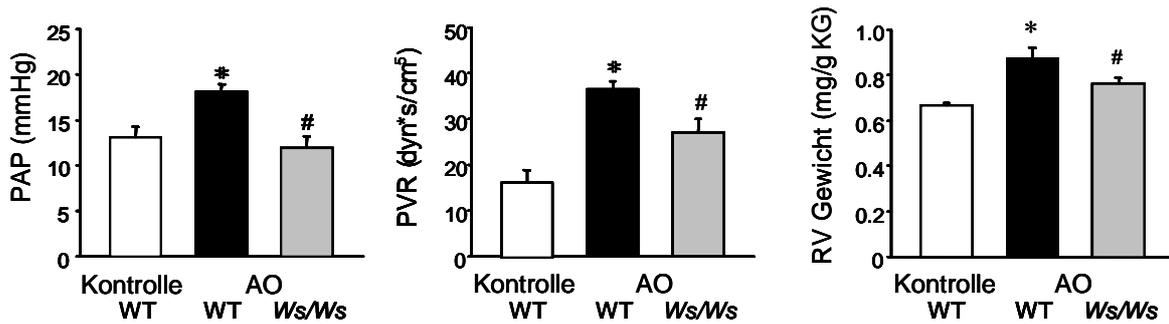


Abbildung 20: Auswirkungen der Mastzelldefizienz auf pulmonal-hämodynamische Parameter und rechtsventrikuläre Hypertrophie. PAP, PVR und RV Gewicht in Kontroll-Wildtypen, AO-Wildtypen und AO- Ws/Ws Ratten. Daten von je n=6 Tieren; *p<0.05 vs. Kontrolle WT, #p<0.05 vs. AO WT.

Neben dem Rechtsherzgewicht waren in WT AO-Ratten im Vergleich zu WT Kontrollratten das Herz, und insbesondere der rechte Ventrikel, phänotypisch stark vergrößert. In Ws/Ws AO Ratten stellte sich der rechte Ventrikel wieder weitgehend unvergrößert dar (Abbildung 21).

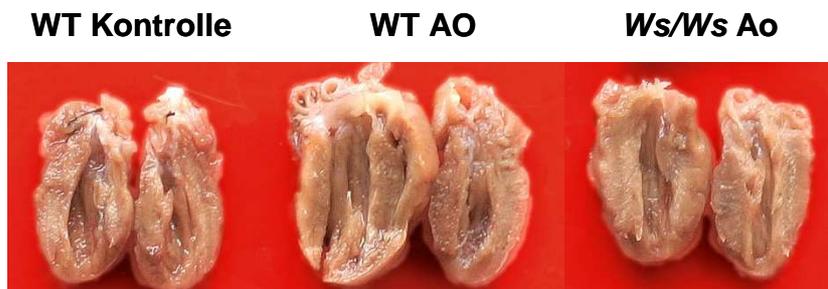


Abbildung 21: Rechtsherzvergrößerung in WT AO Ratten. Ws/Ws Rattenherzen zeigten gegenüber WT Kontrollrattenherzen keine Auffälligkeiten.

Ebenso war das vaskuläre Remodelling, charakterisiert durch eine Zunahme der medialen Wandstärke, sowie der mikrovaskulären Muskularisierung und eine Verringerung des Gefäßlumens in Ws/Ws AO-Ratten im Vergleich zu Wildtypen mit AO merklich herabgesetzt (Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 24). Sham-operierte Ws/Ws Ratten zeigten gegenüber Wildtypen hinsichtlich der gemessenen Parameter keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt).

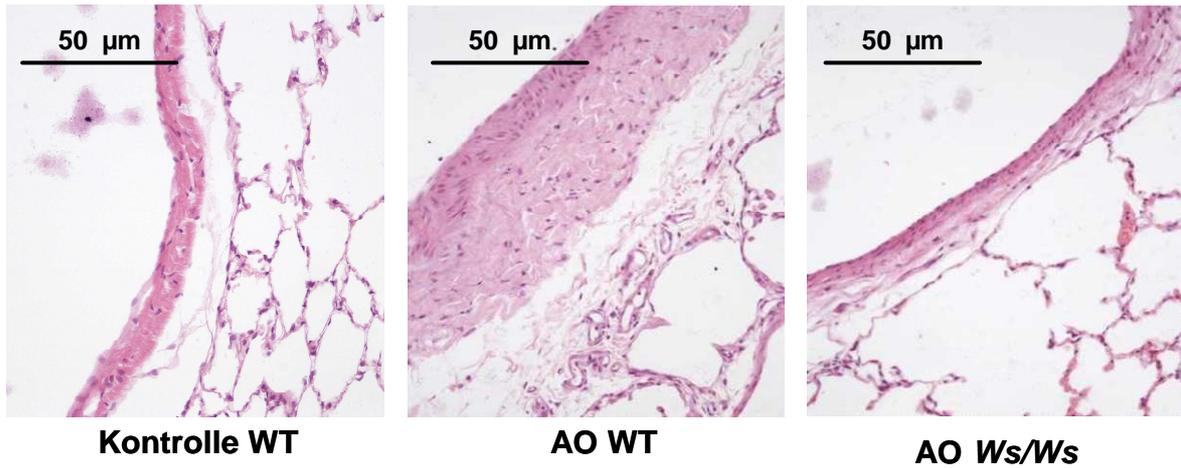


Abbildung 22: Auswirkungen der Mastzelldefizienz auf den vaskulären Gefäßumbau. Repräsentative HE-Bilder von Lungenschnitten zeigen eine signifikante Mediaverdickung in Pulmonalgefäßen von AO-Wildtypmatten im Vergleich zu Sham-operierten Wildtypmatten oder *Ws/Ws* AO-Ratten. Repliziert in je n=5 Tieren.

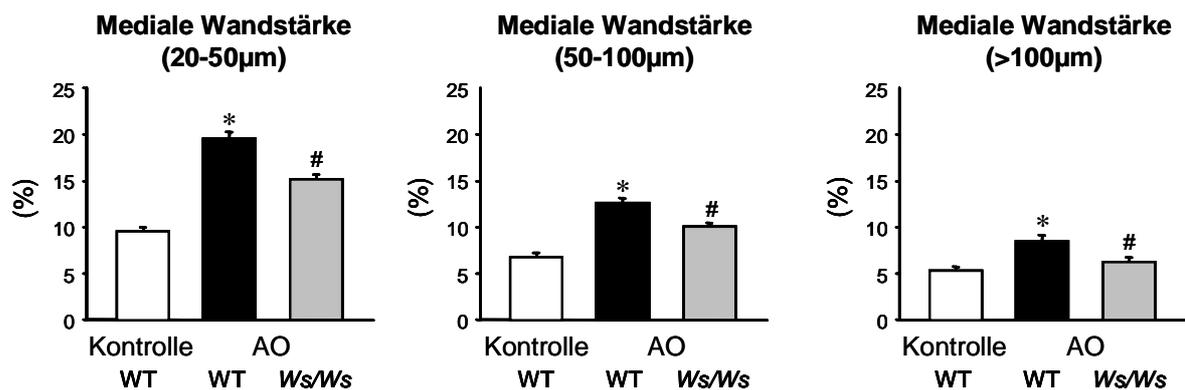


Abbildung 23: Auswirkungen der Mastzelldefizienz auf das vaskuläre Remodelling. Mediale Wandstärke der pulmonalen Arteriolen mit 20–50 µm, 50–100 µm und >100 µm im Durchmesser in Lungen von Kontroll-Wildtypmatten, AO-Wildtypmatten und *Ws/Ws* AO-Ratten. Daten von je n=6 Tieren. *p<0.05 vs. Kontrolle WT, #p<0.05 vs. AO WT.

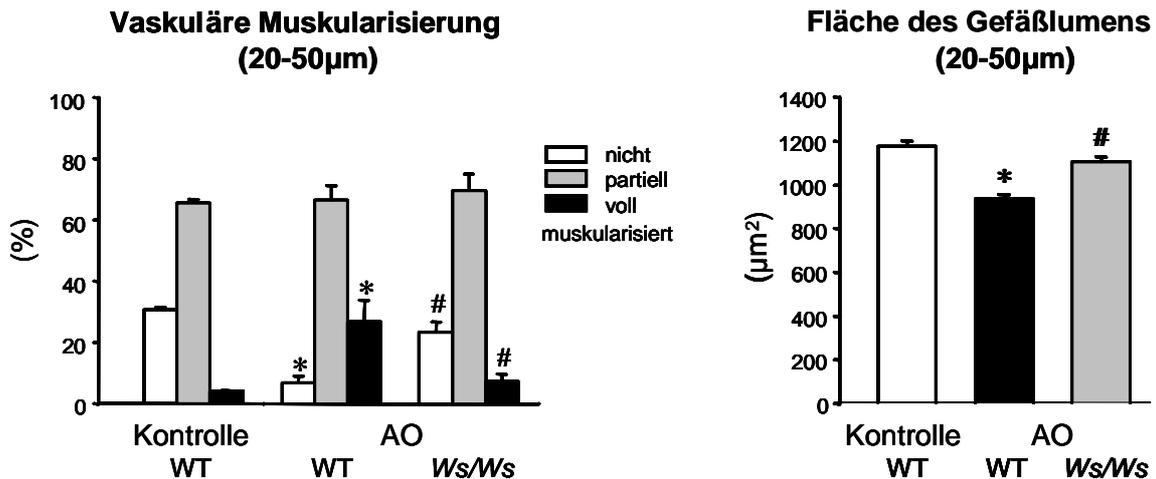


Abbildung 24: Auswirkungen der Mastzelldefizienz auf die Muskularisierung und die Fläche des Gefäßlumens. Grad der Muskularisierung und Lumenfläche der pulmonalen Arteriolen von 20–50 µm Durchmesser in Lungen von Kontroll-Wildtypmatten, AO-Wildtypmatten und *Ws/Ws* AO-Ratten. Daten von je n=6 Tieren. *p<0.05 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. AO.

Im Einklang mit den Ergebnissen, die in Sprague-Dawley-Ratten[®] gewonnen wurden, führte die AO in WT-Ratten zu einer Akkumulation und Degranulation von Mastzellen (Abbildung 25).

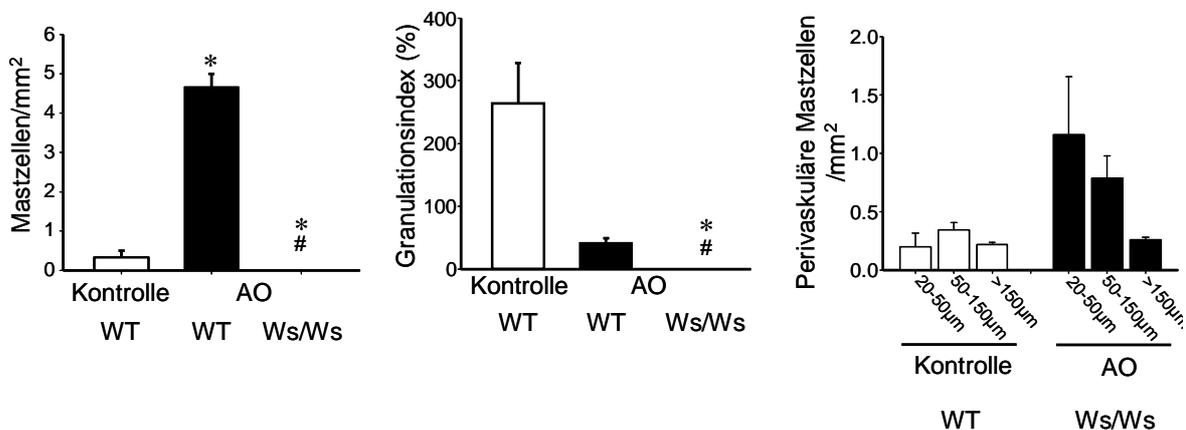


Abbildung 25: Mastzellanalysen in Wildtypmatten und *Ws/Ws* Ratten. Die Abbildungen zeigen Mastzellendichte in Lungenschnitten, Granulationsindex und die Anzahl an perivaskulären Mastzellen, die sich um die pulmonalen Gefäße mit Durchmesser 20-50µm, 50-150µm und >150µm in Kontroll-Wildtypmatten-, AO-Wildtypmatten und *Ws/Ws* AO-Ratten befinden. Daten von je n=8 Tieren; *p<0.05 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. AO.

Wie für diesen Phänotyp beschrieben und erwartet, konnten in Lungenschnitten von *Ws/Ws* AO-Ratten im Vergleich zu AO-Wildtypatten keine Mastzellen nachgewiesen werden (Abbildung 26).

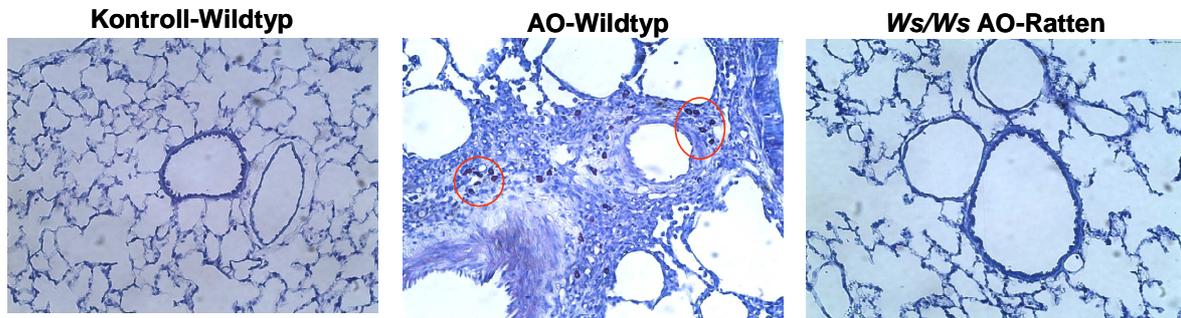


Abbildung 26: Histologischer Nachweis der Mastzelldefizienz in *Ws/Ws* AO-Ratten. Repräsentative histologische Bilder von Lungenschnitten von Kontroll-Wildtypatten (links), AO-Wildtypatten (Mitte) und *Ws/Ws* AO-Ratten (rechts), gefärbt mit dem Mastzellfarbstoff Toluidinblau. Während in dem Kontrollwildtypschnitt und dem Lungenschnitt einer *Ws/Ws* AO-Ratte keine Mastzellen zu finden sind, sieht man im Lungenschnitt der AO-Wildtypatte perivaskulär zahlreiche violette Mastzellen, die zur besseren Ortung teilweise rot eingekreist wurden. Jeweils oben rechts befindet sich ein Maßstab. Repliziert in je n=5 Tieren.

4.5 Auswirkungen des Mastzellstabilisators Ketotifen in der Monocrotalin-induzierten PH

Um auszutesten, ob die funktionelle Rolle der Mastzellen für die Entstehung einer PH und des pulmonalen Gefäßumbaus auch auf nicht-kardiogene Formen der PH zutrifft, analysierten wir die Effekte von Ketotifen im Rattenmodell der Monocrotalin (MCT)-induzierten pulmonalarterieller Hypertonie (PAH).

Innerhalb von 3 Wochen nach der MCT Injektion hatten die Ratten eine ausgeprägte PH mit markantem pulmonalvaskulären Remodelling entwickelt. Dies zeigt sich in einem Anstieg des PAP, einer Rechtsherzhypertrophie (Abbildung 27) sowie einer Erhöhung der medialen Wandstärke der Lungengefäße (Abbildung 28). Analog zu den Ergebnissen in AO-Ratten minderte die Behandlung der Ratten mit Ketotifen diese Effekte signifikant ab.

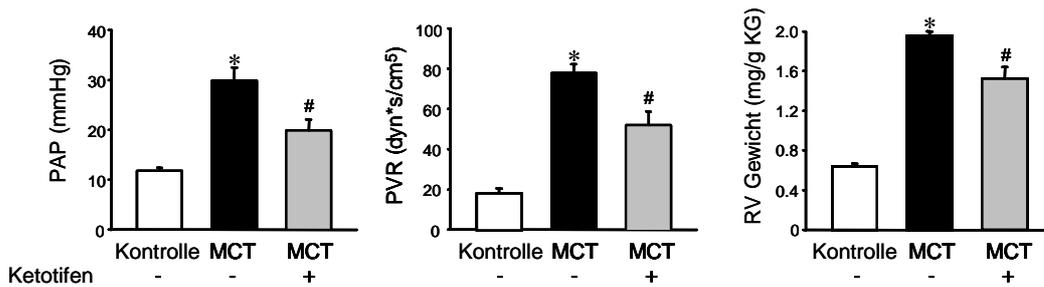


Abbildung 27: PAP, PVR und RV Gewicht in Kontrollratten, Monocrotalin (MCT)-Ratten und Ketotifen-behandelten MCT-Ratten. Daten von je n=6 Tieren. *p<0.05 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. MCT.

Dieser Befund wird durch echokardiographische Analysen unterstützt, die zeigen, dass es unter MCT zu einem Anstieg der rechtsventrikulären enddiastolischen Fläche als Ausdruck eines *Cor Pulmonale* kommt, der aber durch Ketotifen weitgehend verhindert wird. Die linksventrikuläre enddiastolische Fläche wurde dabei weder von MCT noch durch Ketotifenbehandlung verändert (Abbildung 28).

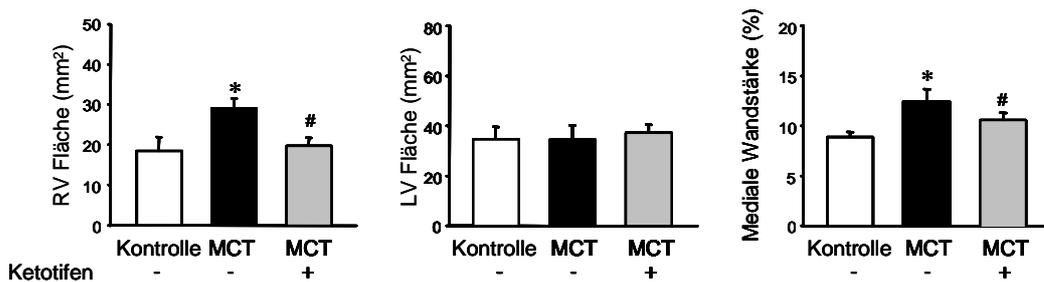


Abbildung 28: Rechtsventrikuläre (RV) und linksventrikuläre (LV) enddiastolische Fläche und mediale Wandstärke von Pulmonalarterien in Kontrollratten, Monocrotalin (MCT)-Ratten und Ketotifen-behandelten MCT-Ratten. Daten von je n=10 Tieren; *p<0.05 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. MCT.

4.6 Vaskuläres Remodelling und Monocrotalin-induzierte PH in mastzelldefizienten Ws/Ws Ratten

Um die Hypothese, dass Mastzellen auch in der PAH eine entscheidende Rolle spielen, weiter zu untermauern, wurden die Auswirkungen von MCT in mastzelldefizienten Ws/Ws Ratten und entsprechenden WT Ratten getestet.

WT Ratten zeigten charakteristische Merkmale einer durch MCT induzierten PAH in Form eines erhöhten PAP und PVR, einer rechtsventrikulären Hypertrophie,

echokardiographische Anzeichen eines *Cor pulmonale* und einer rechtsventrikulären Dysfunktion sowie ein massives vaskuläres Remodelling. All diese Effekte waren in den mastzelldefizienten *Ws/Ws* Ratten, die MCT injiziert bekommen hatten, verringert oder teilweise sogar vollständig aufgehoben (Abbildung 29).

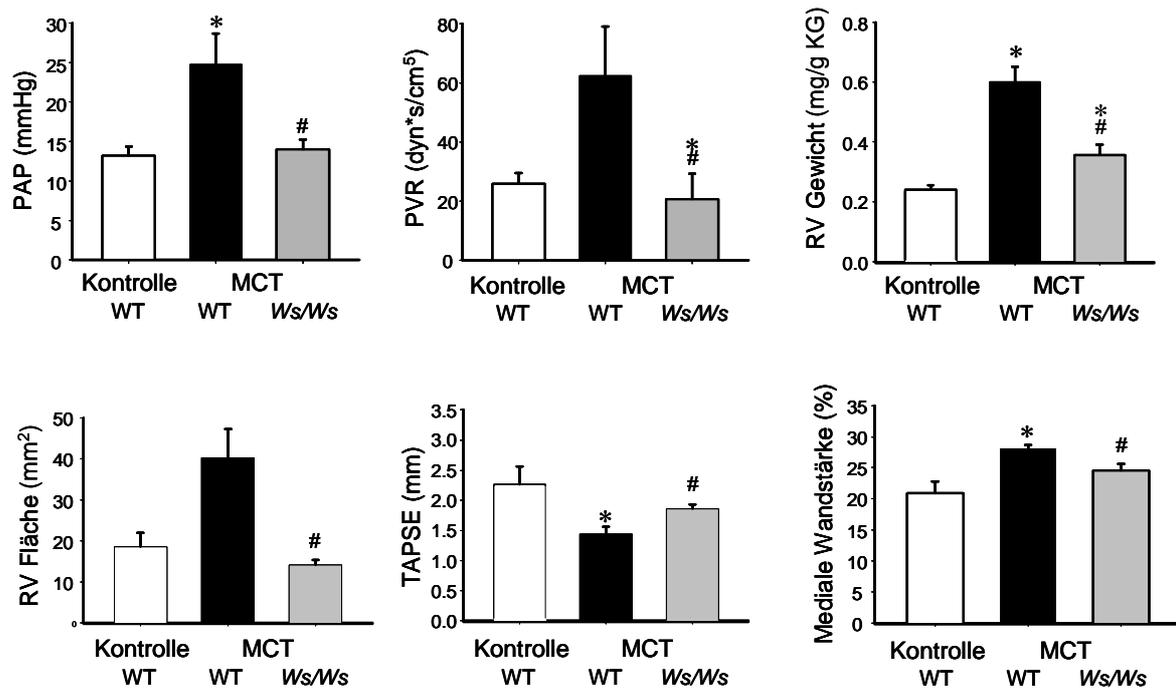


Abbildung 29: PAP, PVR und RV Gewicht, RV Fläche, TAPSE und mediale Wandstärke von Pulmonalarterien in WT Ratten, Monocrotalin (MCT)-WT Ratten und mastzelldepletierten *Ws/Ws* MCT-Ratten. Daten von je n=6 Tieren. *p<0.05 vs. Kontrolle WT, #p<0.05 vs. MCT WT.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Mastzellen nicht nur in PH mit Linksherzerkrankungen, sondern auch in anderen Formen der PH, hier am Beispiel der Monocrotalin-induzierten PAH, eine entscheidende Rolle im pulmonal-vaskulären Remodelling spielen. Sie stellen somit einen gemeinsamen pathophysiologischen Mechanismus dar, der unabhängig von der individuellen Form der PH ist und therapeutisch potentiell als Angriffspunkt genutzt werden kann.

4.7 Auswirkungen des Mastzellstabilisators Cromoglicinsäure (Cromolyn Sodium Salt (CSS)) oder des c-Kit spezifischen Inhibitors PLX in der Monocrotalin-induzierten PH

Da Ketotifen nicht hochspezifisch ist, sondern auch Nebeneffekte hat, wurde in einem zweiten Ansatz im Rahmen einer Kooperation mit der AG Schermuly (University of Giessen Lung Center (UGLC), Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany) (57), ein weiterer Mastzellstabilisator, Cromoglicinsäure, ebenfalls präventiv im Monocrotalinmodell der Ratte getestet. CSS ist ein zugelassener Leukotrienrezeptorantagonist, wird in der Klinik bislang lokal bei allergischem Asthma bronchiale und Allergie appliziert und verhindert, vergleichbar zu Ketotifen, die Degranulation von Mastzellen.

Außerdem kam ein selektiver c-Kit Inhibitor PLX präventiv zum Einsatz. Die Aktivierung des c-Kit-Rezeptors spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung, Proliferation, Migration und Degranulation von Mastzellen. Einige, mit Mastzellen zusammenhängende pathologische Zustände sind mit einer c-Kit Dysregulation assoziiert (58-61). Daher wurde hier zusätzlich der selektive c-Kit Inhibitor PLX eingesetzt.

Als Kontrolle dienten eine Placebogruppe mit PAH sowie eine gesunde Gruppe ohne Monocrotalininjektion.

4.7.1 Hämodynamik, Rechtsventrikelhypertrophie und pulmonalvaskuläres Remodelling

Placebo-behandelte Ratten mit einer Monocrotalin-induzierten PAH entwickelten einen signifikant höheren rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSP) und eine deutliche Rechtsherzhypertrophie im Vergleich zu gesunden Kontrollratten. Mit CSS (tägliche intraperitoneale Gabe von 40mg/kg KG) oder PLX (tägliche orale Gabe von 50mg/kg KG) behandelte MCT-Ratten hingegen, zeigten einen signifikant niedrigeren RVSP und eine verringerte Rechtsherzhypertrophie im Vergleich zur Placebogruppe. Der systemische arterielle Druck (SAP) unterschied sich nicht zwischen den 4 Gruppen nicht signifikant (Abbildung 30).

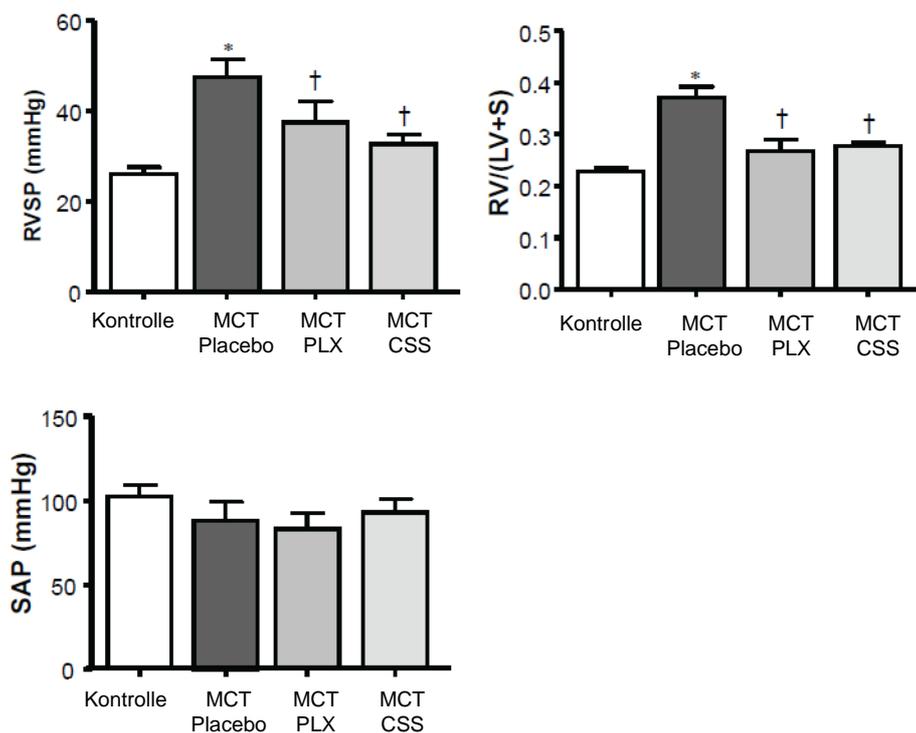


Abbildung 30: Effekte der c-Kit- und Mastzelldegranulationsinhibition bei Monocrotalin-induzierter PAH. Ratten wurden von Tag 1 bis Tag 21 nach MCT-Injektion mit einem selektiven c-Kit Inhibitor PLX, einem Mastzellstabilisator CSS oder Placebo behandelt. Kontrollratten erhielten anstatt MCT eine Injektion mit Kochsalzlösung. Daten sind von je n=8-10. *p<0.05 vs. Kontrolle, †p<0.05 vs. MCT Placebo.

In MCT Placebo Ratten wurde mit Hilfe einer Elastika-Färbung eine erhöhte Muskularisierung und Verdickung der medialen Wand distaler pulmonaler Gefäße gemessen. Repräsentative Bilder von Elastika gefärbtem Lungengewebe sind in Abbildung 31 zu sehen. Die vaskuläre Morphologie zeigte einen erhöhten Anteil an vollmuskularisierten Gefäßen und eine Abnahme nicht muskularisierter Gefäße in der MCT Placebo Gruppe im Vergleich zu gesunden Kontrollratten.

Demgegenüber wurden in MCT Ratten, die mit PLX oder CSS behandelt worden waren, geringere Prozentsätze an vollmuskularisierten Gefäßen detektiert. Des Weiteren war eine Zunahme der Gefäßwanddicke in der MCT Placebo-Gruppe im Vergleich zu Kontrollentieren zu beobachten, die ähnlich der Anzahl vollmuskularisierter Gefäße in mit PLX oder CSS behandelten MCT-Ratten signifikant gegenüber den Placebo-behandelten PAH Ratten vermindert war.

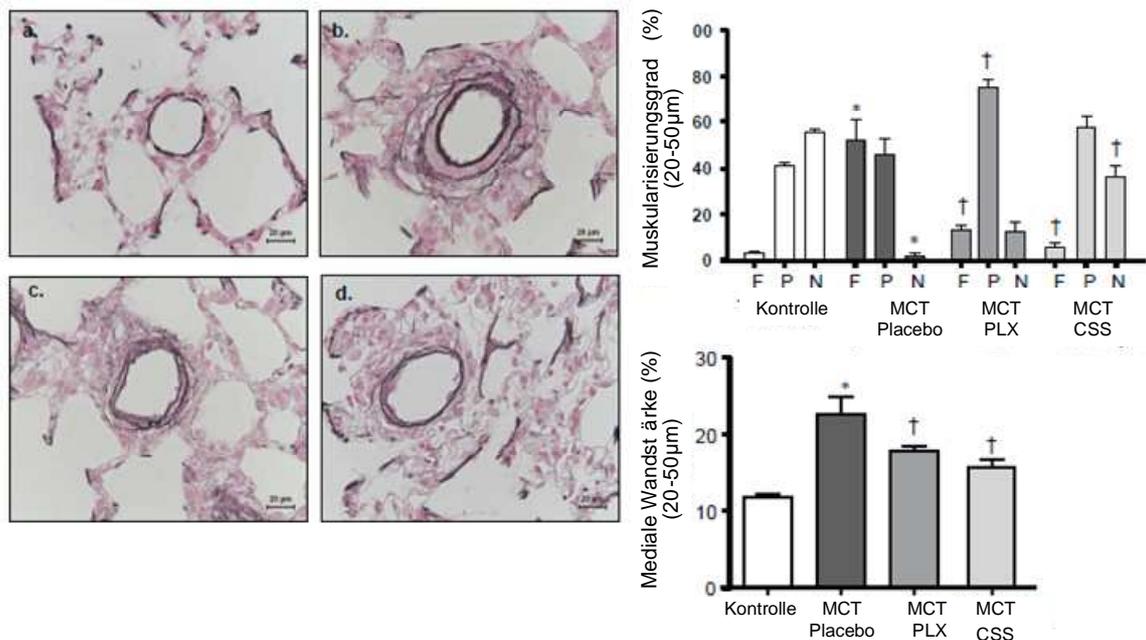


Abbildung 31: Effekte der c-Kit- und Mastzelldegranulationsinhibition auf das pulmonalvaskuläre Remodelling in MCT Ratten. Ratten wurden von Tag 1 bis Tag 21 nach MCT-Injektion mit dem selektiven c-Kit Inhibitor PLX, dem Mastzellstabilisator CSS oder einem Placebo behandelt. Kontrollratten erhielten anstatt MCT eine Injektion mit Kochsalzlösung. Von dem Lungengewebe wurden Doppelimmunofärbungen für von-Willebrand-Faktor und α -smooth muscle actin sowie Elastikafärbungen durchgeführt und die Schnitte anschließend morphometrisch ausgewertet. a: gesunde Kontrolle, b: Placebo MCT, c: PLX MCT und d: CSS MCT. F= vollmuskularisiert, P= teilmuskularisiert, N= nicht-muskularisiert. Daten sind von je n=8-10. *p<0.05 vs. Kontrolle, †p<0.05 vs. MCT Placebo.

4.7.2 Mastzellzahlen und Granulationsindizes

Auch in dieser Studie wurden neben hämodynamischen Größen und Parametern des vaskulären Remodellings auch die Gesamtzahl der Mastzellen sowie deren Granulationsindizes bestimmt. Im Vergleich zu Kontrollratten oder mit PLX oder CSS behandelten Ratten war die Gesamtzahl an Mastzellen in Placebo MCT Ratten signifikant erhöht. Der in Placebo MCT- im Vergleich zu Kontrollratten verringerte IOG stieg unter Behandlung mit PLX oder CSS wieder signifikant an (Abbildung 32).

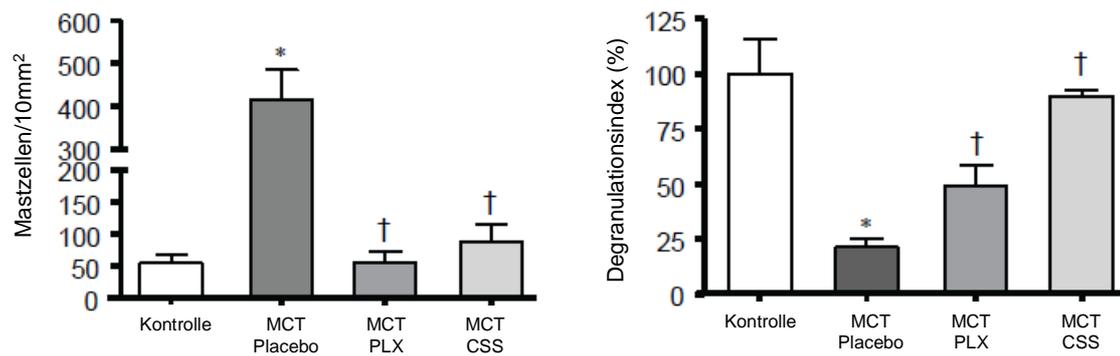


Abbildung 32: Effekte der c-Kit- und Mastzelldegranulationsinhibition auf pulmonale Mastzellen in MCT Ratten. Ratten wurden von Tag 1 bis Tag 21 nach MCT-Injektion mit dem selektiven c-Kit Inhibitor PLX, dem Mastzellstabilisator CSS oder Placebo behandelt. Kontrollratten erhielten anstatt MCT eine Injektion mit Kochsalzlösung. Lungenschnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt und die angefärbten Mastzellen gezählt und als Gesamtzahl pro Gewebeschnittfläche angegeben. Perivaskuläre Mastzellen wurden als granuliert oder degranuliert eingestuft und der IOG berechnet. Daten sind von je n=6-8. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle, † $p < 0.05$ vs. MCT Placebo.

5 DISKUSSION

5.1 PH

Die pulmonale Hypertonie ist eine chronische, lebensbedrohliche Erkrankung, die durch hohen Blutdruck in den Arterien zwischen Herz und Lunge gekennzeichnet ist. Die Funktionen von Herz und Lunge sind stark beeinträchtigt, was sich in einer eingeschränkten körperlichen Leistungsfähigkeit und letztendlich in einer verkürzten Lebensdauer niederschlägt. Etwa 100.000 Menschen in Europa und den USA leiden an einer der fünf Formen der Erkrankung. Während es für die PAH zahlreiche Therapiemöglichkeiten gibt, sind die Therapieansätze für PH der Klassen 2-5 begrenzt und scheitern oft schon in präklinischen Studien. Daher sind neue Therapieansätze dringend erforderlich, um unter anderem PH mit Linksherzerkrankung behandeln zu können. Aufgrund der langjährigen Erfahrung unserer Arbeitsgruppe mit dieser Form der PH und der Expertise bezüglich des Rattenmodells der durch Aortenbanding induzierten pulmonalen Hypertonie infolge von Linksherzerkrankung, fokussiert sich die vorliegende Arbeit auf diese Klasse der PH. Die spezifischen Ziele dieser Arbeit waren somit:

- Identifikation und Verifizierung neuer Zielgene bei PH mit Linksherzinsuffizienz
- Funktionelle Testung dieser Gene in verschiedenen PH-Rattenmodellen mit einem pharmakologischen Ansatz
- Funktionelle Testung dieser Gene in verschiedenen PH-Rattenmodellen mit einem genetischem Ansatz
- Identifikation möglicher Signaltransduktionswege bei pulmonal-vaskulärem Remodelling und der Entstehung der PH

5.2 Diskussion der eingesetzten Methoden und ihrer potentiellen Limitationen

Wie jedes *in vivo* Tiermodell, ahmen auch die PH-Tiermodelle die Pathophysiologie der humanen PH nur bis zu einem gewissen Grad nach. Dabei haben sie alle Vor- aber auch Nachteile und Limitationen. Im Vergleich zu *in vitro*

Modellen ermöglichen *in vivo* Modelle die Untersuchung der Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen und Organen und die Untersuchung verschiedener pathophysiologischer Krankheitsmechanismen. Im vorliegenden Fall lässt sich z.B. die gezeigte Rolle von Mastzellen beim vaskulären Remodelling nicht in einer Monozellkultur simulieren. *In vitro* kann nur modelliert werden, wenn die zugrundeliegenden Mechanismen und Stimuli sowie die involvierten Zellen identifiziert sind; dies ist aber gerade bei der PH infolge von Linksherzerkrankung nicht der Fall. Tiermodelle eignen sich besonders gut zur Untersuchung der Entwicklung einer PH-Erkrankung, der ursächlichen Mechanismen, beteiligter Zelltypen und der Identifikation und Charakterisierung beteiligter Gene wie im Fall der vorliegenden Arbeit. Nachteile der Tiermodelle sind hohe Kosten, zeitintensive Analysen und die Tatsache, dass jedes Tiermodell nur einige Charakteristika einer Erkrankung, nicht jedoch das gesamte, multifaktorielle Krankheitsbild abbilden kann. Zur besseren Evaluierung unserer Hypothese und zur breiten Abdeckung möglichst vieler Charakteristika der PH wurden daher in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche PH-Modelle verwendet.

Ein ideales kardiovaskuläres Tiermodell sollte die humane Erkrankung möglichst gut abbilden, Untersuchungen in einer chronischen und stabilen Krankheitssituation erlauben, vorhersehbare, reproduzierbare und kontrollierbare Symptome erzeugen, ökonomischen, technischen und tierschutzrechtlichen Anforderungen Rechnung tragen und die Möglichkeit bieten, kardiale, biochemische und hämodynamische Parameter zuverlässig zu messen (62). In der Vergangenheit konnten mit Hilfe der PH-Tiermodelle im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen wegweisende Untersuchungen gemacht, Signalwege identifiziert, Substanzen getestet und klinische Studien vorbereitet werden.

Experimentelle PH-Tiermodelle lassen sich durch pathophysiologische Stimulation wie Hypoxie, durch chemisch-toxische Stimuli wie Monocrotalin, durch molekulare Stimuli wie Angiopoetin-1-Überexpression oder genetische Stimuli wie 5-HTT-Überexpression erzeugen.

Im Folgenden wird auf die beiden, in dieser Arbeit verwendeten, PH-Modelle eingegangen. Das Aortenbandingmodell der Ratte wurde aufgrund der Fragestellung der vorliegenden Arbeit gewählt: es ist das einzig etablierte,

charakterisierte, anerkannte und von uns mehrfach publizierte Model der Klasse 2 der PH (29;63-66). Als zweites PH-Rattenmodell wurde das Monocrotalin-induzierte PAH-Modell gewählt. Die PAH ist die meistuntersuchte Klasse der PH und das Monocrotalin-Modell das derzeitige Standardmodell für diese PH-Klasse. Es ist gut etabliert, charakterisiert, zuverlässig und einfach in der Handhabung, auch im Vergleich zu dem alternativ vorhandenen chronischen Hypoxiemodell.

5.2.1 Rattenmodell der PH mit Linksherzinsuffizienz durch Aortenbanding

Das Aortenbandingmodell der Ratte bildet das Krankheitsbild der PH-Klasse 2 nach und wurde von uns bereits in zahlreichen Publikationen zur Charakterisierung der Pathophysiologie dieser PH-Klasse bzw. zur Austestung neuer Behandlungsstrategien erfolgreich eingesetzt (29;49;54;64). Es ist derzeit das einzige anerkannte Tiermodell für diese Klasse der PH. Obwohl dieses Modell ursprünglich hauptsächlich für Untersuchungen der Linksherzfunktion genutzt wurde, bietet es sich hervorragend als Modell für die Klasse 2 der PH an und wird heutzutage auch vielfältig so verwendet (67). Das Modell der partiellen Konstriktion der Rattenaorta durch Aortenbanding mittels eines Hemoclips besitzt die typischen Charakteristika einer PH mit Linksherzinsuffizienz wie rechtsventrikuläre Hypertrophie, erhöhter pulmonalvaskulärer Widerstand, vaskuläres Remodelling, endotheliale Dysfunktion und Gefäßhypertrophie (29;49). Bemerkenswerterweise sind der Aortenfluss, SAP und die linksventrikuläre Auswurffraktion in diesen Ratten unbeeinträchtigt. Daher spiegelt dieses Modell das klinische Bild des Herzversagens mit erhalten gebliebener Auswurffraktion sehr gut wieder. Dies ist eine Kategorie von Herzversagen, der eher eine gestörte diastolische und nicht eine gestörte systolische ventrikuläre Funktion zugesprochen wird (68) und die mit einer höheren Inzidenz an PH Patienten in Zusammenhang gebracht wird (47). Diese Charakteristika machen das Aortenbandingmodell der Ratte zu einem die humane Situation gut abbildenden Modell.

Nachteile ergeben sich aus dem chirurgischen Eingriff des suprakoronaren Aortenbandings und der damit verbundenen Infektionsgefahr. Diese wird durch entsprechende antibiotische Behandlung der Ratten nach OP minimiert und durch Verwendung Sham-operierter Ratten normalisiert. Außerdem ist diese PH relativ

moderat. Nichtsdestotrotz ist das pulmonalvaskuläre Remodelling deutlich ausgeprägt.

5.2.2 Rattenmodell der PAH durch Monocrotalin

Die subkutane Gabe einer einzelnen Dosis (60 mg/kg KG) Monocrotalin (MCT) gilt in Ratten als nicht-invasives, sich langsam entwickelndes und hämodynamisch relevantes Standardmodell für die PAH. Monocrotalin ist ein Pyrrolalkaloid, das in den Samen der *Crotalaria spectabilis* vorkommt und wie 1967 von Kay and Heath *et al.* gezeigt pulmonale Hypertonie in Ratten induziert (69). 3 Wochen nach Injektion des Monocrotalins entwickelt sich ein moderates Rechtsherzversagen mit Ödembildung. Muskularisierung der pulmonalen Gefäße, eine erhebliche entzündliche Reaktion und endothelialer Zelltod stellen charakteristische Merkmale dieses Modells dar. MCT übt seine toxische Wirkung direkt auf Endothel- und interstitielle Zellen aus und beschädigt initial insbesondere Pulmonalarteriolen und Kapillaren (67;70). In den Wochen 2-4 nach MCT-Injektion kommt es zu einer erheblichen Mediaverdickung in muskularisierten Arterien und zur Muskularisierung normalerweise nicht muskularisierter Arterien. Zusammen mit adventitieller Proliferation führen all diese Veränderungen zu starkem vaskulären Remodelling, einem erhöhten vaskulären Widerstand und signifikant erhöhten rechtsventrikulären Drücken von bis zu 80 mmHg.

Das MCT-Modell ist zuverlässig reproduzierbar, vorhersehbar und produziert eine schwere PAH. Allerdings löst es nicht die Bildung von pulmonalen plexiformen Läsionen aus, und spiegelt somit nicht die pathognomischen Charakteristika der idiopathischen PAH beim Menschen wieder. Zudem führt die rasche Entwicklung der PH bereits nach 6 Wochen zum Tod. Im Vergleich zur humanen PAH entfällt somit die mögliche Entwicklung kompensatorischer Mechanismen während des Krankheitsverlaufs. Ferner ist es durch eine initiale starke inflammatorische Reaktion gekennzeichnet, die nicht der Entwicklung der PH beim Menschen entspricht. 1995 räumte Heath *et al.* ein, dass es quantitative und qualitative Unterschiede zwischen der Struktur der glatten Muskelzellen in muskularisierten Pulmonalarteriolen von Ratten gibt, die entweder in Hypoxie gehalten oder MCT injiziert bekamen (71) und dass das MCT-Modell nicht in vollem Maße die klinische Situation widerspiegelt (72).

5.2.3 Verwendete Interventionen

Zur Untersuchung der Rolle der Mastzellen bei der Entstehung der PH in zwei verschiedenen PH-Rattenmodellen wurden zweierlei Interventionsstrategien verwendet.

5.2.3.1 Mastzellstabilisatoren

Zum einen nutzten wir einen pharmakologischen Ansatz, bei dem der Mastzellstabilisator Ketotifen präventiv zum Einsatz kam und eine deutliche Reduktion der PH und des vaskulären Remodellings erreichte. Eine gewisse Unspezifität von Ketotifen ist hierbei als Limitation zu nennen, da es neben der Hemmung der Mastzelldegranulation auch die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten hemmen kann. Aus diesem Grund und um den Effekt von Ketotifen zu verifizieren wurde neben Ketotifen auch der Mastzellstabilisator Cromoglycinsäure eingesetzt, der die Rolle der Mastzellen bei PH bestätigte.

5.2.3.2 Mastzelldefiziente Ratten

Um in einem zweiten, genetischen Ansatz die Rolle der Mastzellen bei der Pathogenese einer PH zu testen, nutzen wir mastzelldefiziente *Ws/Ws* Ratten. *Ws/Ws*-Ratten besitzen zwei mutante Allele im „white spotting (*Ws*)“ Locus, der mit dem *c-kit* Protoonkogen-Lokus identisch ist. Aufgrund dessen sind Welpen der *Ws/Ws*-Ratten mastzelldefizient und stark anämisch als Folge eines Defekts von Mastzell- und Erythrozytenvorläuferzellen.

Einerseits bieten sich diese Ratten als wertvolles Model mastzellbedingter oder – induzierter Erkrankungen an. Andererseits ergeben sich Limitationen dadurch, dass neben einer Mastzelldefizienz eine leichte Anämie in jungen *Ws/Ws* Ratten nachgewiesen wurde, die allerdings mit zunehmendem Alter abnimmt (73). Es ist nicht auszumachen, in wieweit sich diese leichte Anämie auf unsere Untersuchungen auswirkt.

Als Kontrollen dienen BN/fMai Wildtypen mit demselben genetischen Hintergrund, die sich von den *Ws/Ws* Ratten neben der unterschiedlichen Bildung hämatopoietischer Zellen auch durch eine andere Fellfarbe unterscheiden (Abbildung 33).

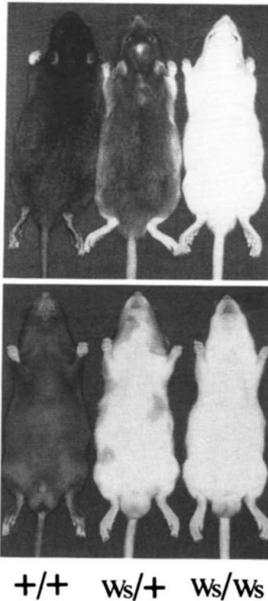


Abbildung 33: Phänotyp der *Ws/Ws* Ratten. Fellfarben der Ratten mit $+/+$, $Ws/+$ und Ws/Ws Genotyp (73); oben Rückenansicht der Ratten, unten die Bauchseite der Ratten.

Der Grund dafür, dass wir für diese Studie mastzelldefiziente *Ws/Ws* Ratten und nicht mastzelldefiziente *W/W^v* Mäuse nutzten, findet sich in einer Publikation von Zhu *et al.*, die zeigt, dass man in diesen Mäusen keine Verbesserung der Hypoxie-induzierten PH nachweisen kann (74). Die Rolle der Mastzelle bei der Entstehung der PH scheint sich somit speziesabhängig im Menschen und der Ratte zu bestätigen, nicht jedoch in Mäusen.

5.2.4 Untersuchte Parameter

Die untersuchten Parameter erfassen in idealer Weise die Charakteristika des vaskulären Remodellings und der PH und die Effekte, die durch oben genannte Interventionen erzielt werden konnten. Hämodynamische Messungen der pulmonalen Drücke geben Aufschluss darüber, wie sich der wichtigste Parameter der PH, der PAP, verhält, wie er unter AO ansteigt und ob er durch Interventionen wieder gesenkt werden kann. Die Funktion und Funktionalität des rechten Herzens lässt sich einerseits mit Hilfe des Fulton Index überwachen, andererseits dienen echokardiographische Messungen der Überprüfung der Herzfunktion wie z.B. TAPSE als Maß für die rechtsventrikuläre systolische longitudinale Funktion. Vaskuläres Remodelling wird optimal durch histologische Messungen der Wandstärke, des Gefäßlumens und der Wandmuskularisierung in verschiedenen Gefäßgrößen bestimmt. Ebenfalls anhand histologischer Untersuchungen wurden

Mastzellgesamtzahlen, Mastzellverteilung im Gewebe und Granulationsstatus beobachtet und die Auswirkungen verschiedener Interventionen quantifiziert.

5.3 Mastzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden Mastzellen als entscheidende Effektorzellen bei der Pathogenese des vaskulären Remodellings der PH identifiziert und werden hier vorgestellt.

5.3.1 Hintergrund

Mastzellen wurden erstmals 1878 von Paul Ehrlich beschrieben, der sie aufgrund ihrer Fähigkeit der „Metachromasie“ (Farbwechsel) der intrazellulären Granula in Anwesenheit basischer Anilinfarbstoffe identifizierte (75). Er nahm an, dass diese Granula durch Phagozytose entstehen und die Zellen damit „gemästet“ würden (76-78). Im Gegensatz zu basophilen Granulozyten, mit denen die Mastzellen viele Eigenschaften gemeinsam haben, sind sie gewebeständig und als reife Mastzellen nicht im peripheren Blut vorhanden.

Mastzellen sind 6 - 20 μm große, mononukleäre, im Gewebe vorkommende Zellen mit zahlreichen zytoplasmatischen Granula (Abbildung 34). Sie machen einen Anteil von 2-8% der dermalen Zellen aus. Ihr Nukleus ist elektronenmikroskopisch ungelappt, in den Granula sind Mediatoren gespeichert.

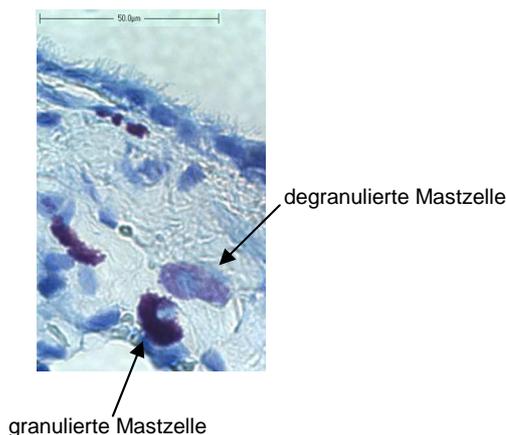


Abbildung 34: Granulierte und degranulierte Mastzelle in einem Toluidinblau gefärbten, in Paraffin eingebetteten Lungenschnitt. Granulierte Mastzellen erscheinen dunkelviolet, degranulierte hellviolett. Balken: 50 μm .

In der Zellmembran der Mastzellen finden sich unter anderem Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, darunter der SCF-Rezeptor c-Kit (79), sowie für Sekretionsaktivatoren, z.B. der hochaffine IgE-Rezeptor FcεRI, und Adhäsionsmoleküle (80;81).

5.3.2 Herkunft

Mastzellen stammen von spezifischen pluripotenten hämatopoietischen Vorläuferzellen im Knochenmark ab, welche als unreife Vorläufer im Blut zirkulieren und sich im peripheren Gewebe zu reifen Mastzellen differenzieren (58). Außer in der Haut, wo sie ihre höchste Besiedlungsdichte von durchschnittlich 7000-10000 Zellen/mm³ aufweisen, kommen sie im Gehirn, in den Alveolarwänden der Lunge, der Adventitia kleinerer Blutgefäße und den Schleimhäuten von Auge, Nase, Gastrointestinaltrakt und Urogenitaltrakt vor. Vorallem in den Organen, die die Grenzflächen des Organismus nach außen bilden, nämlich Haut, Atemwege und Darm, sowie im Gehirn werden zahlreiche Mastzellen angetroffen (82). Grund dafür ist, dass diese Gewebe Hauptangriffspunkte für Infektionen mit Bakterien, Viren oder Parasiten oder, wie im Falle des Gehirns, besonders zu schützen sind.

In den verschiedenen Geweben erfolgt eine weitere Ausreifung und Differenzierung der Mastzellen, wahrscheinlich wiederum gesteuert durch Zytokine und extrazelluläre Matrixkomponenten abhängig vom jeweiligen Mikromilieu (83). In den Zielgeweben sind die Mastzellen anschließend langlebig (84).

5.3.3 Heterogenität

Mastzellen weisen sowohl eine speziesabhängige, als auch eine organabhängige Heterogenität in Bezug auf morphologische, biochemische und funktionelle Eigenschaften auf. Bei Rattenmastzellen unterscheidet man nach der Lokalisation der Mastzellen zwischen CTMC (connective tissue-type mast cells) und MMC (mucosal mast cells). Sie unterscheiden sich hinsichtlich Morphologie, Färbeverhalten, Mediatorgehalt sowie ihrer Ansprechbarkeit auf Zytokine (85). Für die menschlichen Mastzellen gilt als wesentliches Kriterium der unterschiedliche intrazelluläre Gehalt von Tryptase (T) und Chymase (C). So gliedert man die Mastzellen in zwei Subpopulationen, von denen die eine (MC_{TC}, Tryptase und Chymase positive Mastzelle) sowohl Tryptase als auch Chymase beinhaltet.

Kürzlich zeigte Andersson *et al.*, dass eine veränderte Zusammensetzung der Mastzellpopulation mit einem stark erhöhten Anteil an MC_{TC} in krankem Alveolarparenchym in histopathologischen Lungenschnitten von Patienten mit zystischer Fibrose und idiopathischer pulmonaler Fibrose im Vergleich zu gesunden Lungen festzustellen ist. Hierbei korrelieren die Veränderungen in der Zusammensetzung der Mastzellpopulation auch mit dem Ausmaß an vaskulärem Remodelling und verschlechterten Lungenfunktionsparametern (86).

5.3.4 Aktivierung

Mastzellen werden durch Chemoattraktoren, die bei entzündlichen Prozessen freigesetzt werden, angelockt und verlassen die Gefäße mittels Bindung an Adhäsionsmoleküle, die sie ebenso wie Endothelzellen exprimieren (87). Als potente Attraktoren für Mastzellen gelten unter anderem SCF (88), C3a, C5a (89), IL- 8 (90) und Mitglieder der TGF- β – Familie (91). Die wohl bekannteste Mastzellaktivierung ist die durch IgE vermittelte Degranulation von Mastzellen im Rahmen allergischer und anaphylaktischer Reaktionen (92). Dabei binden IgE-Moleküle mit hoher Affinität an spezifische Rezeptoren (Fc ϵ RI) (58;80;93;94) auf der Mastzelloberfläche. Durch die Bindung eines oder mehrerer Antigene (z.B. eines Allergens) erfolgt die Quervernetzung der Rezeptoren. Darauf folgt die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade über Tyrosinkinasen, Phospholipase C γ (PLC γ), Inositoltrisphosphat (IP₃), Diacylglycerin (DAG) und Proteinkinase C (PKC) an. Dadurch wird Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt und darüber hinaus der Einstrom von extrazellulärem Calcium gefördert (95-97). Der erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel ermöglicht die Fusion mehrerer Granula miteinander bzw. mit der Zellmembran, was dann zur Ausschüttung ihres Inhalts in den Interzellularraum führt (98). Man unterscheidet zwischen einer Fc ϵ RI-vermittelten und nicht-Fc ϵ RI-vermittelten Aktivierung.

Neben der Aktivierung durch IgE und Antigene kann eine Vielzahl weiterer nicht-immunologischer Substanzen die Freisetzung von Mastzellmediatoren induzieren. Unter anderem können z.B. Komplementfaktoren, Neuropeptide, Bakterien und bakterielle Bestandteile, Zytokine, Bestandteile von Tiergiften sowie chemische und physikalische Reize die Freisetzung von Mastzellmediatoren hervorrufen (59;99).

5.3.5 Produkte der Mastzelle

Mastzellen können auf einen spezifischen Reiz hin eine große Bandbreite an potenten biologisch aktiven Mediatoren freisetzen (100-104). Sie alle vermitteln zahlreiche physiologische und pathophysiologische Effekte, z.B. bei Entzündungen, in der Immunität, beim Gewebeumbau und können Einfluss auf die Blutgerinnung, das Fibrinolyse-, Komplement- und Kinin-System haben. Einige dieser Substanzen sind präformiert in den zytoplasmatischen Granula gelagert, andere werden erst nach Aktivierung der Zelle durch IgE oder Antigen oder andere Stimuli synthetisiert. Zu den präformiert in den sekretorischen Granula gelagerten Mediatoren gehören Histamin, Proteasen, Proteoglykane (Heparin, Chondroitinsulfat E), geringe Mengen an Sulfatasen und Exoglykosidasen, aber auch Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

Die zweite Gruppe von Mediatoren wird durch *de novo* Synthese nach Mastzellaktivierung sehr schnell aus Membranphospholipiden generiert, darunter Prostaglandin D2 (PGD2), Leukotriene (LTB4, LTC4), Komplementfaktoren (C3a, C5a) und platelet activating factor (PAF). Die Mastzelle produziert außerdem eine große Menge an Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Zytokinen, unter anderem Interleukin-1 (IL-1), -3 (IL-3), -4 (IL-4), -6 (IL-6), -8 (IL-8), Fibroblast-Growth-Factor-2 (FGF-2), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Transforming Growth Factor beta (TGF- β) sowie Nerve Growth Factor (NGF) (105).

Proteasen machen den größten Teil des Proteingehalts der sekretorischen Granula aus. Die wichtigsten Gruppen von Mastzellproteasen sind die Serinproteasen, Chymase und Tryptase, und die Metalloproteinase Carboxypeptidase A. Bei der Maus wurden fünf verschiedene Chymasen (mouse mast cell protease (mMCP)-1, -2, -4, -5 und -9) und vier verschiedene Tryptasen (mMCP-6, -7 und -11 und mouse transmembrane tryptase (mTMT)) identifiziert (106;107). Beim Menschen hingegen scheint es nur eine Chymase und vier verschiedene Tryptasen (α , β , γ und δ) zu geben.

5.3.6 Funktionen

Aufgrund ihrer heterogenen Verteilung im Körper und der enormen Anzahl pharmakologisch potenter Mediatoren, ist die potentielle Beteiligung von Mastzellen an zahlreichen physiologischen und pathologischen Abläufen im Körper in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt.

Die Rolle der Mastzellen in der Überempfindlichkeitsreaktion ist in zahlreichen Studien durch *in vitro* und *in vivo* Versuche gut untermauert worden (108;109). Neben der Vermittlung allergischer Reaktionen gibt es jedoch unzählige Vorgänge, die teilweise seit langer Zeit mit Mastzellen assoziiert werden. Diese beinhalten Lipidmetabolismus (110), Blutgerinnung (111), Regulation des Blutdrucks (112), Alterung (113), Stressantworten (114) und Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (115) sowie Gastritis (116). In letzter Zeit implizierten eine Reihe von Studien die Mastzelle im Kontext vaskulärer Adaptationsprozesse und Remodelling sowohl unter physiologischen, als auch pathophysiologischen Bedingungen (117). So wurde beispielsweise die kritische Rolle der Mastzelle in der Formation neuer Blutgefäße bei angiogenetischen oder damit verwandten Prozessen wie Wundheilung (118), Tumorwachstum (119), der Formation und Entwicklung vaskulärer Läsionen wie bei der atherosklerotischen Plaqueformation (120), beim dystrophischen vaskulären Remodelling wie der Formation eines Aortenaneurysmas (121), oder in parenchymalem Remodelling assoziiert mit oder als Folge von vaskulärer Adaptations- und Krankheitsprozesse wie bei kardialem Remodelling nach Infarkt (122) oder pulmonaler Fibrose (86) nachgewiesen. Hier reihen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hervorragend ein (64). Angesichts der klinischen Relevanz kardiovaskulärer Erkrankungen als vorwiegende Todesursache in der westlichen Welt, könnten Mastzellen als neue therapeutische Zielzellen für Krankheiten, die mit vaskulären Adaptationsprozessen assoziiert sind, hervorgehen.

Über die Freisetzung von Mediatoren wie z.B. Histamin induzieren sie die Vasodilatation, erhöhen die Gefäßpermeabilität und stimulieren die zelluläre Infiltration nicht-immunologischer Zellen wie Endothel-, Epithel-, und Muskelzellen, aber auch immunologischer Zellen wie T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen.

5.4 Mastzellen und PH

In den letzten Jahren kristallisiert sich wie oben beschrieben zunehmend eine wichtige Rolle der Mastzellen im Rahmen von vaskulären Adaptations- und Umbauprozessen heraus.

In der vorliegenden Arbeit weisen wir nun erstmals die Beteiligung von Mastzellen bei hypertrophem vaskulärem Remodelling im Rahmen der pulmonalen Hypertonie nach (64). Bereits 1991 zeigten Heath und Mitarbeiter, dass die Gesamtzahl an Mastzellen pro mm² in Lungen von Patienten mit primärer oder sekundärer PH im Vergleich zu gesunden Menschen stark erhöht ist (123). Wir konnten diese Beobachtung in zwei verschiedenen Rattenmodellen der pulmonalen Hypertonie bestätigen, und zudem mit Hilfe pharmakologischer und genetischer Interventionsstrategien erstmals die funktionelle Bedeutung der Mastzellen in diesem Szenario nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit identifizieren wir Mastzellen als Katalysatoren des pulmonalvaskulären Remodellings bei PH. Gene Array Analysen ermittelten „Mastzellaktivierung“ als die am meisten hochregulierte GO Klasse in AO induzierter PH. Die Mastzellakkumulation in PH wurde untermauert durch genomische, proteomische und histologische Analysen von Kontroll- und AO-Rattenlungen. Eine funktionelle Rolle der Mastzellen bei PH mit Linksherzerkrankung wurde einerseits durch einen pharmakologischen Ansatz mit dem Mastzellstabilisator Ketotifen, andererseits durch eine genetische Herangehensweise unter Verwendung mastzelldefizienter *Ws/Ws* Ratten nachgewiesen. Beide Strategien milderten die PH ab, verminderten den PVR, das pulmonalvaskuläre Remodelling sowie die Rechtsherzhypertrophie und die rechtsventrikuläre enddiastolische Dilatation in AO Ratten. Der protektive Effekt von Ketotifen bzw. Mastzelldefizienz konnte ebenfalls in einem durch Monocrotalin-induzierten Model der PAH verifiziert werden. Im selben Model wurde neben Ketotifen ein weiterer Mastzellstabilisator, Cromoglycinsäure, sowie der c-Kit Inhibitor PLX getestet. Beide zeigten ähnlich protektive Effekte wie Ketotifen in hämodynamischen und pulmonalvaskulären Messungen sowie hinsichtlich Mastzellzahlen und IOGs. Dies deutet darauf hin, dass Mastzellen in vielfältigen Formen der PH eine wesentliche pathogenetische Rolle zukommt. Somit könnte die Verhinderung der Rekrutierung, Aktivierung oder Degranulierung

der Mastzellen einen neuen therapeutischen Angriffspunkt in der Behandlung der PH darstellen.

Traditionell hat man Mastzellen in der Vergangenheit stets als wichtige Zellen in allergischen und nicht-allergischen Immunantworten verstanden. Heute gibt es zahlreiche Hinweise, die darauf hindeuten, dass Mastzellen auch in kardiovaskulären Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen. Sie fördern die Proliferation von Endothel- (124) und glatten Muskelzellen (125), die Kennzeichen einer PH darstellen. Auf der Grundlage der Befunde, dass Mastzellgene im Genearray hochreguliert sowie in AO-Rattenlungen akkumuliert sind, postulierten wir, dass den Mastzellen in diesem pathophysiologischen Zusammenhang eine wesentliche funktionelle Rolle zukommen könnte. Dabei ist die Tatsache, dass Mastzellen bei PH im Lungengewebe akkumulieren, nicht neu. Paul Ehrlich, der 1878 erstmals diesen Zelltyp identifizierte und beschrieb, stellte fest, dass Mastzellen u.a. übermäßig bei der „braunen Lungeninduration“, das heißt bei Lungenhämosiderose nach Mitralstenose vorhanden sind (78). Seitdem haben zahlreiche Studien die Akkumulation von Mastzellen in Lungen von Patienten mit PH als Folge von angeborenen Ventrikelseptumsdefekten, Mitralstenose oder idiopathischer PH gezeigt (123). Diese klinischen Befunde konnten auch in experimentellen Tiermodellen der PH reproduziert werden (126;127). Obwohl all diese Studien einheitlich zeigen, dass Mastzellen in der Lunge in pathologischen Situationen akkumuliert sind, wurde dieser Ansatz nie systematisch verfolgt, eine funktionelle Rolle der Mastzellen bei PH in Betracht gezogen, getestet oder zur Anwendung gebracht. Dabei sprechen viele Argumente dafür, dass Mastzellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der PH spielen könnten. Mastzellen setzen biogene Amine wie Serotonin frei, das eine entscheidende Rolle in der pulmonalarteriellen Vasokonstriktion und Proliferation von glatten Muskelzellen spielt (128). Ein weiteres dieser biogenen Amine ist Histamin, welches ein Vasokonstriktor in Pulmonalvenen ist (129). Desweiteren aktivieren Mastzellen das Renin-Angiotensin-System, welches in die Pathogenese der PH impliziert ist (130). Nach Aktivierung setzen Mastzellen Renin und Mastzellchymase frei, die Angiotensinogen zu Angiotensin I spalten (131). Die Mastzellchymase prozessiert außerdem pro-Matrix Metalloprotease 9 (pro-MMP-9) zu aktiviertem MMP-9, welches ein Biomarker für Sklerodermie-assoziierte PH ist (132). Weiterhin setzen

sie Kollagenspaltendes MMP-13 (132) sowie PDGF und TGF- β frei, die beide die Proliferation von glatten Muskelzellen stimulieren (132;133). Mastzellen sezernieren Activin (125), ein Mitglied der TGF- β -Superfamilie. Activin-Serumlevel, welches in PH-Lungen erhöht ist und die Proliferation von glatten Muskelzellen begünstigt. Mastzellen setzen darüber hinaus Interleukin-6 frei, das eine wichtige Rolle in Tiermodellen der PH spielt (134) und in Seren von Patienten mit IPAHA erhöht ist (135). Die Ergebnisse dieser Studien bilden die mechanistische Grundlage für die Hypothese, dass Mastzellen bei PH von funktioneller Relevanz sein könnten. Darüber hinaus zeigen sie zahlreiche Ansatzpunkte für therapeutische Interventionsmöglichkeiten zur Behandlung der PH.

Abgesehen von den genannten Eigenschaften exprimieren Mastzellen große Mengen des Tyrosinkinase-Stammzellfaktor-Rezeptors c-kit auf ihrer Oberfläche. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Reifung, Differenzierung und Aktivierung von Mastzellen (136). Somit könnten Mastzellen auch eine Rolle in der Wirkungsweise der Kinaseinhibitoren für die Behandlung der PH haben. Multikinaseinhibitoren wie Sorafenib und Imatinib sind als VEGFR- und PDGFR-Inhibitoren (137) seit einigen Jahren leistungsfähige neue Behandlungsstrategien bei PH (56;138) und könnten somit ihre protektiven Effekte zumindest zum Teil über die Inhibition der Mastzellreifung und -funktion ausüben (Abbildung 36). Neben VEGFR und PDGFR inhibieren sie auch c-Kit und könnten mit dieser Eigenschaft eine neue Rolle in der Behandlung der PH erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der c-Kit Hemmung auf die Entstehung der PH durch einen spezifischen c-Kit Inhibitor PLX getestet.

In Abbildung 35 sind mögliche Mediatoren und Funktionen von Mastzellen bei der Entstehung der PH schematisch aufgearbeitet und zusammengefaßt.

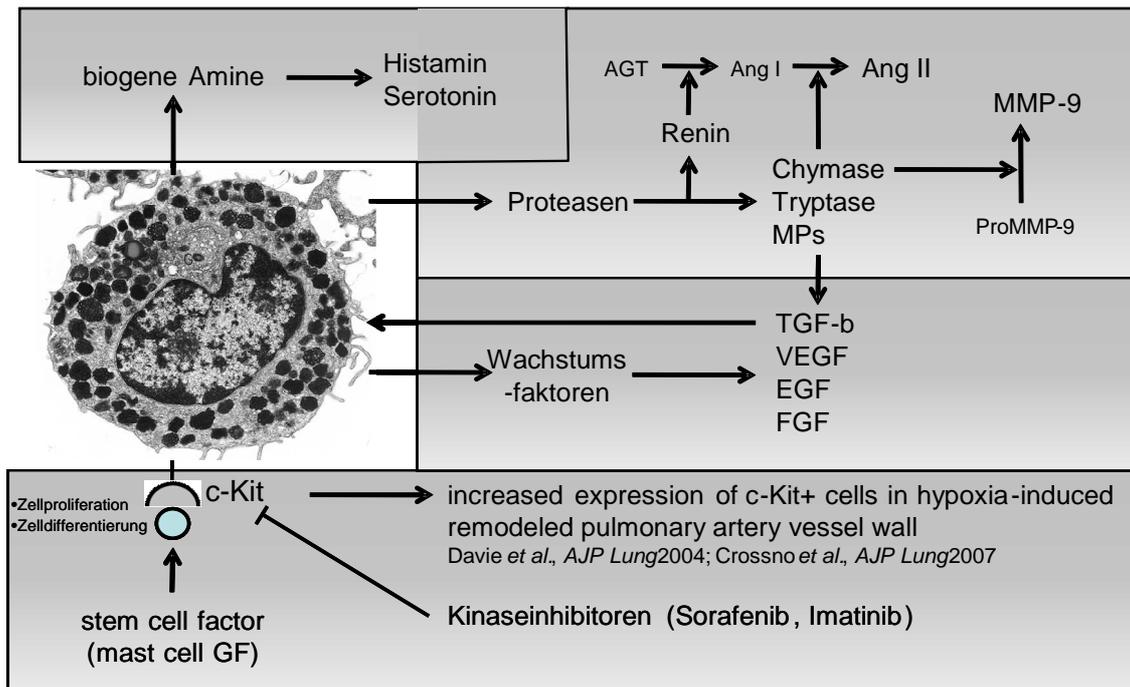


Abbildung 35: Potentiell relevante Mediatoren und Funktionen von Mastzellen im Zusammenhang mit der Pathogenese der PH. Mastzellen sezernieren biogene Amine wie Histamin und Serotonin, Proteasen wie Chymase, Tryptase und Metalloproteasen sowie Renin und Chymase, welche zur Bildung von Angiotensin II führen. Des Weiteren werden Wachstumsfaktoren wie TGF- β (Transforming growth factor beta), VEGF (Vascular endothelial growth factor), EGF (Epidermal growth factor) und FGF (Fibroblast Growth Factor) gebildet. Über einen c-Kit Rezeptor bindet der stem cell factor an die Mastzelle und aktiviert sie. Dies könnte ein potentieller Ansatzpunkt für den Wirkmechanismus der in jüngster Zeit für die Behandlung der PH eingesetzten Kinaseinhibitoren Sorafenib und Imatinib sein.

Insgesamt sprechen die in der vorliegenden Arbeit gesammelten Daten zusammen mit bereits veröffentlichten weiteren Studien für eine funktionale Rolle von Mastzellen im pulmonalvaskulären Remodelling der PH.

Im ersten Ansatz untersuchten wir diese Hypothese indem wir AO-Ratten mit dem Mastzellstabilisator Ketotifen behandelten. Bemerkenswerterweise ist Ketotifen bereits für die orale Asthmatherapie bei Kindern klinisch zugelassen. Die Behandlung der AO-Ratten mit Ketotifen schwächte die Entwicklung einer PH, das pulmonalvaskuläre Remodelling sowie die Rechtsherzhypertrophie über einen Zeitraum von 9 Wochen nach Aortenbanding im Vergleich zu unbehandelten AO-Ratten signifikant ab. Beachtenswert ist dabei, dass Ketotifen oder Cromoglycinsäure nicht nur die Degranulation der Mastzellen verhinderte, sondern im selben Maße auch die Mastzellakkumulation im Lungenparenchym und um die

pulmonalen Blutgefäße herum verringerte. Das legt nahe, dass sich Mastzellaktivierung und Mastzellakkumulation bei der Entstehung einer PH gegenseitig begünstigen. Der Vollständigkeit halber muss erwähnt werden, dass Ketotifen nicht nur ein Mastzellstabilisator, sondern auch ein Histamin H1-Rezeptor Antagonist ist und man bereits zeigen konnte, dass er mögliche zusätzliche unspezifische Effekte haben könnte, die eine reduzierte Phosphodiesterase- und erhöhte Methyltransferaseaktivitäten sowie kalziumantagonistische Eigenschaften einschließen (139;140). Aus diesem Grund und um unsere These der Mastzellbeteiligung an der Pathophysiologie der PH zu unterstreichen, wählten wir einen zweiten Ansatz, der auf einer genetischen Strategie basierte. Wie bereits beschrieben besitzen *Ws/Ws* Ratten zwei mutante Allele im „white spotting“ (*Ws*) Locus, der identisch mit dem *c-Kit* Protoonkogen ist. Ein zu bedenkender Punkt bei der Verwendung der *Ws/Ws*-Ratten besteht darin, dass *c-kit* nicht mastzellspezifisch ist, sondern verschiedene hämatopoietische Zelllinien betrifft. Somit ist es theoretisch möglich, dass z.B. eine Anämie zur reduzierten PH beitragen könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Punkt jedoch vollständig ausgeräumt werden, da kein Unterschied im Hämatokrit zwischen *Ws/Ws*- und den entsprechenden *BN/fMai* Wildtyp-Ratten zum Untersuchungszeitpunkt festzustellen war, während *c-Kit* positive Zellen in histologischen Schnitten der *Ws/Ws*- Rattenlungen komplett fehlten. Die Effekte, die durch Ketotifenbehandlung in *AO*-Ratten erzeugt werden konnten, zeigten sich ebenso bei mastzelldefizienten *AO*-Ratten: PH, pulmonalvaskuläres Remodelling und rechtsventrikuläre Hypertrophie waren in *Ws/Ws* Ratten signifikant abgeschwächt. Die Vorstellung, dass *c-Kit* positive Zellen sich in PH Lungen im Rahmen der Stammzellrekrutierung akkumulieren, wurde bereits mehrfach postuliert; so konnte kürzlich in einem Rindermodell mit Hypoxie-induzierter PH gezeigt werden, dass *c-Kit* positive Zellen vom Knochenmark in die Zirkulation mobilisiert werden und dort um die umgebauten Gefäßwände der Pulmonalarterien akkumuliert werden (141). Es existieren zahlreiche, potentielle Mechanismen, über die Mastzellen bei PH in die Lunge rekrutiert werden. Sie erkennen P-Selektin, was in nahezu allen PH-Modellen hochreguliert ist, als Adhäsionsmolekül (142), lagern sich via *CADM-1* an glatte Muskelzellen an (143)

und ihre Adhäsion und Migration wird durch endotheliale Dysfunktion als Charakteristikum der PH gefördert.

Die Tatsache, dass die Rezeptortyrosinkinase c-Kit eine entscheidende Rolle in der Reifung, Differenzierung und Aktivierung der Mastzellen spielt, kann darüber hinaus eine alternative mechanistische Erklärung für das aufkommende therapeutische Potential von Multikinase- und Tyrosinkinaseinhibitoren bei der Behandlung der PH liefern (56;138). Allerdings ist die Expression und Funktion von c-Kit nicht ausschließlich auf Mastzellen beschränkt, sie trifft auch auf hämatopoetische Vorläuferzellen und Stammzellen, Keimzellen, Melanozyten, Cajalzellen und Neoplasmen zu (144). Somit muss die Mastzelldefizienz nicht die alleinige Erklärung für die Verminderung des vaskulären Remodellings und der PH in *Ws/Ws* Ratten sein. Jedoch ergibt sich aus den übereinstimmenden Ergebnissen aus dem pharmakologischen Ansatz mit den Mastzellstabilisatoren und dem genetischen Modell der mastzelldefizienten Ratte eine synergistische Beweiskette dafür, dass Mastzellen eine funktionelle Rolle im pulmonalvaskulären Remodelling spielen. Da Akkumulation von Mastzellen in der Lunge kein spezifisches Kennzeichen des Linksherzversagens ist, sondern auch in anderen Formen der PH zu beobachten ist, erweiterten wir unsere Studie um ein MCT-Model der nicht-kardiogenen PAH. Entsprechend der Effekte in AO-Ratten, verringerte Ketotifenbehandlung oder Mastzelldefizienz auch das MCT-induzierte pulmonalvaskuläre Remodelling, sowie die damit assoziierten rechtsventrikulären und hämodynamischen Veränderungen. Somit kann postuliert werden, dass Mastzellen auch in der Pathophysiologie der PAH eine entscheidende Rolle spielen. Beachtenswert ist auch, dass gezeigt werden konnte, dass die Inhibition der Mastzelldegranulation durch Cromoglycinsäure die Entwicklung einer hypoxischen PH bei Ratten verringert (145). Im Gegensatz dazu verhinderte Mastzelldefizienz in *W/W^l* Mäusen nicht die Entstehung einer chronisch hypoxischen PH und des vaskulären Remodellings (74). Ähnlich den *Ws/Ws* Ratten haben die *W/W^l* Mäuse zwei mutante Allele im c-Kit-Lokus. Da diese Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Spezies möglicherweise auf eine vergleichsweise geringe Anzahl an Mastzellen in Mäusen zurückzuführen sind (74), stellt sich die Frage, inwiefern sich Daten aus Tiermodellen auf die klinische Situation bei Menschen übertragen lassen. Die Akkumulation von Mastzellen in

Patienten mit PH (123) und die Tatsache, dass von humanen Mastzellen sekretierte humorale Mediatoren die Proliferation von humanen glatten Muskelzellen stimulieren (133), unterstützen die Hypothese, dass Mastzellen auch eine grundlegende Rolle in der Pathophysiologie der PH im Menschen spielen könnten. Nichtsdestotrotz muss diese Theorie in adäquaten klinischen Studien überprüft werden. Zukünftige Studien sowohl in geeigneten *in vivo*- als auch in *in vitro*-Modellen sind des Weiteren unumgänglich, um die Frage zu klären, wie, wann und wo Mastzellen das vaskuläre Remodelling und die Entwicklung der PH vermitteln. Angesichts der Vielzahl an möglichen, oben beschriebenen Signalwegen konnte im Rahmen dieser Studie keine detaillierte Aufgliederung in intra- und interzelluläre Signalwege entsprechend der Rolle der Mastzellen in PH vorgenommen werden. Hervorzuheben ist allerdings, dass die Identifizierung von Mastzellen als wichtige Promotoren des pulmonalvaskulären Remodellings möglicherweise zu einer Reihe neuer therapeutischer Strategien und Interventionsmöglichkeiten für PH führen kann. Diese Interventionsmöglichkeiten reichen von bereits klinisch zugelassenen Mastzellstabilisatoren bis zu Inhibitoren spezifischer Bestandteile der Mastzellgranula. Auch Interventionen, die auf die Mastzellmobilisierung aus dem Knochenmark, der Mastzellvorläuferzellen oder der Mastzelladhäsion und –rekrutierung in die Lunge abzielen, sind denkbar.

5.5 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit identifiziert eine entscheidende Rolle für Mastzellen bei der Entstehung der PH unterschiedlicher Ätiologie. Genetische, molekulare, histologische und funktionelle Untersuchungen zeigen, dass Mastzellen initial an der Entstehung einer PH beteiligt sind. Auf der Grundlage der hier gezeigten präventiven Ansätze durch den Einsatz mastzellstabilisierender Substanzen zur Verhinderung der Entstehung einer PH müssen nun therapeutische Ansätze getestet werden. Hierfür sollten die mastzellstabilisierenden Substanzen erst nach Etablierung einer PH im Rattenmodell verabreicht und ein Therapieerfolg anhand der vorgestellten Parameter am Ende der Modellzeit in Form einer verminderten Progression oder gar einer Umkehrung („reverse Remodelling“) des Krankheitsprozesses evaluiert werden. Auch die zugrundeliegenden molekularen

Mechanismen sind weiterhin unbekannt: Wie werden die Mastzellen aus dem Knochenmark in die Lunge rekrutiert? Welche Interaktionspartner nutzen die Mastzellen in der Lunge? Welcher Signalweg spielt hierbei eine entscheidende Rolle? Welche Produkte der Mastzelle sind bei der Entstehung der PH beteiligt und wie können sie spezifisch gehemmt werden? Wo und wann kann am effektivsten interveniert werden, um die Ausbildung einer PH zu verhindern?

Diese Arbeit bietet eine Basis für die Beantwortung dieser Fragen und trägt somit entscheidend zu einer möglichen neuen Therapieoption für PH, insbesondere für die Klasse 2 der PH infolge von Linksherzerkrankung, bei.

6 REFERENZEN

- (1) Galie N, Torbicki A, Barst R 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):2243-2278.
- (2) Schäfers HJ, Seeger W. Pulmonale Hypertonie. 1 (2001). 2011. Thieme, Stuttgart.
Ref Type: Generic
- (3) Nef HM, Mollmann H, Hamm C, Grimminger F, Ghofrani HA. Pulmonary hypertension: updated classification and management of pulmonary hypertension. *Heart* 2010; 96(7):552-559.
- (4) Humbert M, Sitbon O, Chaouat A et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(9):1023-1030.
- (5) Deng Z, Morse JH, Slager SL et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* 2000; 67(3):737-744.
- (6) Elliott CG. Genetics of pulmonary arterial hypertension: current and future implications. *Semin Respir Crit Care Med* 2005; 26(4):365-371.
- (7) Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(1 Suppl):S32-S42.
- (8) Ulrich S, Szamalek-Hoegel J, Hersberger M et al. Sequence variants in BMPR2 and genes involved in the serotonin and nitric oxide pathways in idiopathic pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: relation to clinical parameters and comparison with left heart disease. *Respiration* 2010; 79(4):279-287.
- (9) Yousem SA. The pulmonary pathologic manifestations of the CREST syndrome. *Hum Pathol* 1990; 21(5):467-474.
- (10) Robalino BD, Moodie DS. Association between primary pulmonary hypertension and portal hypertension: analysis of its pathophysiology and clinical, laboratory and hemodynamic manifestations. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17(2):492-498.
- (11) Auletta M, Oliviero U, Iasiuolo L, Scherillo G, Antoniello S. Pulmonary hypertension associated with liver cirrhosis: an echocardiographic study. *Angiology* 2000; 51(12):1013-1020.

-
- (12) Mehta NJ, Khan IA, Mehta RN, Sepkowitz DA. HIV-Related pulmonary hypertension: analytic review of 131 cases. *Chest* 2000; 118(4):1133-1141.
 - (13) Seoane L, Shellito J, Welsh D, de Boisblanc BP. Pulmonary hypertension associated with HIV infection. *South Med J* 2001; 94(6):635-639.
 - (14) Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD. Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a target of phosphodiesterase-5 inhibition in a 1-year study. *Circulation* 2011; 124(2):164-174.
 - (15) Peacock A. Pulmonary hypertension due to chronic hypoxia. *BMJ* 1990; 300(6727):763.
 - (16) Nozik-Grayck E, Stenmark KR. Role of reactive oxygen species in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular Remodelling. *Adv Exp Med Biol* 2007; 618:101-112.
 - (17) McNeil K, Dunning J. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). *Heart* 2007; 93(9):1152-1158.
 - (18) Mayer E. Surgical and post-operative treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev* 2010; 19(115):64-67.
 - (19) Rivero MA, Marcial MA, Reyes A. Pathology of pulmonary hypertension and schistosomiasis mansoni. *P R Health Sci J* 1993; 12(1):43-45.
 - (20) Nunes H, Humbert M, Capron F et al. Pulmonary hypertension associated with sarcoidosis: mechanisms, haemodynamics and prognosis. *Thorax* 2006; 61(1):68-74.
 - (21) Ito K, Ichiki T, Ohi K et al. Pulmonary capillary hemangiomatosis with severe pulmonary hypertension. *Circ J* 2003; 67(9):793-795.
 - (22) Opitz CF, Blindt R, Blumberg F et al. [Pulmonary hypertension: hemodynamic evaluation: hemodynamic evaluation - recommendations of the Cologne Consensus Conference 2010]. *Dtsch Med Wochenschr* 2010; 135 Suppl 3:S78-S86.
 - (23) Rosenkranz S, Ghofrani HA, Grunig E, Hoeper MM. [Cologne Consensus Conference on pulmonary hypertension 2010. Guidelines for diagnosis and therapy of pulmonary hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* 2010; 135 Suppl 3:S64-S66.
 - (24) Simonneau G, Galie N, Rubin LJ et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S):5S-12S.
 - (25) Olschewski H. [Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131(12):635-638.

-
- (26) Sitbon O, Humbert M, Jais X et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005; 111(23):3105-3111.
- (27) Clapp LH, Finney P, Turcato S, Tran S, Rubin LJ, Tinker A. Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26(2):194-201.
- (28) Gerber JG, Voelkel N, Nies AS, McMurtry IF, Reeves JT. Moderation of hypoxic vasoconstriction by infused arachidonic acid: role of PGI₂. *J Appl Physiol* 1980; 49(1):107-112.
- (29) Yin N, Kaestle S, Yin J et al. Inhaled nitric oxide versus aerosolized iloprost for the treatment of pulmonary hypertension with left heart disease. *Crit Care Med* 2009; 37(3):980-986.
- (30) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(8):2863-2867.
- (31) Channick RN, Simonneau G, Sitbon O et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 358(9288):1119-1123.
- (32) Horn EM, Widlitz AC, Barst RJ. Sitaxsentan, a selective endothelin-A receptor antagonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13(11):1483-1492.
- (33) Rubin LJ, Dufton C, Gerber MJ. Ambrisentan for pulmonary arterial hypertension. *Future Cardiol* 2005; 1(4):425-432.
- (34) Hoepfer MM, Faulenbach C, Golpon H, Winkler J, Welte T, Niedermeyer J. Combination therapy with bosentan and sildenafil in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2004; 24(6):1007-1010.
- (35) Ghofrani HA, Rose F, Schermuly RT et al. Oral sildenafil as long-term adjunct therapy to inhaled iloprost in severe pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42(1):158-164.
- (36) Yin J, Kukucka M, Hoffmann J et al. Sildenafil preserves lung endothelial function and prevents pulmonary vascular Remodelling in a rat model of diastolic heart failure. *Circ Heart Fail* 2011; 4(2):198-206.
- (37) Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004; 351(14):1425-1436.
- (38) Reichenberger F, Pepke-Zaba J, McNeil K, Parameshwar J, Shapiro LM. Atrial septostomy in the treatment of severe pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2003; 58(9):797-800.

-
- (39) Yung G. Lung transplantation and pulmonary hypertension. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2007; 11(2):149-156.
- (40) Oudiz RJ. Pulmonary hypertension associated with left-sided heart disease. *Clin Chest Med* 2007; 28(1):233-41, x.
- (41) Ghio S, Gavazzi A, Campana C et al. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(1):183-188.
- (42) Abramson SV, Burke JF, Kelly JJ, Jr. et al. Pulmonary hypertension predicts mortality and morbidity in patients with dilated cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 1992; 116(11):888-895.
- (43) Cappola TP, Felker GM, Kao WH, Hare JM, Baughman KL, Kasper EK. Pulmonary hypertension and risk of death in cardiomyopathy: patients with myocarditis are at higher risk. *Circulation* 2002; 105(14):1663-1668.
- (44) Di Salvo TG, Mathier M, Semigran MJ, Dec GW. Preserved right ventricular ejection fraction predicts exercise capacity and survival in advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25(5):1143-1153.
- (45) Moraes DL, Colucci WS, Givertz MM. Secondary pulmonary hypertension in chronic heart failure: the role of the endothelium in pathophysiology and management
3. *Circulation* 2000; 102(14):1718-1723.
- (46) Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 1992; 85(2):504-509.
- (47) Lam CS, Roger VL, Rodeheffer RJ, Borlaug BA, Enders FT, Redfield MM. Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53(13):1119-1126.
- (48) WOOD P. An appreciation of mitral stenosis: II. Investigations and results. *Br Med J* 1954; 1(4871):1113-1124.
- (49) Hentschel T, Yin N, Riad A et al. Inhalation of the phosphodiesterase-3 inhibitor milrinone attenuates pulmonary hypertension in a rat model of congestive heart failure. *Anesthesiology* 2007; 106(1):124-131.
- (50) Yoshida J, Yamamoto K, Mano T et al. AT1 receptor blocker added to ACE inhibitor provides benefits at advanced stage of hypertensive diastolic heart failure. *Hypertension* 2004; 43(3):686-691.
- (51) Cruickshank JM. Beta-blockers and heart failure. *Indian Heart J* 2010; 62(2):101-110.

-
- (52) Nappi JM, Sieg A. Aldosterone and aldosterone receptor antagonists in patients with chronic heart failure. *Vasc Health Risk Manag* 2011; 7:353-363.
- (53) Matthys H SW. *Klinische Pneumologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008.
- (54) Kerem A, Yin J, Kaestle SM et al. Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization
2. *Circ Res* 2010; 106(6):1103-1116.
- (55) Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5(10):R80.
- (56) Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005; 115(10):2811-2821.
- (57) Dahal BK, Kosanovic D, Kaulen C et al. Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respir Res* 2011; 12:60.
- (58) Galli SJ, Tsai M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue Remodelling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci* 2008; 49(1):7-19.
- (59) Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(6):478-486.
- (60) Lim KH, Pardanani A, Tefferi A. KIT and mastocytosis
10. *Acta Haematol* 2008; 119(4):194-198.
- (61) Reber L, Da Silva CA, Frossard N. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases
1. *Eur J Pharmacol* 2006; 533(1-3):327-340.
- (62) Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure
2. *Cardiovasc Res* 1998; 39(1):89-105.
- (63) Hentschel T, Yin N, Riad A et al. Inhalation of the phosphodiesterase-3 inhibitor milrinone attenuates pulmonary hypertension in a rat model of congestive heart failure
7. *Anesthesiology* 2007; 106(1):124-131.
- (64) Hoffmann J, Yin J, Kukucka M et al. Mast cells promote lung vascular remodelling in pulmonary hypertension
1. *Eur Respir J* 2011; 37(6):1400-1410.

-
- (65) Yin J, Hoffmann J, Kaestle SM et al. Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4. *Circ Res* 2008; 102(8):966-974.
- (66) Yin J, Kukucka M, Hoffmann J et al. Sildenafil preserves lung endothelial function and prevents pulmonary vascular Remodelling in a rat model of diastolic heart failure. *Circ Heart Fail* 2011; 4(2):198-206.
- (67) Monnet E, Chachques JC. Animal models of heart failure: what is new? *Ann Thorac Surg* 2005; 79(4):1445-1453.
- (68) Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Jr., Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic 8. *JAMA* 2003; 289(2):194-202.
- (69) Kay JM, Harris P, Heath D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds 2. *Thorax* 1967; 22(2):176-179.
- (70) Ryan J, Bloch K, Archer SL. Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH 45. *Int J Clin Pract Suppl* 2011; 65(172):15-34.
- (71) King A, Smith P, Heath D. Ultrastructural differences between pulmonary arteriolar muscularization induced by hypoxia and monocrotaline. *Exp Mol Pathol* 1994; 61(1):24-35.
- (72) Heath D. The rat is a poor animal model for the study of human pulmonary hypertension. *Cardioscience* 1992; 3(1):1-6.
- (73) Niwa Y, Kasugai T, Ohno K et al. Anemia and mast cell depletion in mutant rats that are homozygous at "white spotting (Ws)" locus. *Blood* 1991; 78(8):1936-1941.
- (74) Zhu YJ, Kradin R, Brandstetter RD, Staton G, Moss J, Hales CA. Hypoxic pulmonary hypertension in the mast cell-deficient mouse. *J Appl Physiol* 1983; 54(3):680-686.
- (75) Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch.mikr.Anat.* 13, 263-278. 1877.
Ref Type: Abstract
- (76) Ehrlich P. [The partial function of cells. (Nobel Prize address given on 11 December 1908 at Stockholm)]. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1954; 5(2):67-86.

-
- (77) Ehrlich. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. I. Teil: Die chemische Auffassung der Färbung. II. Teil: Die Anilinfarben in chemischer, technologischer und histologischer Beziehung. 1878.
- (78) Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der granulirten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. Arch.Anat.Physiol 3, 166-169. 1879.
Ref Type: Abstract
- (79) Grabbe J, Welker P, Dippel E, Czarnetzki BM. Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. Arch Dermatol Res 1994; 287(1):78-84.
- (80) Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. Physiol Rev 1997; 77(4):1033-1079.
- (81) Weber S, Ruh B, Kruger-Krasagakes S, Czarnetzki BM. Adhesion molecules on the human mast cell line HMC-1 are upregulated during cell activation. Arch Dermatol Res 1995; 287(7):695-698.
- (82) Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. Annu Rev Immunol 2005; 23:749-786.
- (83) Longley BJ, Tyrrell L, Lu S, Ma Y, Klump V, Murphy GF. Chronically KIT-stimulated clonally-derived human mast cells show heterogeneity in different tissue microenvironments. J Invest Dermatol 1997; 108(5):792-796.
- (84) Padawer J. Mast cells: extended lifespan and lack of granule turnover under normal in vivo conditions. Exp Mol Pathol 1974; 20(2):269-280.
- (85) Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. J Leukoc Biol 1997; 61(3):233-245.
- (86) Andersson CK, Andersson-Sjoland A, Mori M et al. Activated MCTC mast cells infiltrate diseased lung areas in cystic fibrosis and idiopathic pulmonary fibrosis
1. Respir Res 2011; 12:139.
- (87) Weber S, Babina M, Hermann B, Henz BM. Leukosialin (CD43) is proteolytically cleaved from stimulated HMC-1 cells. Immunobiology 1997; 197(1):82-96.
- (88) Nilsson G, Butterfield JH, Nilsson K, Siegbahn A. Stem cell factor is a chemotactic factor for human mast cells. J Immunol 1994; 153(8):3717-3723.
- (89) Hartmann K, Henz BM, Kruger-Krasagakes S et al. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. Blood 1997; 89(8):2863-2870.

-
- (90) Lippert U, Artuc M, Grutzkau A et al. Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. *J Immunol* 1998; 161(5):2600-2608.
- (91) Olsson N, Piek E, ten DP, Nilsson G. Human mast cell migration in response to members of the transforming growth factor-beta family. *J Leukoc Biol* 2000; 67(3):350-356.
- (92) Ishizaka T, Ishizaka K. Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors. *Prog Allergy* 1984; 34:188-235.
- (93) Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; 6(2):135-142.
- (94) Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:931-972.
- (95) Hoth M, Penner R. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells
4. *J Physiol* 1993; 465:359-386.
- (96) Rawlings DJ, Scharenberg AM, Park H et al. Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases
5. *Science* 1996; 271(5250):822-825.
- (97) Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate
1. *Nature* 1983; 306(5938):67-69.
- (98) Dvorak AM, Furitsu T, Ishizaka T. Ultrastructural morphology of human mast cell progenitors in sequential cocultures of cord blood cells and fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 100(3):219-229.
- (99) Maurer M, Wedemeyer J, Metz M et al. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 2004; 432(7016):512-516.
- (100) Boyce JA. The role of mast cells in asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69(2-3):195-205.
- (101) Galli SJ. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990; 62(1):5-33.
- (102) Gurish MF, Austen KF. The diverse roles of mast cells. *J Exp Med* 2001; 194(1):F1-F5.
- (103) Marone G, Triggiani M, Genovese A, De PA. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv Immunol* 2005; 88:97-160.

-
- (104) Metz M, Maurer M. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol* 2007; 28(5):234-241.
- (105) Hart PH. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunol Cell Biol* 2001; 79(2):149-153.
- (106) Caughey GH. New developments in the genetics and activation of mast cell proteases. *Mol Immunol* 2002; 38(16-18):1353-1357.
- (107) Hallgren J, Pejler G. Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator. *FEBS J* 2006; 273(9):1871-1895.
- (108) Castells M. Update on mast cells and mast cell precursors and hypersensitivity responses. *Allergy Asthma Proc* 1997; 18(5):287-292.
- (109) Beaven MA. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur J Immunol* 2009; 39(1):11-25.
- (110) Marquardt DL, Nicolotti RA, Kennerly DA, Sullivan TJ. Lipid metabolism during mediator release from mast cells: studies of the role of arachidonic acid metabolism in the control of phospholipid metabolism. *J Immunol* 1981; 127(3):845-849.
- (111) BAECKELAND E. [Influence of implants of blood and fibrin on the number of mastocytes and the tactism of these cells]. *C R Seances Soc Biol Fil* 1950; 144(13-14):1005-1007.
- (112) KELLER R. Tissue mast cells in anaphylactic shock and anaphylactoid reactions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1957; 11(6):328-341.
- (113) Spicer SS, Warren L. The histochemistry of sialic acid containing mucoproteins. *J Histochem Cytochem* 1960; 8:135-137.
- (114) WEST GB. Function of mast-cells. *J Pharm Pharmacol* 1962; 14:618-619.
- (115) Wershil BK, Castagliuolo I, Pothoulakis C. Direct evidence of mast cell involvement in *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. *Gastroenterology* 1998; 114(5):956-964.
- (116) Furuta GT, Schmidt-Choudhury A, Wang MY et al. Mast cell-dependent tumor necrosis factor alpha production participates in allergic gastric inflammation in mice. *Gastroenterology* 1997; 113(5):1560-1569.
- (117) Bot I, van Berkel TJ, Biessen EA. Mast cells: pivotal players in cardiovascular diseases
3. *Curr Cardiol Rev* 2008; 4(3):170-178.
- (118) Rodella LF, Rezzani R, Buffoli B et al. Role of mast cells in wound healing process after glass-fiber composite implant in rats. *J Cell Mol Med* 2006; 10(4):946-954.

-
- (119) Soucek L, Lawlor ER, Soto D, Shchors K, Swigart LB, Evan GI. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med* 2007; 13(10):1211-1218.
- (120) Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ et al. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines
4. *Nat Med* 2007; 13(6):719-724.
- (121) Sun J, Sukhova GK, Yang M et al. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice
3. *J Clin Invest* 2007; 117(11):3359-3368.
- (122) Levick SP, McLarty JL, Murray DB, Freeman RM, Carver WE, Brower GL. Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart
4. *Hypertension* 2009; 53(6):1041-1047.
- (123) Heath D, Yacoub M. Lung mast cells in plexogenic pulmonary arteriopathy. *J Clin Pathol* 1991; 44(12):1003-1006.
- (124) Marks RM, Roche WR, Czerniecki M, Penny R, Nelson DS. Mast cell granules cause proliferation of human microvascular endothelial cells. *Lab Invest* 1986; 55(3):289-294.
- (125) Cho SH, Yao Z, Wang SW et al. Regulation of activin A expression in mast cells and asthma: its effect on the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Immunol* 2003; 170(8):4045-4052.
- (126) Kay JM, Waymire JC, Grover RF. Lung mast cell hyperplasia and pulmonary histamine-forming capacity in hypoxic rats. *Am J Physiol* 1974; 226(1):178-184.
- (127) Tucker A, McMurtry IF, Alexander AF, Reeves JT, Grover RF. Lung mast cell density and distribution in chronically hypoxic animals. *J Appl Physiol* 1977; 42(2):174-178.
- (128) MacLean MR, Dempsie Y. Serotonin and pulmonary hypertension--from bench to bedside? *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9(3):281-286.
- (129) Porcelli RJ, Ventura DF, Mahoney WA, Bergofsky EH. Role of histamine in regulating pulmonary vascular tone and reactivity. *J Appl Physiol* 1981; 51(5):1320-1325.
- (130) Ferreira AJ, Shenoy V, Yamazato Y et al. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179(11):1048-1054.
- (131) Miyazaki M, Takai S, Jin D, Muramatsu M. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Ther* 2006; 112(3):668-676.

- (132) Maxova H, Novotna J, Vajner L et al. In vitro hypoxia increases production of matrix metalloproteinases and tryptase in isolated rat lung mast cells. *Physiol Res* 2008; 57(6):903-910.
- (133) Okayama Y, Ra C, Saito H. Role of mast cells in airway Remodelling. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(6):687-693.
- (134) Savale L, Tu L, Rideau D et al. Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res* 2009; 10:6.
- (135) Humbert M, Monti G, Brenot F et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(5):1628-1631.
- (136) Gilfillan AM, Rivera J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev* 2009; 228(1):149-169.
- (137) Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1):127-132.
- (138) Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P et al. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial Remodelling. *Circulation* 2008; 118(20):2081-2090.
- (139) Castillo JG, Oehling A, Gamboa PM. Mechanism of ketotifen action in hypersensitivity reactions. Its effect on cellular enzymatic activities. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1991; 1(5):315-323.
- (140) Lowe DA, Richardson BP. Effects of cyproheptadine, ketotifen and sodium nitroprusside on mechanical activity and calcium uptake in guinea pig taenia coli in vitro. *Respiration* 1980; 39 Suppl 1:44-46.
- (141) Davie NJ, Crossno JT, Jr., Frid MG et al. Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial Remodelling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286(4):L668-L678.
- (142) Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N et al. Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 2000; 102(22):2720-2725.
- (143) Hollins F, Kaur D, Yang W et al. Human airway smooth muscle promotes human lung mast cell survival, proliferation, and constitutive activation: cooperative roles for CADM1, stem cell factor, and IL-6. *J Immunol* 2008; 181(4):2772-2780.
- (144) Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13(3):205-220.

- (145) Banasova A, Maxova H, Hampl V et al. Prevention of mast cell degranulation by disodium cromoglycate attenuates the development of hypoxic pulmonary hypertension in rats exposed to chronic hypoxia. *Respiration* 2008; 76(1):102-107.

7 ZUSAMMENFASSUNG

In Analysen der funktionellen Genomik bei pulmonaler Hypertonie (PH) und assoziierter Prozesse des Gefäßremodellings zeigten sich Mastzellen als potentielle Ziele für neue Behandlungsstrategien für PH. Mastzellen spielen bekanntermaßen eine Rolle in der Pathophysiologie von Lungenkrebs und Asthma. Ihre Bedeutung für das Gefäßremodelling und die PH ist jedoch bisher weitgehend unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Mastzellen in experimentellen PH-Modellen infolge einer Linksherzerkrankung und einer pulmonalarteriellen Hypertonie mit Hilfe zweier verschiedener Ansätze untersucht. PH mit Linksherzinsuffizienz wurde bei Ratten durch suprakoronares Banding der Aorta neun Wochen vor Beginn der Untersuchungen induziert. Die funktionelle Bedeutung von Mastzellen wurde bei Ratten, die den Mastzellstabilisator Ketotifen (1 mg/kg KG/Tag oral) verabreicht bekamen und bei mastzelldefizienten *Ws/Ws* Ratten untersucht. Zur Bestätigung der Hypothese, dass Mastzellen eine gleichwertige Bedeutung bei der Entwicklung einer pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) haben, wurden diese Strategien in einem Monocrotalin-induzierten (60 mg/kg KG intraperitoneal) PAH-Modell untersucht.

Genom- und Proteomanalysen bestätigten eine Hochregulierung von Mastzellgenen und -proteinen, einschließlich Mastzellchymase, Mastzelltryptase und Mastzellpeptidase. Histologische Untersuchungen ergaben eine erhöhte Mastzellzahl in AO-Ratten. Bei Ratten, die Ketotifen erhalten hatten und bei mastzelldefizienten *Ws/Ws*-Ratten mit AO wurden PH, Gefäßremodelling und rechtsventrikuläre Hypertrophie gemindert, wie hämodynamische Bestimmungen, Histostereologie, Mastzellfärbung und Echokardiographie zeigten. Ein vergleichbarer protektiver Effekt von Ketotifen bzw. Cromoglycinsäure wurde bei Ratten mit Monocrotalin-induzierter PH beobachtet.

Die erhobenen Daten zeigen eine entscheidende Bedeutung von Mastzellen bei der PH verschiedener Klassen. Demnach stellen Mastzellen bzw. Mastzellmediatoren neue und vielversprechende Behandlungsstrategien bei der PH dar.

8 SUMMARY

Analyses of functional genomics in PH and associated vascular Remodelling processes identified mast cells as potential targets for novel therapeutic strategies. Mast cells have been implicated in the pathophysiology of lung cancer and asthma but their role in vascular Remodelling and PH remains unclear. Here, we tested the role of mast cells in experimental models of PH owing to left heart disease and pulmonary arterial hypertension using two different approaches.

PH with left heart disease was induced in rats by supracoronary aortic banding 9 weeks prior to investigations. A functional role of mast cells was analyzed in rats treated with the mast cell stabilizer ketotifen (1 mg/kg bw/day, orally) and in mast cell deficient Ws/Ws rats. To test the hypothesis that mast cells are equally important in the development of PAH, we tested these strategies in a model of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline (60 mg/kg bw, intraperitoneally).

Genomic as well as proteomic analyses confirmed an upregulation of mast cell genes and proteins including mast cell chymase, tryptase and peptidase 2, and histological analyses demonstrated an elevated number of mast cells in AO rats. In rats treated with ketotifen or in mast cell deficient Ws/Ws rats with AO, pulmonary hypertension, vascular remodelling and right ventricular hypertrophy were attenuated as demonstrated by hemodynamic measurements, histostereology, mast cell staining and echocardiography. A similar protective effect of ketotifen was evident in rats with monocrotaline-induced PH.

The present data identify a critical role of mast cells in PH belonging to different PH classes. Hence, mast cells and/or mast cell mediators present novel promising therapeutic strategies in PH.

9 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

9.1 Originalarbeiten und Reviews

2006:

J. Hoffmann, W.M. Kuebler.

Vascular regulation and remodelling in pulmonary hypertension.

Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie; 2006

2008:

J. Yin, **J. Hoffmann**, S.M. Kaestle, N. Neye, L. Wang, J. Baeurle, W. Liedtke, S. Wu, H. Kuppe, A.R. Pries, W.M. Kuebler.

Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4.

Circ Res. 2008 Apr 25;102(8):966-74.

2010:

A. Kerem, J. Yin, S.M. Kaestle, **J. Hoffmann**, A.M. Schoene, B. Singh, H. Kuppe, M.M. Borst, W.M. Kuebler.

Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization.

Circ Res. 2010 Apr 2;106(6):1103-16.

2011:

J. Hoffmann, J. Yin, M. Kukucka, N. Yin, I. Saarikko, A. Sterner-Kock, H. Fujii, H. Leong-Poi, H. Kuppe, R. T. Schermuly, W. M. Kuebler .

Mast cells promote lung vascular Remodelling in pulmonary hypertension.

Eur Respir J. 2011 Jun;37(6):1400-10.

J. Yin, M. Kukucka, **J. Hoffmann**, A. Sterner-Kock, J. Burhenne, W. E. Haefeli, H. Kuppe, W. M. Kuebler.

Sildenafil preserves lung endothelial function and prevents pulmonary vascular Remodelling in experimental heart failure.

Circ Heart Fail. 2011 Mar 1;4(2):198-206.

B.K. Dahal, D. Kosanovic, C. Kaulen, T. Cornitescu, R. Savai, **J. Hoffmann**, I. Reiss, H. A. Ghofrani, Norbert Weissmann, W. M. Kuebler, W. Seeger, F. Grimminger, R. T. Schermuly.

Role of Mast Cells in Experimental Pulmonary Hypertension.

Respir Res. 2011 May 2;12:60.

L. Wang, J. Yin, A. Tabuchi, E. Barbosa-Sicard, **J. Hoffmann**, B. E. Isakson, C. de Wit, I. Fleming, H. Kuppe, W. M. Kuebler.

Hypoxic pulmonary vasoconstriction in intact mouse lungs: requirement for endothelial signal conduction via connexin 40.

J Clin Invest, in revision

S. Sigel, S. Bunk, T. Meergans, B. Doninger, K. Stich, T. Stulnig, K. Derfler, **J. Hoffmann**, S. Deininger, S. von Aulock, S. Knapp.

Apolipoprotein B is a suppressor of Staphylococcus aureus-induced innate immune responses in humans and mice.

Submitted to JCI.

9.2 Kurzveröffentlichungen und Posterabstracts

1. **J. Hoffmann**, A. Kerem, S. Kaestle, W.M.Kuebler: Actin rearrangement causes lung endothelial dysfunction in congestive heart failure. APS Conference: Physiological Genomics and Proteomics of Lung Disease, Fort Lauderdale, 2006. The Physiologist; 49(6): C2-15, 2006 Jahr:2006.

2. **J. Hoffmann**, J. Yin, S. M. Kaestle, W. M. Kuebler: Lung endothelial TRPV channels are downregulated in heart failure. Experimental Biology, Washington D.C 2007. The FASEB Journal 2007; 21,745.7.

3. J. Yin, **J. Hoffmann**, S. Kaestle, H. Kuppe, W.M. Kuebler: Role of TRPV channels in lung hydrostatic edema. DPG, Hannover, 2007. WO Pflügers Arch - Eur J Physiol Suppl 1: S, 2007.

4. **J. Hoffmann**, S.M. Kaestle, W.M. Kuebler: Effect of pulmonary venous hypertension on gene expression in the lung. Kinin 2007, 2nd International Conference on "Exploring the Future of Vascular and Inflammatory Mediators". International Immunopharmacology, 2007.
5. **J. Hoffmann**, W.M. Kuebler: Differential gene expression in the lung in pulmonary venous hypertension. Jahrestreffen der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vasokäre Biologie, Heidelberg, 2007.
6. **J. Hoffmann**, W.M. Kuebler: Pulmonary venous hypertension causes differential expression of developmental genes in the lung. Experimental Biology, San Diego 2008. FASEB Journal 2008; 22, 1209.13.
7. J. Yin, **J. Hoffmann**, S. M. Kaestle, H. Kuppe, W. M. Kuebler: cGMP regulates mechanosensitive TRPV4 channels in lung endothelial cells. Experimental Biology, San Diego 2008. FASEB Journal 2008; 22:1213.8.
8. **J. Hoffmann**, I. Saarikko, E. Mørtz, W.M. Kuebler: Mast cells contribute to pulmonary hypertension with left heart disease. ECCPS Symposium 2008, Bad Nauheim.
9. J. Yin, **J. Hoffmann**, M. Kukucka, A. Sterner-Kock, H. Kuppe, W. M. Kuebler: Sildenafil prevents secondary pulmonary hypertension in chronic heart failure. ICCVA 2008, Berlin.
10. **J. Hoffmann**, J. Yin, N. Yin, I. Saarikko, Marian Kukucka, Anja Sterner-Kock and W.M. Kuebler: Mast cells play a role in the development of pulmonary hypertension with left heart disease. ATS 2009, San Diego.
11. **J. Hoffmann**, J. Yin, N. Yin, I. Saarikko, Marian Kukucka, Anja Sterner-Kock and W.M. Kuebler: Relevance of mast cells in the development of pulmonary hypertension with left heart disease. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2009; 179:A1852.

12. **J. Hoffmann**, J. Yin, N. Yin, I. Saarikko, M. Kukucka, R.T. Schermuly, W.M. Kuebler: Role of mast cells in the development of pulmonary hypertension with left heart disease. GfMvB2010, Berlin.

13. J. Yin, A. Kerem, S.M. Kaestle, **J. Hoffmann**, W.M. Kuebler. Lung endothelial dysfunction in heart failure: Role of impaired Ca^{2+} signaling and cytoskeletal reorganization. The FASEB Journal 2010; 24:797.4.

14. **J. Hoffmann**, J. Yin, N. Yin, I. Saarikko, M. Kukucka, R.T. Schermuly und W.M. Kübler: Mastzellen tragen entscheidend zum GefäßRemodelling und zur pulmonalen Hypertonie (PH) im Rattenmodell der PH-Klasse I und II bei. Bayer GmbH 2011, Leverkusen.

15. **J. Hoffmann**, J. Yin, N. Yin, R. Samapati, M. Kukucka, R.T. Schermuly, W.M. Kuebler: Therapeutic effect of sildenafil citrate on lung vascular Remodelling and endothelial dysfunction in pulmonary hypertension secondary to heart failure. ATS 2011, Denver.

9.3 Auszeichnungen und Preise

- 1) 1st prize, Best Abstract Price Competition, 11th International Congress of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia (2008)
- 2) Winner: Poster Award; awarded at the Annual Meeting of the German Soc. for Microcirculation and Vascular Biology, Berlin (2010)
- 3) Poster Award; awarded at the 2nd Research Workshop for Pulmonary Hypertension at BayerHealth Care (2011)
- 4) Pfizer research prize at PH UP2DATE at Pfizer GmbH (2011)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass diese Dissertation in der vorliegenden Form möglich wurde.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang M. Kübler danke ich für die Bereitstellung des Themas, die stetige Diskussionsbereitschaft sowie für das Vertrauen in mich und meine Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Axel Pries danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Physiologie.

Bei Herrn Prof. Dr. Blankenstein bedanke ich mich für die Begutachtung meiner Dissertation.

Ein besonderer Dank für praktische Tipps und Tricks geht an Dr. Luis da Silva. Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kübler und des Instituts für Physiologie danke ich für ihre beständige Hilfsbereitschaft und eine angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Katarzyna Fiedorowicz, Stephanie Gembardt, Michael Mertens, Arata Tabuchi, Liming Wang, Jun Yin, Beata Styp-Rekowska, Hannah Nickles, Cornelia Marruhn und Isabelle Bünsch für jede Menge Motivation, wertvolle Diskussionen und insgesamt eine gute Zeit.

Zuletzt möchte ich meiner Familie meinen herzlichsten Dank aussprechen. Ohne ihre beständige, vertrauensvolle und großzügige Unterstützung und ihren festen Glauben an mich wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.