

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

---

Die Rolle der Milztyrosinkinase  
in der pulmonalvaskulären und bronchialen Reagibilität  
und in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Entzündung

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Julia Herbert**  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2016  
Journal-Nr.: 3871

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph. D. (Cornell University)  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Martin Witzenrath  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

lungs, bronchial asthma, Th2 mediated response, hypertension, tyrosine kinase, vasoconstriction, inflammation, therapy, chronic diseases, animal models

Tag der Promotion: 31.08.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-753-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Für meine Eltern*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>4</b>
2.1 Lungenanatomie, pulmonaler Kreislauf und Atemmechanik .....	4
2.2 Pulmonale Hypertonie .....	6
2.2.1 Definition .....	6
2.2.2 Klassifikation .....	6
2.2.3 Epidemiologie der Pulmonalen Hypertonie .....	7
2.2.4 Pulmonalarterielle Hypertonie.....	8
2.2.4.1 Pathogenese .....	9
2.2.4.2 Therapie .....	11
2.2.4.2.1 Calcium-Kanal-Blocker .....	12
2.2.4.2.2 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten .....	12
2.2.4.2.3 Prostazyklin-Analoga.....	13
2.2.4.2.4 Phosphodiesterase-5-Inhibitoren und Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase .....	14
2.2.4.2.5 Weitere Therapieoptionen .....	15
2.3 Asthma bronchiale.....	16
2.3.1 Definition und Phänotypen .....	16
2.3.2 Pathogenese .....	17
2.3.3 Therapie .....	19
2.3.3.1 Glukokortikoide .....	20
2.3.3.2 $\beta$ 2-Agonisten .....	21

2.3.3.3	Leukotrien-Rezeptorantagonisten, Methylxanthine und Anticholinergika .....	22
2.3.3.4	Weitere Therapieoptionen .....	23
2.4	Fazit zur Therapiesituation bei pulmonaler arterieller Hypertonie und Asthma bronchiale.....	24
2.5	Die Milztyrosinkinase.....	26
2.6	Arbeitshypothesen und Ziele des Dissertationsprojektes.....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>31</b>
3.1	Humanes Lungengewebe.....	31
3.2	Versuchstiere .....	31
3.3	Untersuchung der Syk-Expression in humanem und murinem Lungengewebe mittels Immunfluoreszenz-Analyse .....	32
3.4	Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge .....	33
3.4.1	Versuchsaufbau .....	33
3.4.2	Standardisierte Präparation.....	36
3.4.3	Substanzapplikation .....	37
3.4.3.1	Vaso- und bronchokonstriktorische Stimuli.....	37
3.4.3.2	Inhibitoren .....	38
3.4.4	Hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion .....	39
3.4.5	Untersuchung vaso- und bronchodilatatorischer Effekte in präkonstringierten Gefäßen und Bronchien .....	41
3.4.6	Untersuchung potenzieller Mechanismen der Syk-vermittelten Broncho- und Vasokonstriktion .....	41
3.5	Modell der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Entzündung .....	42
3.5.1	Systemische Sensibilisierung, Induzierung der Syk-Deletion und Atemwegsexpositionen.....	42

3.5.2	Nachweis der Syk-Deletion mittels Desoxyribonukleinsäure-Extraktion, Polymerase-Kettenreaktion und anschließender Gel-Elektrophorese .....	43
3.5.3	Nachweis der Syk-Deletion mittels Western Blot-Analyse .....	45
3.5.4	Zellzahlbestimmung und Zelldifferenzierung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	45
3.5.5	Zytokin- und Chemokin-Bestimmung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	46
3.5.6	Quantifizierung der Ovalbumin-spezifischen Plasma-Immunglobuline mittels <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> .....	46
3.5.6.1	Ovalbumin-spezifisches Immunglobulin E .....	46
3.5.6.2	Ovalbumin-spezifisches Immunglobulin G1 .....	47
3.5.7	Stereologische Quantifizierung des T <sub>H</sub> 2-induzierten pulmonalerteriellen <i>Remodeling</i> .....	48
3.5.7.1	Einbettung und Anfertigung der Gewebeschnitte.....	48
3.5.7.2	Färbung von <i>α-smooth muscle actin</i> und stereologische Quantifizierung .....	49
3.6	Statistische Datenanalyse .....	50
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
4.1	Syk-Expressionsprofil in humanem und murinem Lungengewebe .....	51
4.2	Einfluss der Syk-Inhibition auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge.....	53
4.2.1	Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 reduzierte die pulmonalvaskuläre Reagibilität .....	53
4.2.2	Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 reduzierte die Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion.....	56
4.2.3	Die Syk-Inhibition durch R406 reduzierte die pulmonalvaskuläre Reagibilität .....	57
4.2.4	Der BAY 61-3606-induzierte Effekt auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität war Proteinkinase Cα-unabhängig.....	58

4.2.5	Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 induzierte eine Dilatation in präkonstringierten pulmonalen Gefäßen.....	59
4.2.6	Die pulmonalvaskuläre Syk-vermittelte Signaltransduktion.....	61
4.3	Einfluss der Syk-Inhibition auf die Atemwegsreagibilität im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge.....	63
4.3.1	Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 reduzierte die Atemwegsreagibilität.....	63
4.3.2	Der BAY 61-3606-induzierte Effekt auf die Atemwegsreagibilität war Proteinkinase C $\alpha$ -unabhängig .....	65
4.3.3	Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 induzierte eine Dilatation in präkonstringierten Bronchien.....	66
4.3.4	Die bronchiale Syk-vermittelte Signaltransduktion.....	67
4.4	Die Syk-Deletion in der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2- Inflammation .....	69
4.4.1	Nachweis der Syk-Deletion mittels Polymerase-Kettenreaktion und Western Blot-Analyse .....	70
4.4.2	Die Syk-Deletion beeinflusste die Stärke der pulmonalvaskulären Reagibilität in der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Inflammation .....	72
4.4.3	Die Syk-Deletion hatte keinen Einfluss auf die Atemwegsreagibilität in der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Inflammation.....	75
4.4.4	Die Syk-Deletion hatte keinen Einfluss auf die pulmonale Leukozytenrekutierung in der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Inflammation.....	77
4.4.5	Die Syk-Deletion reduzierte die humorale Immunantwort in der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Inflammation.....	80
4.4.6	Die Syk-Deletion erhöhte die Interleukin-5-Expression in der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Inflammation .....	82
4.4.7	Die Syk-Deletion hatte keinen Einfluss auf das pulmonalarterielle <i>Remodeling</i> in der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Inflammation.....	84
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>99</b>



---

<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>128</b>
9.1	Materialien.....	128
9.1.1	Chemikalien, Reagenzien, Puffer und andere Substanzen .....	128
9.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	131
9.1.3	Arbeitsplatz der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge .....	132
9.1.4	Geräte .....	132
9.1.5	Antikörper.....	134
9.1.6	Software .....	134
9.2	Tabellenverzeichnis.....	135
9.3	Abbildungsverzeichnis.....	136
<b>10</b>	<b>FÖRDERUNG</b> .....	<b>139</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b> .....	<b>140</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>141</b>
<b>13</b>	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b> .....	<b>143</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$ -sma	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
<i>A. ad inj.</i>	<i>Aqua ad injectabilia</i>
<i>A. bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
AHR	Atemwegshyperreagibilität
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BIM	<i>Bisindolylmaleimide I, Hydrochloride</i>
BMPR2	<i>Bone morphogenetic protein receptor 2</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCB	Calcium-Kanal-Blocker
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
COX	Cyclooxygenase
Cre	Cre Rekombinase
CTEPH	Chronische thrombembolische pulmonale Hypertonie
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol

---

del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
engl.	Englisch
ERA	Endothelin-Rezeptor-Antagonist
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
et al.	<i>Et alii</i>
ETA	Endothelin-A-Rezeptor
ETB	Endothelin-B-Rezeptor
flox	<i>Flanked by LoxP</i>
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
GTP	Guanosintriphosphat
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IPML	Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
K <sub>i</sub>	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
LABA	<i>Long-acting β2-agonist</i>

---

L-NAME	<i>N<math>\omega</math>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride</i>
<i>loxP</i>	Rekombinationsort der Cre Rekombinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCh	Methacholin
MLC	Myosin-leichte-Kette
MLCK	Myosin-leichte-Kette-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Kette-Phosphatase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MP	Milchpulver
n	Anzahl
<i>n.d.</i>	Nicht detektierbar
<i>n.s.</i>	Nicht signifikant
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OVA	Ovalbumin
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PASMC	<i>Pulmonary arterial smooth muscle cells</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PH	Pulmonale Hypertonie
PKC	Proteinkinase C

---

PLC	Phospholipase C
Ppa	Pulmonalarterieller Druck
Ppa mean	Mittlerer pulmonalarterieller Druck
$\Delta$ Ppa mean	Pulmonalvaskulärer Druckanstieg
Q	Perfusionsfluss
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
Res <sub>aw</sub>	Atemwegswiderstand
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SABA	<i>Short-acting <math>\beta</math>2-agonist</i>
SD	Standardabweichung
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
Syk	Milztyrosinkinase
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzidin
™	<i>Trademark</i>
U/ml	Einheiten pro Milliliter
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp



# 1 EINLEITUNG

Chronische Lungenerkrankungen sind aufgrund ihrer Häufigkeit, dem erkrankungsbedingten Leiden betroffener Patienten sowie durch ihre ökonomische Bedeutung eine Herausforderung für staatliche Gesundheitssysteme, sowohl in Entwicklungsländern als auch in industrialisierten Staaten (Aït-Khaled et al. 2001). Nach epidemiologischen Schätzungen wird die globale Prävalenz chronischer Lungenerkrankungen in den kommenden Jahren deutlich zunehmen (Pfeifer 2013, Pritzkeleit et al. 2010, *World Health Organisation* (WHO) 2007, Murray et al. 1997) und somit die Zahl betroffener Patienten, die zum Teil erhebliche Einschränkungen der Lebensqualität erleiden und frühzeitig versterben (*World Health Organisation* (WHO) 2007). Um den Patienten eine effektive Therapie zu ermöglichen, sind die Optimierung bestehender und die Erforschung innovativer Diagnostik- und Therapieoptionen erforderlich. Dies betrifft besonders chronische Lungenerkrankungen wie Pulmonale Hypertonie (PH) und Asthma bronchiale (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, *World Health Organisation* (WHO) 2014, Galie et al. 2009, Bousquet et al. 2007, Daar et al. 2007).

PH tritt häufig als Folgeerkrankung in Erscheinung und verläuft progressiv, zudem ist die Erkrankung mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (*World Health Organisation* (WHO) 2007) und kann unbehandelt zum Tod führen (Galie et al. 2009, Benisty 2002). PH wird nach der Erkrankungsätiologie in 5 Klassen unterteilt (Simonneau et al. 2013). Die Klasse 1, die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH; Simonneau et al. 2013), wurde bisher am intensivsten erforscht (Galie et al. 2009, Hoepfer et al. 2009). PAH tritt in Verbindung mit einer Grunderkrankung, aufgrund genetischer Veranlagung, Drogen- bzw. Toxin-assoziiert oder idiopathisch auf (Simonneau et al. 2013). Zentrale pathophysiologische Charakteristika der PAH sind die Kontraktion glatter vaskulärer Muskelzellen, pulmonalvaskuläre Umbauprozesse (*Remodeling*) sowie Inflammation (Tuder et al. 2013, Archer et al. 2010). Die Veränderungen der pulmonalen Gefäße führen zu einem erhöhten vaskulären Strömungswiderstand (Kuebler et al. 2002), infolge dessen sich häufig ein letales Rechtsherzversagen entwickelt (Archer et al. 2010, Galie et al. 2009). Die Therapie der PAH ist komplex und setzt sich aus dem Einsatz spezifischer Medikamente, verschiedenen Allgemeinmaßnahmen und unterstützenden pharmakologischen Interventionen zusammen (Galie et al. 2013, Galie et al. 2009). Für die spezifische medikamentöse Therapie der PAH sind derzeit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Prostazyklin-Analoga, Hemmer der Phosphodiesterase-5 sowie Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase (*soluble guanylate cyclase*, sGC) zugelassen (Galie et al. 2013, Ghofrani et al. 2013). Trotz nachgewiesener Effektivität des derzeitigen therapeutischen Managements ist die PAH nicht heilbar (Mandras et al. 2014, Seferian et al. 2013, Galie et al. 2009). Therapieoptionen bei unzureichender Resonanz auf das Behand-

lungsregime und für Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien sind gegenwärtig auf invasive Interventionen bzw. die kombinierte Anwendung zugelassener Medikamente limitiert (Seferian et al. 2013, Hoepfer et al. 2010, Galie et al. 2009). Die Effizienz und Sicherheit der Kombinationstherapie ist jedoch noch nicht ausreichend durch klinische Studien belegt (Galie et al. 2013, Seferian et al. 2013, Galie et al. 2009, Hoepfer et al. 2009).

Von Asthma bronchiale sind weltweit geschätzt 300 Millionen Menschen aller Altersgruppen und ethnischen Hintergründe betroffen (Olin et al. 2014, Masoli et al. 2004). Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine chronische Atemwegsinflammation, Atemwegshyperreagibilität, übermäßige Mukusproduktion, reversible Atemwegsobstruktionen sowie Atemwegs-*Remodeling* (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Murphy et al. 2010). An der Entstehung und Progression von Asthma bronchiale sind genetische Faktoren, Umwelteinflüsse und verschiedene Grunderkrankungen beteiligt (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015). Das therapeutische Management von Asthma bronchiale umfasst zahlreiche Allgemeinmaßnahmen kombiniert mit einer spezifischen medikamentösen Behandlung (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013), bei der inhalativ verabreichte Glukokortikoide sowie  $\beta$ 2-Agonisten die größte Bedeutung haben (Baker et al. 2014, Barnes PJ 2014, Soler et al. 2014). Daneben sind unterstützende pharmakologische Interventionen indiziert (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Das gegenwärtige Behandlungsregime bei Asthma bronchiale trägt für viele Patienten zu einer effizienten Kontrolle der Symptome und Verhinderung von Exazerbationen bei (Baker et al. 2014, Olin et al. 2014). Trotzdem ist die Erkrankung nicht heilbar (Olin et al. 2014, Martinez 2011, Guilbert et al. 2006) und die Anwendung der konventionellen Therapeutika kann mit zum Teil erheblichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) einher gehen (Olin et al. 2014). Zudem leiden 10 - 15 % aller betroffenen Patienten unter einer schweren Form des Asthma bronchiale und sprechen nicht adäquat auf die zugelassenen Standardtherapeutika an (Baker et al. 2014, Olin et al. 2014). Für diese Patienten beschränken sich derzeitige Behandlungsmöglichkeiten auf Dosiserhöhungen und Kombinationen etablierter Wirkstoffe (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Baker et al. 2014, Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Therapeutische Optionen sind zusätzlich limitiert bei Patienten mit Asthma bronchiale, die schwere Exazerbationen erleiden (z. B. *Status asthmaticus*; Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013).

Die intensive Erforschung innovativer therapeutischer Substanzen ist bei PAH und Asthma bronchiale erforderlich (Chung et al. 2014, Olin et al. 2014, Drazen 2012, Archer et al. 2010). Trotz ihrer Unterschiede spielen für beide Erkrankungskomplexe zentrale Mechanismen der Kontraktion glatter Muskelzellen eine entscheidende Rolle (Said et al. 2010), was Grundlage für die Untersuchung eines neuartigen therapeutischen Zielmoleküls sowohl für PAH als auch Asthma bronchiale sein könnte.



Die Milztyrosinkinase (*spleen tyrosine kinase*, Syk) hat sich in Studien verschiedener Arbeitsgruppen in diesem Zusammenhang als vielversprechend erwiesen. Syk spielt eine Rolle in der Migration und Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen (Gao et al. 2011, Lee CK et al. 2007, Lee HM et al. 2007) und wurde in der Endothelin-1-induzierten Kontraktion vaskulärer glatter Muskelzellen als Signalmediator identifiziert (Lee HM et al. 2007). Daneben fungiert Syk als zentraler Signaltransduktor in zahlreichen Immunzellen (Wex et al. 2011, Mocsai et al. 2002, Lach-Trifilieff et al. 2000, Kepley et al. 1998, Crowley et al. 1997, Oliver et al. 1994) und besitzt eine regulatorische Funktion in der Allergen- bzw. Immunglobulin (Ig) E-vermittelten Mastzell-Degranulation (Wex et al. 2011, Costello et al. 1996). Darüber hinaus wurden begünstigende Effekte einer Syk-Inhibition bzw. -Deletion für die akute und chronische Allergen-induzierte  $T_H2$ -Inflammation der Atemwege beschrieben (Moy et al. 2013, Penton et al. 2013, Matsubara et al. 2006, Matsubara et al. 2006). Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen wurden im Rahmen dieser Arbeit potenzielle protektive Effekte der Syk-Inhibition bzw. Syk-Deletion für die Pathogenese und Therapie von PAH und Asthma bronchiale experimentell untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Syk in humanem und murinem Lungengewebe mittels Immunfluoreszenz-Analysen charakterisiert. Anschließend erfolgte die Evaluierung potenzieller dilatativer Effekte einer pharmakologischen Syk-Inhibierung auf die Vaso- und Bronchokonstriktion isoliert perfundierter und ventilierter Mauslungen (IPML). Die dabei erhobenen Daten führten zu der Hypothese, dass Syk in den glatten Muskelzellen der pulmonalen Gefäße und Bronchien als Signaltransduktor für konstringierende Stimuli fungiert. Die Überprüfung dieser Hypothese erfolgte durch die Untersuchung Calcium ( $Ca^{2+}$ )-unabhängiger Signalwege der glatten Muskelzellkontraktion mittels pharmakologischer Inhibitoren relevanter, an der Kontraktion beteiligter Enzyme.

Die potenzielle Rolle von Syk in der Pathogenese von PAH und Asthma bronchiale wurde nach Induktion einer chronischen pulmonalen  $T_H2$ -Inflammation bei Syk-deletierten Mäusen evaluiert. Dabei wurde der Effekt der Syk-Deletion auf die bronchiale und vaskuläre Reagibilität untersucht. Außerdem wurden im Rahmen der Experimente bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF), Blutplasma und Gewebeproben gewonnen, die mittels verschiedener Methoden hinsichtlich Zell-, Immunglobulin- und Zytokingehalt analysiert wurden. Darüber hinaus wurde das pulmonalarterielle *Remodeling* mittels stereologischer Methoden quantifiziert. Durch die Untersuchung der Syk-Deletion in experimentellen Modellen der PAH und des Asthma bronchiale konnten potenzielle therapeutische Effekte von Syk für diese Erkrankungen evaluiert werden.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Lungenanatomie, pulmonaler Kreislauf und Atemmechanik

Für zahlreiche Lebewesen ist die Lunge das zentrale Atmungsorgan zur Bereitstellung von Sauerstoff ( $O_2$ ) für den Gesamtorganismus (Müller W et al. 2009, Fandrey 2004). Das pulmonale Netzwerk aus luftleitenden Wegen, alveolo-kapillären Membranen und Gefäßen (König et al. 2008, Rohen et al. 2005) sowie der ausgeklügelte Mechanismus der Ventilation machen die Nutzung des Luftsauerstoffs für die mitochondriale Zellatmung und damit zur Bereitstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) möglich (Frey et al. 2010, Müller W et al. 2009). Gleichzeitig wird die Abgabe des bei der Zellatmung anfallenden Kohlenstoffdioxids ( $CO_2$ ) ermöglicht (Larsen et al. 2013, Müller W et al. 2009). Die Lunge besitzt demnach eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Lebensfunktion (Frey et al. 2010, Müller W et al. 2009). Beeinträchtigungen der Lungenfunktion führen zu einem Missverhältnis zwischen dem Sauerstoffbedarf und der Sauerstoffversorgung des Organismus (Müller W et al. 2009, Fandrey 2004).

Bei Säugetieren wird der Respirationstrakt in die luftleitenden Atemwege (oberer Respirationstrakt), das Übergangssystem und den unteren Respirationstrakt mit Gasaustauschsystem untergliedert (McGavin et al. 2009, Rohen et al. 2005). Nase, Nasennebenhöhlen, Rachen, Kehlkopf, Trachea und Bronchien gehören zu den luftleitenden Abschnitten (McGavin et al. 2009, König et al. 2008, Rohen et al. 2005). Ausgehend von der *Bifurcatio tracheae* verzweigen sich die Bronchien in immer feinere Äste, die über die Bronchioli, die das Übergangssystem zwischen luftleitenden und gasaustauschenden Abschnitten bilden, schließlich in die von Kapillaren und elastischem Bindegewebe umgebenen Alveolen übergehen (McGavin et al. 2009, König et al. 2008, Schmidt et al. 2007). Hier findet der Gasaustausch mit dem Blut über die alveolo-kapillären Membranen statt (Müller W et al. 2009, Rohen et al. 2005). Diese Membranen werden durch zytoplasmatische Ausläufer von Typ-I-Pneumozyten, welche die Alveolarwände bedecken, und durch zytoplasmatische Ausläufer der kapillären Endothelzellen gebildet (McGavin et al. 2009). Der Gasaustausch erfolgt durch Diffusion, aufgrund der unterschiedlichen Partialdrücke von  $O_2$  bzw.  $CO_2$  in Alveolen und Kapillarblut (Müller W et al. 2009, Schmidt et al. 1995).

Das pulmonale Gefäßnetz ist strukturell darauf ausgerichtet, eine möglichst große Oberfläche für den Gasaustausch bereit zu stellen (Townsend 2012). Zur Erfüllung dieser zentralen Aufgabe besteht der pulmonale Blutkreislauf aus einem Verteilungs-, Austausch- und Sammelssystem, in das die nacheinander geschalteten pulmonalen Arterien, Arteriolen, Kapilla-

ren, Venolen und Venen involviert sind (Larsen et al. 2013, Rohen et al. 2005). Das dem Herzen aus den *Venae cavae* zugeführte Blut gelangt aus dem rechten Herzventrikel über die Pulmonalarterien in die Lunge (König et al. 2008, Rohen et al. 2005). Ähnlich wie der Bronchialbaum verzweigen sich auch die pulmonalen Arterien, und gehen dabei von elastischen in muskularisierte Arterien über, die sich über Arteriolen in weitgehend muskelfreie Präkapillaren verzweigen (Larsen et al. 2013, Rohen et al. 2005). Diese gehen in die alveolären Kapillaren über, welche in den Interalveolarsepten verlaufen und ein enges Netz um die Alveolen bilden (Larsen et al. 2013, Rohen et al. 2005). Über Venolen und Venen erfolgt der Transport des Blutes zurück zum linken Herzen (Larsen et al. 2013, Rohen et al. 2005).

Der Blutdruck im pulmonalen Kreislauf des Menschen ist physiologischerweise niedrig, er beträgt nur ca. ein Siebtel der Werte des systemischen Kreislaufs (Niederdruck-System; Larsen et al. 2013). Die Höhe des pulmonalarteriellen Drucks wird bestimmt durch das Herzminutenvolumen, den Druck im linken Atrium des Herzens sowie durch den pulmonalen Gefäßwiderstand (van Gestel et al. 2014, Larsen et al. 2013). Die bestimmende Größe für den Gefäßwiderstand ist der Gefäßradius, der durch Dilatation bzw. Konstriktion der pulmonalen Gefäße beeinflusst wird (van Gestel et al. 2014, Larsen et al. 2013). Pathologische Veränderungen der pulmonalen Gefäße können eine Reduktion des Gefäßradius bedingen und zu einem erhöhten Gefäßwiderstand führen (Galie et al. 2009).

Die Atemmechanik unterliegt wechselnden Phasen der Inspiration und Expiration (Larsen et al. 2013). Neben den anatomischen Strukturen der Lunge selbst ist für die Atemmechanik wichtig, dass die Oberfläche der Lunge sowie die Thoraxinnenseiten mit Pleura überzogen sind (*Pleura visceralis* und *Pleura parietalis*; Rohen et al. 2005). In dem Spalt zwischen den Pleurae befindet sich ein Flüssigkeitsfilm, durch den die Epithelien von Lunge und Thorax aneinanderhaften (Müller W et al. 2009). Bei Inspiration führt die Kontraktion der Atmungsmuskulatur (Zwerchfell und Zwischenrippenmuskulatur) zu einer aktiven Erweiterung des Brustkorbs (Müller W et al. 2009, Rohen et al. 2005). Die Lunge folgt der Brustkorb- bzw. Zwerchfellbewegung und dehnt sich aus, was zu einer Aufweitung der Alveolen und Vergrößerung der Lumina von Bronchien und Bronchioli führt (Rohen et al. 2005). Durch die Aufdehnung der Lunge während der Inspiration wird ein Unterdruck erzeugt, durch den Umgebungsluft in die Lunge gesogen wird (Gekle et al. 2010, Rohen et al. 2005). Die Weite der Atemwege bestimmt den Widerstand für den Luftstrom (Atemwegswiderstand; Gekle et al. 2010). Pathologische Veränderungen der Atemwege können zu einer Verengung der Lumina und in der Folge zu einem erhöhten Atemwegswiderstand führen (Gekle et al. 2010). Für die optimale Ventilation der Lunge ist zudem das Vorhandensein des oberflächenaktiven *Surfactant* (*Surface active agent*) an der Grenzfläche zwischen Alveolarepithel und Luft es-

sentiell, denn dieser ermöglicht die Aufweitung der Alveolen während der Inspiration und verhindert ihren Kollaps in der Expirationsphase (Frey et al. 2010). Die Expiration ist ein weitgehend passiver Vorgang, der durch die elastischen Rückstellkräfte von Lunge und Thorax erfolgt und mit der Erschlaffung der Atmungsmuskulatur zu einer Verkleinerung des Brustkorbs führt (Gekle et al. 2010, Müller W et al. 2009, Rohen et al. 2005).

## 2.2 Pulmonale Hypertonie

### 2.2.1 Definition

Die Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine multifaktoriell bedingte chronische Lungenerkrankung, die gekennzeichnet ist durch die Konstriktion und Obliterierung pulmonaler Gefäße und daraus folgend einer Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstands und des pulmonalarteriellen Drucks (Maarman et al. 2013). Definitionsgemäß liegt eine PH vor, wenn der invasiv mittels Rechtsherzkatheter gemessene mittlere pulmonalarterielle Druck (Ppa mean) in Ruhe über 25 mmHg liegt (Hoepfer et al. 2010). Der physiologische Ppa mean des Menschen in Ruhe liegt nach Kovacs et al. bei  $14 \pm 3$  mmHg und übersteigt einen Wert von 20 mmHg in der Regel nicht (Kovacs et al. 2009). Für den Wertebereich zwischen 21-24 mmHg existieren bisher keine genauen Definitionen, da epidemiologische Daten fehlen (Galie et al. 2009).

Mit PH einhergehende Symptome sind häufig unspezifisch und beinhalten Dyspnoe bei Belastung, begleitet von Erschöpfung und schneller körperlicher Ermüdung bei Anstrengung, Synkopen, Ödeme und Zunahme des Bauchumfangs (Hoepfer et al. 2010). Die PH-assoziierten pathologischen Veränderungen der pulmonalen Gefäße können progredient zu einer Hypertrophie des rechten Herzventrikels und einer gesteigerten ventrikulären Kontraktibilität führen (Naeije et al. 2014). In fortgeschrittenen Krankheitsstadien kommt es durch die konstant erhöhte Nachlast zu einer Dilatation der rechten Herzkammer, Drehung des Herzens nach links, Trikuspidalklappeninsuffizienz und Erweiterung des rechten Atriums (*Cor pulmonale*; Olsson et al. 2014, Humbert et al. 2004, Schäfers 2001).

### 2.2.2 Klassifikation

Die PH wird je nach Ätiologie gemäß der Nizza-Klassifikation von 2013 in die folgenden 5 Klassen unterteilt (Simonneau et al. 2013): Die 1. Klasse bildet die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH). Dazu gehören die idiopathische, hereditäre, assoziierte (zum Beispiel assoziiert mit einer Humanen Immundefizienz-Virus (HIV)-Infektion, portaler Hypertension oder einem angeborenen Herzfehler) und die Drogen- und Toxininduzierte PAH, ebenso wie die pulmonale veno-okklusive Erkrankung, die pulmonalkapilläre Hämangiomatose und die persistie-

rende pulmonale Hypertonie der Neugeborenen. Mit PH assoziierte Erkrankungen des linken Herzens, hervorgerufen durch systolische oder diastolische Dysfunktionen oder Erkrankungen der Herzklappen, bilden die Klasse 2. Mit PH assoziierte Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie bilden die Klasse 3. Zu diesen PH-assoziierten Lungenerkrankungen gehören neben der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) unter anderem auch das Schlaf-Apnoe-Syndrom und interstitielle Lungenerkrankungen. Die chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) bildet die Klasse 4, PH mit unklarer multifaktorieller Genese die Klasse 5 (beispielsweise PH aufgrund von myeloproliferativen Erkrankungen, Sarkoidose, Neurofibromatose, Schilddrüsen-Erkrankungen, Glykogenspeicherkrankheit, tumorbedingten Obstruktionen und anderen (Simonneau et al. 2013, Ryan et al. 2012)).

### 2.2.3 Epidemiologie der Pulmonalen Hypertonie

Prävalenz-Daten zur PH sind derzeit uneinheitlich. Gründe hierfür sind die Heterogenität der verschiedenen PH-Klassen sowie große Unterschiede in den Kriterien der Datenerhebung, insbesondere der diagnostischen Methoden, Auswahl der Patientengruppen und Festlegung der Untersuchungsparameter (Strange et al. 2012). Das *Center for Disease Control and Prevention* der Vereinigten Staaten von Amerika (USA) berichtete im Zusammenhang mit PH für den Zeitraum von 1980 bis 2002 über steigende Mortalitätsraten bei Frauen und einen gesteigerten Anteil von Hospitalisationen (George et al. 2014, Hyduk et al. 2005). Im Allgemeinen deuten Einträge in verschiedenen nationalen Krankenregistern auf ein vermehrtes Auftreten der Erkrankung bei Frauen hin (McGoon et al. 2013).

Die Datenlage zur Epidemiologie der PAH ist umfangreicher. Auf der Grundlage eines nationalen Krankenregisters aus Frankreich wurde die jährliche Inzidenz der PAH für die Jahre 2002-2003 auf 2,4 neue Fälle pro Million geschätzt und die Prävalenz mit 15,0 Fällen pro Million beziffert (Humbert et al. 2006). Vergleichbare Zahlen ergab die REVEAL-Studie (*Registry to Evaluate Early and Long-term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management*) aus den Jahren 2006-2007 (Frost et al. 2011). Peacock et al. fassten außerdem in einer epidemiologischen Studie Daten aus drei verschiedenen Quellen zusammen und gaben die Prävalenz der PAH mit 15-52 Fällen pro Million an (Peacock et al. 2007).

Die Prognose der PAH ist abhängig von der frühzeitigen Diagnose und Intervention sowie von bestehenden Begleiterkrankungen (Galie et al. 2009). Die Progressionsrate der pulmonalvaskulären Obstruktionen und die Adaptationsfähigkeit des rechten Herzventrikels spielen eine zentrale Rolle für das Überleben der Patienten (Galie et al. 2009).

## 2.2.4 Pulmonalarterielle Hypertonie

Im Fokus dieser Arbeit stand die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH). In Zusammenhang mit der Klassifikation der PH wurde postuliert, dass die verschiedenen PH-Formen hinsichtlich der zugrunde liegenden zellulären und pathophysiologischen Prozesse zahlreiche Gemeinsamkeiten aufweisen (Chester et al. 2014, Galie et al. 2009, Kuebler et al. 2002, Peacock 1999). Eine Ausnahme hiervon bildet die CTEPH, deren Pathogenese klar gekennzeichnet ist durch den Verschluss pulmonaler Arterien durch Thrombemboli, welche durch Fibrosierung und inadäquate endogene Fibrinolyse unlöslich werden (Olsson et al. 2014, Galie et al. 2009, Fedullo et al. 2001). Die Therapie der CTEPH besteht in der chirurgischen Endarteriektomie mit dem Ziel einer Entfernung der verschließenden Thromben (Jenkins et al. 2013, Fedullo et al. 2001). Medikamentös ist Riociguat (ein Stimulator der löslichen Guanylatzyklase) für die Behandlung der CTEPH im Falle von Inoperabilität oder postoperativ weiter bestehender PH zugelassen (Galie et al. 2013).

Die Ursachen für die Entstehung der PAH sind multifaktoriell. PAH kann infolge einer Lungenerkrankung entstehen, beispielsweise aufgrund chronischer entzündlicher oder proliferativer Prozesse, oder als Folge chronischer vasokonstriktorischer Prozesse (Kuebler et al. 2002). Die verschiedenen mit PAH-assoziierten Erkrankungen wurden bereits unter Punkt 2.2.2 (Klassifikation) genannt (Simonneau et al. 2013). Im Wesentlichen tritt PAH assoziiert mit systemischen Erkrankungen auf, daneben gibt es idiopathische PAH-Fälle (Simonneau et al. 2013). PAH besitzt auch eine genetische Komponente (Archer et al. 2010). So weisen 75-80 % der Patienten mit einer hereditären PAH Mutationen in Genen auf, welche hauptsächlich den *bone morphogenetic protein receptor 2* (BMPR2) betreffen (Germain et al. 2013, Soubrier et al. 2013). BMPR2 ist ein Rezeptor für Wachstumsfaktoren, welche Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen in ihrer Proliferation hemmen (Blobe et al. 2000, Wilkins et al. 2000). Zusätzlich prädisponieren Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) für PAH (Pousada et al. 2015, Germain et al. 2013), beispielsweise des *angiotensin-converting enzyme*-Gens, des Serotonin-Transporter-Gens oder des Serotonin-2-B-Rezeptor-Gens (Tuder et al. 2013).

Ein bekannter Risikofaktor für die Entwicklung der PAH ist außerdem die Einnahme von Appetitzüglern oder Dekongestiva (Seferian et al. 2013, Kay JM et al. 1971). Für die mittlerweile vom Markt genommenen Appetitzügler Aminorex bzw. Benfluorex wurde postuliert, dass sie zu einer Erhöhung der Serum-Serotonin-Level führten, indem sie mit dem Serotonin-Transporter interagierten (Seferian et al. 2013, Eddahibi et al. 2002). Für Serotonin wurde neben seiner konstriktorischen Wirkung auf pulmonalvaskuläre glatte Muskelzellen (MacLean et al. 2000) beschrieben, dass es ebenso als Wachstumsfaktor auf diese Zellen

wirken kann (Seferian et al. 2013, Eddahibi et al. 2001, Herve et al. 1995). Diese Effekte sind für die Pathogenese der PAH relevant.

#### 2.2.4.1 Pathogenese

PAH entsteht durch eine Reihe pathologischer Veränderungen der pulmonalen Gefäße, wobei endotheliale Dysfunktionen hauptsächlich für die Progression der Erkrankung verantwortlich sind (Archer et al. 2010, Kuebler et al. 2002, Ben Driss et al. 2000, Higenbottam 1994, Loscalzo 1992). Kennzeichnend für die Dysfunktionen ist ein Ungleichgewicht zwischen endogenen vasodilatativen/antiproliferativen und vasokonstriktorisches/proliferativen Faktoren (Zaiman et al. 2005, Christman et al. 1992, Stewart et al. 1991) sowie eine Zunahme prothrombotischer Faktoren wie *tissue factor* (White et al. 2007). Es wurde hypothesisiert, dass Schädigungen bzw. Verletzungen der pulmonalen Gefäße endotheliale Dysfunktionen initiieren können (Sahara et al. 2007, Partovian et al. 2000, Higenbottam 1994).

Der pulmonale Gefäßtonus wird physiologischerweise durch Endothelin-1, Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin reguliert (Chester et al. 2014). Endotheliale Dysfunktionen bedingen die vermehrte Produktion von Endothelin-1 (Sakai S et al. 1996, Giaid et al. 1993), welches vasokonstriktorisches wirkt und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen stimuliert (Archer et al. 2010). Daneben werden Serotonin, Thromboxan-A<sub>2</sub>, Angiotensin II, Histamin und Wachstumsfaktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF; Sakao et al. 2007) oder *platelet-derived growth factor* (PDGF) übermäßig sezerniert (Humbert et al. 1998), was vasokonstriktorisches und proliferative Prozesse unterstützt (Chester et al. 2014, Lambers et al. 2013, Kuebler et al. 2002, MacLean et al. 2000, Cirillo et al. 1999, Herve et al. 1995, Giaid et al. 1993, Christman et al. 1992). Vasodilatoren, wie das endothelial gebildete NO sowie Prostazyklin, welches über einen zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängigen Signalweg zusätzlich inhibierend auf die Endothelzellproliferation wirkt (Archer et al. 2010), werden dagegen in zu geringem Maße produziert (Tuder et al. 1999, Christman et al. 1992).

Durch die vermehrt zirkulierenden proliferativ wirkenden Stimuli finden in den pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen strukturelle Umbauvorgänge (*Remodeling*) statt (Archer et al. 2010). In beiden Zelltypen sind Proliferation und Hypertrophie gesteigert, wofür bei hereditärer PAH die Mutation des BMPR2 verantwortlich sein kann (Archer et al. 2010). Zusätzlich wird in pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen die Apoptose gehemmt (Archer et al. 2010, Humbert 2010, Wagenvoort 1960). Das vaskuläre *Remodeling* ist in PAH-Lungen histologisch nachweisbar (Stacher et al. 2012). Dabei zeigen sich Intima-Hyperplasie und Media-Hypertrophie, Proliferation und Fibrosierung der Adventitia, plexiforme Läsionen und der Verschluss kleinerer Arterien durch *in situ*-Thromben (Lannan et al. 2014, Stacher et al. 2012, Archer et al. 2010). Die plexiformen Läsionen bestehen aus En-

endothelzellen, die in zahlreichen Schichten das Gefäßlumen ausfüllen und es auf diese Weise obliterieren (Voelkel et al. 1998, Voelkel et al. 1995, Pietra et al. 1989). In diesen Endothelzellen werden Angiogenese-relevante Gene exprimiert, wie beispielsweise das Gen für VEGF (Tuder et al. 2001). Zur Entstehung der plexiformen Läsionen wurde hypothetisiert, dass eine initiale großflächige Apoptose von Endothelzellen zu einer Selektion Apoptose-resistenter Endothel-Vorläuferzellen führt (Sakao et al. 2005, Taraseviciene-Stewart et al. 2001). Diese füllen, möglicherweise unter Einfluss des Angiogenese-unterstützenden *tissue factor*, durch ungeordnete Proliferation das Gefäßlumen aus (Meoli et al. 2009, White et al. 2007). Hassoun et al. postulierten hierzu, dass Wachstumsfaktoren wie PDGF und VEGF neben ihren mitogenen Eigenschaften zusätzlich die Apoptose-Resistenz der Endothel-Vorläuferzellen induzieren (Hassoun et al. 2009).

Eine weitere häufig bei PAH-Patienten auftretende pathologische Veränderung sind *in situ*-Thromben in kleinen pulmonalen Arterien (Lannan et al. 2014, Fuster et al. 1984). Aktuell wird noch diskutiert, ob die Thromben Teil der PAH-Pathogenese oder Folge des pulmonalarteriellen *Remodelings* sind (Lannan et al. 2014). Dem Glykoprotein *tissue factor* wurde neben den bereits oben genannten Eigenschaften auch im Zusammenhang mit Thromben bei PAH eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Es initiiert die Koagulationskaskade (Lannan et al. 2014) und wurde in plexiformen Läsionen humaner PAH-Lungen vermehrt nachgewiesen (White et al. 2007). Daneben wurde eine Hyperkoagulabilität bei PAH-Patienten beschrieben (Tournier et al. 2010).

PAH besitzt auch eine inflammatorische Komponente (Dorfmueller et al. 2003). Histologisch wurden perivaskulär und in plexiformen Läsionen in PAH-Lungen vermehrt Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen sowie T- und B-Zellen nachgewiesen (Tuder et al. 2013, Savai et al. 2012, Archer et al. 2010, Nicolls et al. 2005, Kuebler et al. 2002, Tuder et al. 1994). Die inflammatorische Komponente der PAH wurde auch durch den serologischen Nachweis von Interleukinen (IL) und Chemokinen bei PAH-Patienten gezeigt (Tuder et al. 2013, Archer et al. 2010, Fartoukh et al. 1998, Tuder et al. 1998, Wright L et al. 1998, Humbert et al. 1995). So waren nach Soon et al. insbesondere IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 und IL-10 sowie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  im Serum von Patienten mit PAH erhöht (Soon et al. 2010). Die Level der Zytokine IL-6, IL-8 und IL-10 korrelierten zudem mit dem Überleben der Patienten (Soon et al. 2010). Die Anwesenheit der inflammatorischen Zytokine und Chemokine wird in direkten Zusammenhang mit der Rekrutierung inflammatorischer Zellen und der Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen gebracht (Hassoun et al. 2009). So wurde für das Chemokin *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES) beschrieben, dass es durch Induzierung des *Endothelin-1-converting enzyme* und von Endothelin-1 eine indirekte Rolle in der Pathogenese der PAH spielen könnte (Hassoun et al. 2009). Von Dorfmueller et al. wurde in Lungen von PAH-Patienten eine erhöhte mess-



enger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression von RANTES detektiert (Dorfmueller et al. 2002). Die Autoren zeigten durch *in situ*-Hybridisierung und immunhistochemische Analysen, dass pulmonalarterielle Endothelzellen die Hauptquelle für RANTES in den Lungen dieser Patienten waren (Dorfmueller et al. 2002).

Auch eine allergische Inflammation der Lunge kann PAH-assoziierte Veränderungen begünstigen, da diese sich nicht ausschließlich auf die Atemwege beschränkt, sondern auch strukturelle und inflammatorische Veränderungen der pulmonalen Gefäße induzieren kann (Singh B et al. 2005, Tormanen et al. 2005, Henderson et al. 2002, Saetta et al. 1991). Verschiedene Autoren beschrieben in diesem Zusammenhang eine pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität, die mit einer allergischen pulmonalen Inflammation verknüpft war (Haberberger et al. 2009, Witzenrath et al. 2006, Humbert et al. 2004). Eine pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität zeigte sich beispielsweise in der *in vivo* Studie von Witzenrath et al. nach Verabreichung von Endothelin-1, Serotonin, Angiotensin II sowie dem Thromboxan-Agonisten U46619 bei Mäusen, bei welchen durch repetitive Ovalbumin (OVA)-Sensibilisierungen und OVA-Atemwegsexpositionen eine allergische pulmonale Inflammation induziert worden war (Witzenrath et al. 2006). Die Autoren folgerten, dass eine allergische pulmonale Inflammation in der Pathogenese der PAH eine Rolle spielen könnte (Witzenrath et al. 2006).

Die Gesamtheit der vasokonstriktorisches, proliferativen, prokoagulativen und inflammatorischen Vorgänge im pulmonalen Gefäßnetz verengen bei PAH die vaskulären Lumina, sodass der Strömungswiderstand in den Gefäßen stark zunimmt (Kuebler et al. 2002). Mit Fortschreiten der Erkrankung wirkt sich dies auf den rechten Herzventrikel aus (erhöhte Nachlast, zunächst Ventrikel-Hypertrophie, dann Myokarddilatation), was schließlich zu einem letalen Rechtsherzversagen führt (Archer et al. 2010).

#### **2.2.4.2 Therapie**

Das therapeutische Management der PAH ist komplex und erfordert neben der individuellen Bewertung der Schwere der Erkrankung und der Beurteilung der Vasoreagibilität eine Kombination aus allgemeinen Maßnahmen und dem gezielten Einsatz von Medikamenten (Galie et al. 2009). Eine frühzeitige Diagnoseerhebung trägt in hohem Maße zum Therapieerfolg und zur Verbesserung des Überlebens der Patienten bei (Mandras et al. 2014, Humbert et al. 2012, Gibbs 2007). Allgemeine Maßnahmen beinhalten psychologische Betreuung, Infektionsprophylaxe und moderate körperliche Aktivität (Galie et al. 2013). Zudem gehören die unterstützende Therapie durch orale Antikoagulanzen, Diuretika und gegebenenfalls Antiarrhythmika sowie eine Sauerstofftherapie zum PAH-Management (Galie et al. 2013, Hoeper et al. 2010, Galie et al. 2009). Zu den PAH-spezifischen Pharmakotherapien zählen En-

dothelin-Rezeptor-Antagonisten, Prostazyklin-Analoga, Hemmer der Phosphodiesterase 5 sowie Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase (sGC; Galie et al. 2013). Zudem gibt es Patienten mit idiopathischer PAH, welche von der Behandlung mit traditionellen Vasodilatoren wie Calcium-Kanal-Blockern (*calcium-channel blockers*, CCB) profitieren (Galie et al. 2013).

#### **2.2.4.2.1 Calcium-Kanal-Blocker**

Bei PAH-Patienten kann mittels inhalativ verabreichtem NO oder Prostazyklin die akute Reagibilität pulmonaler Gefäße getestet werden (Sompradeekul et al. 2015, Galie et al. 2013, Preston et al. 2013). Auf diese Weise wird ihre Suszeptibilität gegenüber traditionellen Vasodilatoren wie CCB bestimmt (Milger et al. 2015, Sitbon et al. 2005). CCB können bei positiven Ergebnissen in hohen Dosen eine Option für eine Langzeittherapie sein (Galie et al. 2013). Ein positives Ergebnis liegt nach derzeitiger Definition vor, wenn sich der invasiv mittels Rechtsherzkatheter gemessene mittlere pulmonalarterielle Druck nach inhalativer Verabreichung eines pulmonalen Vasodilators um mehr als 10 mmHg reduziert und zu einem mittleren pulmonalarteriellen Druck von unter 40 mmHg führt (Milger et al. 2015). Nach einer Studie von Sitbon et al. stellt die Langzeittherapie mit CCB für weniger als 10 % der Patienten mit idiopathischer PAH eine Option dar (Sitbon et al. 2005). Die Therapie mit CCB kann zu Hypotension, Synkopen oder Rechtsherzversagen führen (Galie et al. 2009).

#### **2.2.4.2.2 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten**

Das hauptsächlich von Endothelzellen produzierte Endothelin-1 ist der potenteste endogene Vasokonstriktor (Galie et al. 2004, Yanagisawa et al. 1988) und verfügt zudem über mitogene Eigenschaften (Ohlstein et al. 1992). Die Lunge ist primäres Zielorgan der Endothelin-1-Effekte, welche über die Endothelin-A- und Endothelin-B-Rezeptoren (ETA bzw. ETB) vermittelt werden (Chester et al. 2014). ETA wird von glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, ETB ist sowohl auf glatten Gefäßmuskelzellen als auch auf Endothelzellen lokalisiert (Galie et al. 2004, Seo et al. 1994). Die Aktivierung von ETA induziert die Kontraktion und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (Seo et al. 1994, Zamora et al. 1993). Die Bindung von Endothelin-1 an den Gefäßmuskelzell-lokalisierten ETB-Rezeptor führt ebenfalls zur Vasokonstriktion (Seo et al. 1994). Der endotheliale ETB-Rezeptor ist vor allem an der *Clearance* von Endothelin-1 aus dem Blut beteiligt (Dupuis et al. 1996) und induziert über die Freisetzung von Prostazyklin und NO die Vasodilatation (Hirata et al. 1993). Die physiologischen Plasmalevel von Endothelin-1 sind niedrig und liegen im Bereich von 1-2 pg/ml (Galie et al. 2004). Bei PAH-Patienten sind erhöhte Level an zirkulierendem Endothelin-1 nachweisbar,

was auf die vermehrte Expression von Endothelin-1 in Endothelzellen zurückzuführen ist (Giaid et al. 1993, Stewart et al. 1991).

Therapeutisch erfolgt bei PAH-Patienten eine Antagonisierung des Endothelin-Systems durch Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ERA), welche entweder dual den ETA- und ETB-Rezeptor blockieren oder ETA-spezifisch wirken (Galie et al. 2004). Die Spezifität der verfügbaren ERA wird hinsichtlich der Effizienz kontrovers diskutiert und erfordert vergleichende Untersuchungen in klinischen Studien (Chester et al. 2014, Galie et al. 2013, Jasmin et al. 2001). Für die PAH-Behandlung zugelassene duale ERA sind Bosentan und Macitentan, die sich in klinischen Studien hinsichtlich der Verbesserung der physischen Belastungsfähigkeit und klinischer Parameter als effizient erwiesen haben und das Fortschreiten der Erkrankung verzögerten (Galie et al. 2013, Pulido et al. 2013, Rubin et al. 2002, Channick et al. 2001). Vergleichbares gilt für den ETA-spezifischen ERA Ambrisentan (Galie et al. 2013, Galie et al. 2008).

Die Therapie mit Bosentan ist mit einem erhöhten hepatotoxischen Risiko assoziiert (Mano et al. 2007), weshalb die regelmäßige Kontrolle der Leberwerte von Patienten unter Bosentan-Therapie indiziert ist (Galie et al. 2013). Weitere mit Macitentan, Bosentan und Ambrisentan verknüpfte unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) sind Anämie, periphere Ödeme sowie milde kardiale, respiratorische, gastrointestinale und neurologische Beeinträchtigungen (Aversa et al. 2015).

#### **2.2.4.2.3 Prostazyklin-Analoga**

Prostazyklin ist ein Metabolit des Arachidonsäure-Stoffwechsels und wird hauptsächlich von Endothelzellen gebildet (Christman et al. 1992). Es ist ein potenter Vasodilatator, Hemmer der Thrombozytenaggregation und vermittelt antiproliferative Effekte (Galie et al. 2003, Jones et al. 1995). Bei PAH-Patienten sind die Prostazyklin-Produktion sowie die Expression der Prostazyklin-Synthase infolge der endothelialen Dysfunktion reduziert (Christman et al. 1992). Zudem wird das vasokonstriktorisch wirksame Thromboxan-A<sub>2</sub>, welches ebenfalls ein Produkt des endothelialen Arachidonsäure-Metabolismus ist, vermehrt freigesetzt (Christman et al. 1992). Für die PAH-Therapie sind synthetische Prostazyklin-Analoga verfügbar. Besonders Epoprostenol und Iloprost wurden in klinischen Studien als effizient getestet (McLaughlin et al. 2006, Badesch et al. 2000, Krowka et al. 1999, Higenbottam et al. 1998, Barst et al. 1996). Epoprostenol wird ausschließlich intravenös appliziert und besitzt eine kurze Halbwertszeit von 3 bis 5 min (Galie et al. 2013). In klinischen Studien zur Effizienz der intravenösen Epoprostenol-Verabreichung bei Patienten mit idiopathischer und Sklerodermie-assoziiertes PAH zeigten sich positive Effekte auf die physische Belastbarkeit, klinische Parameter und Verbesserung der Symptome (Badesch et al. 2000, Barst et al. 1996, Rubin

et al. 1990). Vergleichbares wurde für das inhalativ verabreichte Iloprost festgestellt. UAW zeigten sich vor allem in Form von Hitzewallungen, Kiefer- und Kopfschmerzen, Diarrhoe und Schmerzen in den Beinen (Galie et al. 2013, Galie et al. 2009).

#### **2.2.4.2.4 Phosphodiesterase-5-Inhibitoren und Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase**

NO ist als potenter Vasodilatator, Inhibitor Zell-proliferativer Prozesse und Inhibitor der Thrombozyten-Aktivierung für die PAH als therapeutisches Ziel äußerst relevant (Gomberg-Maitland et al. 2013). NO wird durch das Enzym NO-Synthase (NOS) bereitgestellt, dessen drei Isoformen (endotheliale (eNOS), induzierbare (iNOS) und neuronale (nNOS) NO-Synthase) in der Lunge exprimiert sind (Gomberg-Maitland et al. 2013, Zhao et al. 2009). Im Tiermodell wurde gezeigt, dass eine eNOS- bzw. iNOS-Defizienz mit einem erhöhten pulmonalen Gefäßtonus assoziiert war (Champion et al. 2002, Fagan et al. 1999). Die Vasodilatation durch NO wird über einen Signalweg vermittelt, der zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) involviert (Moncada et al. 1993). cGMP wird durch Guanylatcyclasen gebildet und durch Phosphodiesterasen (PDE) hydrolysiert und somit abgebaut. In der Lunge dominiert die Expression der PDE-Isoform 5 (Rabe et al. 1994). Inhibitoren der PDE-5 verhindern den Abbau des cGMP und führen in der Folge zur Akkumulation des vasodilatativ wirksamen NO (Maron et al. 2013, Corbin et al. 1999). Sildenafil ist ein PDE-5-Inhibitor, der für die PAH-Therapie zugelassen ist und für den zusätzlich antiproliferative Effekte auf humane pulmonalerterielle glatte Muskelzellen nachgewiesen wurden (Tantini et al. 2005, Wharton et al. 2005). In verschiedenen Studien zur Wirkung von Sildenafil bei PAH-Patienten konnten positive Effekte unter anderem auf die Belastungsfähigkeit, die pulmonale Hämodynamik und die Reduzierung des pulmonalerteriellen Drucks beobachtet werden (Iversen et al. 2010, Singh TP et al. 2006, Galie et al. 2005, Sastry et al. 2004). In einer Studie zur kombinierten Verabreichung von Sildenafil und Epoprostenol wurde nach Hinzufügen von Sildenafil ein positiver Effekt auf die Krankheitsprogression festgestellt (Simonneau et al. 2008). UAW der Behandlung sind Effekte der systemischen Vasodilatation und beinhalten Hitzewallungen, Kopfschmerzen und Epistaxis (Galie et al. 2013, Galie et al. 2009).

Während PDE-Inhibitoren den Abbau des cGMP hemmen, verstärken Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase (sGC) die Produktion von cGMP und tragen auf diese Weise zu einer vermehrten NO-induzierten Vasodilatation bei (Galie et al. 2013). Zudem wurden in präklinischen tierexperimentellen Studien für Stimulatoren der sGC antiproliferative Effekte auf glatte vaskuläre Muskelzellen nachgewiesen (Galie et al. 2013, Hirschberg et al. 2013, Joshi et al. 2011). Ein für die PAH-Therapie zugelassener Vertreter der Stimulatoren der sGC ist Riociguat, welches in randomisierten klinischen Studien zu einer Verbesserung der physischen

Belastbarkeit und klinischer Parameter führte sowie die Krankheitsprogression verlangsamte (Rubin et al. 2015, Galie et al. 2013, Ghofrani et al. 2013).

Die inhalative Verabreichung von NO in Gasform ist weniger praktikabel, da es aufgrund seiner geringen Halbwertszeit kontinuierlich appliziert werden muss (Archer et al. 2010). Außerdem wirken hohe Dosen NO und besonders dessen oxidative Stoffwechselprodukte toxisch (Archer et al. 2010).

#### **2.2.4.2.5 Weitere Therapieoptionen**

Die Forschung nach effektiveren Substanzen zur Verbesserung des therapeutischen PAH-Managements ist notwendig (Archer et al. 2010), da sich gegenwärtige Behandlungsoptionen für Patienten fortgeschrittener Erkrankungsstadien und von Patienten, die unzureichend auf die Therapie ansprechen, auf invasive Eingriffe (z. B. Lungen- bzw. Herz-Lungen-Transplantationen; Seferian et al. 2013, Galie et al. 2009) bzw. die Kombination verschiedener zugelassener Medikamente beschränkt (Galie et al. 2013, Galie et al. 2009). Die Sicherheit und Effizienz der verschiedenen Kombinationen wurde jedoch noch nicht hinreichend durch klinische Studien belegt (Galie et al. 2013, Hoeper et al. 2010, Galie et al. 2009). Potenzielle innovative Zielmoleküle für die PAH-Therapie sind unter anderem NO-unabhängige Aktivatoren von cGMP, inhalativ verabreichte, vasoaktive intestinale Peptide, Serotonin-Rezeptor-Antagonisten und Tyrosinkinase-Inhibitoren (Seferian et al. 2013, Galie et al. 2009).

## 2.3 Asthma bronchiale

### 2.3.1 Definition und Phänotypen

Weltweit sind ca. 300 Millionen Menschen von Asthma bronchiale betroffen, einer schwerwiegenden, alle Altersgruppen umfassenden chronischen Lungenerkrankung, deren Prävalenz in den meisten Ländern stetig zunimmt (Olin et al. 2014, *World Health Organisation* (WHO) 2007, Masoli et al. 2004). Für das Jahr 2025 wird erwartet, dass 400 Millionen Menschen weltweit an Asthma bronchiale erkrankt sein werden (Masoli et al. 2004). In Deutschland sind derzeit ca. 5 % der erwachsenen Bevölkerung und 10 % der Kinder betroffen (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013).

Asthma bronchiale ist eine ursächlich und symptomatisch heterogene Erkrankung, die durch eine chronische Inflammation der Atemwege, Atemwegshyperreagibilität (AHR), wiederkehrende Episoden der Bronchokonstriktion, exzessive Mukusproduktion sowie *Remodeling* der Atemwege charakterisiert ist (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Trevor et al. 2014, Murphy et al. 2010). Durch direkte Stimuli wie Allergenkontakte bzw. indirekte Stimuli wie körperliche Anstrengung oder Wetteränderungen (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Trevor et al. 2014) entstehen anfallsartig auftretende, reversible Obstruktionen der Atemwege (Trevor et al. 2014). Die Symptome sind in ihrer Intensität und Häufigkeit variabel und beinhalten Atemnot, Kurzatmigkeit, thorakales Engegefühl, expiratorischen Stridor und Husten (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Bateman et al. 2008). Asthmaanfälle können sich spontan oder durch gezielten medikamentösen Eingriff lösen. Der Schweregrad der Anfälle ist variabel und reicht von kurzen Episoden geringgradiger Atemwegsobstruktion bis hin zu langanhaltenden Episoden hochgradiger Obstruktion, die lebensbedrohend sein können (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015). Asthmaanfälle können periodisch auftreten, aber auch für längere Zeit aussetzen (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015).

Asthma bronchiale wird je nach Ursache, Schweregrad und klinischen oder pathophysiologischen Faktoren in verschiedene Phänotypen unterteilt (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, de Nijs et al. 2013, Cowan et al. 2010, Moore et al. 2010). Dies hat das Ziel, verbesserte Langzeit-Prognosen zu erstellen und zu eruieren, ob spezifische Therapien auf ausgewählte Phänotypen einen positiven Effekt haben (Chung et al. 2013, Wenzel 2012). Durch molekularbiologische oder genetisch fokussierte Studien bzw. Gruppierung von Patienten in *Clustern* nach Einbeziehung klinischer und pathophysiologischer Parameter (Symptome, Ergebnisse von Lungenfunktionstests, Auslöser von AHR, persönliche Angaben zu Alter, Geschlecht, Beruf usw. (Siroux et al. 2011)) ergeben sich weitere Subgruppen bereits bestehender Phänotypen (Wenzel 2012, Moore et al. 2010). Dies wird aktuell allerdings noch nicht im klinischen Alltag praktiziert, sondern erfolgt im Rahmen von Studien. Außerdem wird der-

zeit die Verknüpfung klinischer Charakteristika mit zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen in Form einer Endotypisierung angestrebt (Lotvall et al. 2011).

Asthma bronchiale kann unterteilt werden in das Allergen-assoziierte bzw. früh-einsetzende (*early-onset, childhood-onset*) und das in der Regel nicht-Allergen-assoziierte, spät-einsetzende (*late-onset, adult-onset*) Asthma bronchiale (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, de Nijs et al. 2013). Auf Basis der zugrunde liegenden zellulären Inflammation kann eine Einteilung von Asthma-Phänotypen in eosinophiles, neutrophiles, paucigranulozytäres oder gemischt-zelliges Asthma bronchiale erfolgen (Cowan et al. 2010, Simpson et al. 2006). Kennzeichnend für das Allergen-assoziierte Asthma bronchiale ist eine eosinophile Atemwegsinflammation. Es tritt häufig bereits im Kindesalter auf (de Nijs et al. 2013). Risikofaktoren sind eine genetische Prädisposition für Allergien (Nahrungsmittel- oder Arzneimittelunverträglichkeiten, familiäres Auftreten von allergischem Ekzem oder allergischer Rhinitis), virale oder bakterielle respiratorische Infektionen, allergische Sensibilisierung sowie Tabakrauch-Exposition (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, de Nijs et al. 2013, Bisgaard et al. 2010). Patienten dieses Phänotyps sprechen in der Regel sehr gut auf die therapeutische Verabreichung inhalativer Glukokortikoide an (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015).

Weniger häufig Allergen-assoziiert ist das spät-einsetzende Asthma bronchiale, welches charakteristischerweise zum ersten Mal im Erwachsenenalter auftritt, wobei Frauen häufiger betroffen scheinen (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, de Nijs et al. 2013). Das zelluläre inflammatorische Profil dieses Phänotyps kann von neutrophilen und/oder eosinophilen Granulozyten bestimmt sein bzw. paucigranulozytär erscheinen (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Herz et al. 1999). Risikofaktoren für das spät-einsetzende Asthma bronchiale sind unter anderem Kontakt mit sensibilisierenden Faktoren in Beruf oder Umwelt, Adipositas, respiratorische Infektionen, Erkrankungen der oberen Atemwege sowie Stress und hormonelle Einflüsse (de Nijs et al. 2013).

### 2.3.2 Pathogenese

Asthma bronchiale ist charakterisiert durch eine chronische Atemwegsinflammation, AHR, Bronchokonstriktion, übermäßige Mukusproduktion und durch bronchiales *Remodeling* (Olivieri et al. 2014, Murphy et al. 2010). Grundlage des Allergen-assoziierten Asthma bronchiale ist eine T-Helferzellen-Typ 2 ( $T_H2$ )-dominierte Immunantwort (McGavin et al. 2009). Es wurde hypothetisiert, dass die Inhalation von Proteasen oder anderen Bestandteilen von Allergenen, Viren oder Kontaminanten der Atemluft die Atemwegsepithelzellen dazu anregen, die Zytokine IL-25, IL-33, *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) sowie *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) zu sezernieren (Erle et al. 2014, Olin et al. 2014, Lambrecht et al. 2012, Locksley 2010). Diese Zytokine aktivieren Mastzellen, basophi-

le Granulozyten und subepitheliale dendritische Zellen, die ihrerseits durch Freisetzung von Zytokinen (insbesondere IL-4, IL-5 und IL-13) eine Inflammation initiieren und aufrechterhalten (Locksley 2010). Dendritische Zellen präsentieren naiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten das inaktivierte Antigen, wodurch sich diese unter Einfluss von IL-4 zu T<sub>H</sub>2-Zellen bzw. unter Einfluss von IL-23 zu T<sub>H</sub>17-Zellen differenzieren (Trevor et al. 2014, Liu YJ 2007). T<sub>H</sub>2-Zellen setzen am Inflammationsherd IL-4, IL-5 und IL-13 frei, welche die Aktivierung und Rekrutierung von eosinophilen und basophilen Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen bewirken, wodurch das initiale Inflammationsgeschehen aufrechterhalten wird (Locksley 2010). Zeitgleich reifen in lokalen Lymphknoten unter Einfluss des von T<sub>H</sub>2-Zellen freigesetzten IL-4 B-Zellen heran, die das allergenspezifische Immunglobulin (Ig) E bilden (Trevor et al. 2014). IgE bindet an den Immunrezeptor FcεR1 auf Mastzellen und basophilen Granulozyten und führt nach Bindung des Allergens und Quervernetzung zur zellulären Degranulation und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Leukotrienen und Prostaglandinen (Trevor et al. 2014). Diese induzieren die Kontraktion bronchialer glatter Muskelzellen, Atemwegsinfammation und Mukus-Hypersekretion (Trevor et al. 2014). Durch IL-5 aktivierte eosinophile Granulozyten setzen Leukotriene und reaktive Sauerstoffspezies frei, was analoge Reaktionen hervorruft (Trevor et al. 2014). Das von T<sub>H</sub>17-Zellen produzierte IL-17 wirkt auf Bronchialepithelzellen, welche *macrophage chemoattractant protein-1*, IL-5, RANTES, GM-CSF, *stem cell factor* und IL-8 freisetzen (Trevor et al. 2014). Dadurch werden Makrophagen rekrutiert, eosinophile und neutrophile Granulozyten aktiviert und das Überleben von Mastzellen gefördert (Trevor et al. 2014). Der erneute Allergen-Kontakt trägt zur Aufrechterhaltung der Inflammation durch wiederholte Aktivierung der beschriebenen Prozesse bei (Locksley 2010). Zudem werden T- und B-Gedächtniszellen gebildet, was zu einem schnellen Aufblühen der Entzündungsreaktionen bei erneutem Allergenkontakt führt (Locksley 2010).

Die zelluläre Inflammation des nicht-Allergen-assoziierten Asthma bronchiale wird sowohl von T<sub>H</sub>1- als auch T<sub>H</sub>2-Zytokinen bestimmt und kann neutrophil, gemischt-zellig eosinophil/neutrophil bzw. paucigranulozytär charakterisiert sein (Trevor et al. 2014, Morishima et al. 2013, van Oosterhout et al. 2005). T<sub>H</sub>1-Zellen induzieren durch die Sekretion von IL-2, Interferon-γ sowie Tumornekrosefaktor α (TNF-α) die Zell-vermittelte Immunantwort, T<sub>H</sub>2-Zellen hingegen die IL-4-, IL-5- und IL-13-vermittelte humorale Immunantwort (van Oosterhout et al. 2005). Bei Asthma bronchiale mit einer hauptsächlich neutrophilen Inflammation wurde für T<sub>H</sub>17-Zellen und deren Zytokin IL-17 eine wichtige Rolle hypothesisiert (Trevor et al. 2014, Morishima et al. 2013, Aujla et al. 2011, Cosmi et al. 2011). So war IL-17 in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit, im Sputum und im Serum von Asthma-Patienten erhöht (Trevor et al. 2014, Agache et al. 2010) und korrelierte mit der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Sputum (Trevor et al. 2014, Bullens et al. 2006). Insbesondere Patienten mit unzureichender Resonanz auf die Therapie mit inhalativ verabreichten Glukokortikoiden wie-



sen erhöhte Spiegel neutrophiler Granulozyten im Sputum auf (Olin et al. 2014, Jatakanon et al. 1999). Verschiedene Studien zeigten, dass IL-17 die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in Atemwegen induziert, indem es beispielsweise ihre Migration zum Inflammationsherd durch Aktivierung von Endothelzellen fördert (Trevor et al. 2014, Roussel et al. 2010). Zudem unterstützt IL-17 die Freisetzung von IL-8 durch bronchiale Epithelzellen (Trevor et al. 2014). IL-8 wurde mit der Atemwegs-Infiltration neutrophiler Granulozyten assoziiert (Trevor et al. 2014, Nakagome et al. 2012, Aujla et al. 2011). Die neutrophilen Granulozyten induzieren in den Atemwegen durch Freisetzung von Proteasen, Matrix-Metalloproteinase 9, Elastase, Leukotrien B4 und *platelet activating factor* eine Inflammationskaskade (Trevor et al. 2014) und scheinen bei der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten eine Rolle zu spielen (Nakagome et al. 2012).

Die chronischen inflammatorischen Prozesse bei Asthma bronchiale führen neben einer Zunahme von Mukus-produzierenden Becherzellen zum *Remodeling* der Bronchialepithel- und Bronchialmuskelzellen (Trevor et al. 2014, Locksley 2010, Warner et al. 2008, Chetta et al. 1997). Hirota et al. nannten als Ursache für das *Remodeling* sich wiederholende Phasen der Schädigung und Reparatur (Hirota et al. 2013). Dabei kommt es zu Verletzungen des Bronchialepithels, Verdickung subepithelialer Schichten, Fibrose, Hyperplasie der bronchialen glatten Muskelzellen, Becherzellhypertrophie und -hyperplasie und Angiogenese (Hung et al. 2014, Olin et al. 2014, James et al. 2012, Fixman et al. 2007, Kranenburg et al. 2006, Jeffery 2001).

### 2.3.3 Therapie

Ziel der therapeutischen Interventionen bei Asthma bronchiale ist es, Symptome zu vermindern und zu kontrollieren, die Lungenfunktion zu optimieren, Exazerbationen zu verhindern sowie körperliche und soziale Beeinträchtigungen im Alltag der Patienten zu vermeiden (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Dabei ist es entscheidend, das Behandlungsregime den individuellen Bedürfnissen des Patienten und dem Phänotyp anzupassen (*Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Therapieoptionen für Asthma bronchiale unterscheiden medikamentöse sowie nicht-medikamentöse Maßnahmen. Zu ersteren gehören Arzneimittel zur Langzeittherapie, welche durch ihre antiinflammatorischen bzw. bronchodilatativen Eigenschaften zu einer reduzierten Symptomatik beitragen, sowie Medikamente, welche ausschließlich eingenommen werden, um der mit Spontan- oder Akutanfällen einhergehenden Bronchokonstriktion entgegen zu wirken (Bedarfsmedikation; *Global Initiative for Asthma* (GINA) 2015, Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013, Bateman et al. 2008).

Zur Langzeittherapie werden üblicherweise inhalativ verabreichte Glukokortikoide eingesetzt, je nach individuellem Ansprechen des Patienten entweder allein oder in Kombination mit inhalativ verabreichten, langwirksamen  $\beta$ 2-Agonisten (*long-acting  $\beta$ 2-agonist*, LABA; Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Weitere mit inhalativen Glukokortikoiden kombinierbare Langzeittherapieoptionen umfassen Leukotrien-Rezeptorantagonisten, Methylxanthine wie Theophyllin, Anti-Immunglobulin E sowie eine Allergen-spezifische Immuntherapie (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013, Bateman et al. 2008). Als Bedarfsmedikation werden rasch wirksame, inhalative  $\beta$ 2-Agonisten eingesetzt (kurzwirksame  $\beta$ 2-Agonisten (*short-acting  $\beta$ 2-agonist*, SABA) sowie der LABA Formoterol; Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Weitere Optionen der Bedarfsmedikation sind unter anderem inhalative Anticholinergika oder Theophyllin (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013).

Nicht-medikamentöse Maßnahmen beinhalten Patientenschulungen, körperliches Training, Atemphysiotherapie, Tabakentwöhnung, Kontrolle des Körpergewichts und psychosoziale Betreuung (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Das therapeutische Management von Asthma bronchiale bei Kindern erfordert ein differenziertes Vorgehen im Vergleich zu Erwachsenen und wird hier nicht thematisiert.

Schwerwiegendes oder Therapie-resistentes Asthma bronchiale tritt bei ca. 5-10 % der betroffenen Patienten auf (Chung et al. 2014, Morishima et al. 2013). Es erfordert die Behandlung mit hohen Dosen inhalativ verabreichter Glukokortikoide in Kombination mit einem weiteren kontrollierenden Medikament und/oder systemisch applizierten Glukokortikoid, um die Erkrankung zu beherrschen (Chung et al. 2014). Mit zunehmender Progression der Erkrankung können irreversible, fixierte Obstruktionen der Atemwege auftreten, welche die Lungenfunktion erheblich beeinträchtigen (Shaw et al. 2007).

### **2.3.3.1 Glukokortikoide**

Inhalativ verabreichte Glukokortikoide sind in der Langzeittherapie des Allergen-induzierten Asthma bronchiale die bewährte Behandlungsstrategie (Barnes PJ 2014, Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Sie vermitteln ihre zellulären Effekte nach Interaktion mit dem zytoplasmatisch lokalisierten Glukokortikoid-Rezeptor, der eine Translokation der Glukokortikoide in den Zellkern ermöglicht. Hier hemmen sie direkt bzw. indirekt die Transkription proinflammatorischer Proteine (Trevor et al. 2014), wodurch es zu einer Verminderung der chronischen Atemwegsinfektion und AHR sowie zur Hemmung der Obstruktion der Atemwege kommt (Trevor et al. 2014). Das Ansprechen des Patienten auf die Therapie, der Schweregrad und der Phänotyp des Asthma bronchiale sowie das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) beeinflussen die Höhe und Häufigkeit der verab-

reichten Glukokortikoid-Dosis und die Notwendigkeit der Applikation weiterer Medikamente (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Systemisch verabreicht lösen Glukokortikoide eine Reihe von UAW aus, die durch den topischen Einsatz zum Großteil reduziert werden können (Barnes PJ 2014). Erwachsene zeigten beispielsweise bei einer täglichen Dosis von weniger als 400 µg Budesonid, einem inhalativen Glukokortikoid, keine wesentlichen UAW (Bateman et al. 2008). Mögliche UAW sind Husten, paradoxer Bronchospasmus sowie eine *Candida*-Infektion der Mund- und Rachenschleimhaut (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Langzeittherapien mit hohen Dosen inhalativer Glukokortikoide führten in verschiedenen Studien unter anderem zu erhöhter Hämatomneigung, Osteoporose und reduzierter adreneraler Aktivität (Lipworth 1999, Brown et al. 1993, Mak et al. 1992). Weitere Studien brachten langzeitverabreichte inhalative Glukokortikoide auch mit der Katarakt- und Glaukom-Entstehung in Zusammenhang (Wang JJ et al. 2009, Garbe et al. 1997).

### 2.3.3.2 $\beta$ 2-Agonisten

$\beta$ 2-Agonisten bewirken über die Aktivierung von adrenergen G-Protein-gekoppelten  $\beta$ 2-Rezeptoren eine Relaxation der glatten Bronchialmuskulatur, was zu einer Bronchodilatation und somit zu einer verbesserten Ventilation führt (Frey et al. 2010). Zusätzlich erhöhen  $\beta$ 2-Agonisten die Leitfähigkeit  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Kaliumkanäle in glatten Muskelzellen des Respirationstraktes, was eine Membranhyperpolarisierung und eine Relaxation der Muskulatur bewirkt (Frey et al. 2010).

Die Effekte von SABA ließen in einer Studie von van Schayck et al. nach ca. 4-6 Stunden nach (van Schayck et al. 1991). Die regelmäßige bedarfsgerechte Anwendung führte zu einer generellen Verbesserung der Symptome (Sestini et al. 2006). Gleiches gilt für LABA wie Formoterol, für das in Studien eine Wirkdauer von  $\geq 12$  Stunden festgestellt wurde (Siekmeier et al. 1994). SABA und der LABA Formoterol sind zur Behandlung von Akutsymptomen vorgesehen (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013) und können als Bedarfsmedikation unterstützend zu einer regelmäßigen Langzeittherapie angewendet werden (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Eine Langzeitmonotherapie mit LABA wie Formoterol wird nicht empfohlen, da sie die zugrunde liegende Atemwegsinfektion nicht vermindern (Bateman et al. 2008). LABA sollten generell in der Langzeitbehandlung nur in Kombination mit inhalativen Glukokortikoiden angewendet werden (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). UAW von inhalativen SABA und LABA sind Skelettmuskeltremor, Unruhe, Tachykardie und Herzpalpitationen (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013).

Der Einsatz anderer Substanzen als inhalativer Glukokortikoide und  $\beta$ 2-Agonisten in der Langzeittherapie des Asthma bronchiale wird nur in begründeten Fällen empfohlen (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013).

### 2.3.3.3 Leukotrien-Rezeptorantagonisten, Methylxanthine und Anticholinergika

Hinsichtlich ihrer positiven Effekte sind Leukotrien-Rezeptorantagonisten, Methylxanthine (z. B. Theophyllin) und Anticholinergika den inhalativen Glukokortikoiden und inhalativen  $\beta$ 2-Agonisten in der Therapie des Asthma bronchiale untergeordnet und können restriktiv unterstützend eingesetzt werden (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013, Bateman et al. 2008).

Für Substanzen, die mit dem Leukotrien-Signalweg interferieren, beispielsweise 5-Lipooxygenase-Inhibitoren bzw. Leukotrien-Rezeptorantagonisten, wurden bei Patienten mit Asthma bronchiale geringe und variable bronchodilatatorische Effekte, eine Verbesserung von Symptomen und der Lungenfunktion sowie eine Reduktion der Atemwegsinfektion und der Neigung zu Exazerbationen beschrieben (Bateman et al. 2008, Barnes NC et al. 2000). Der Einsatz des verfügbaren Leukotrien-Rezeptorantagonisten Montelukast wird restriktiv empfohlen, so zum Beispiel nur in der Langzeittherapie in Kombination mit einem inhalativen Glukokortikoid, aber nicht als Bedarfsmedikation (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). In der Langzeittherapie kann hierdurch die Dosis des inhalativen Glukokortikoids reduziert werden bzw. für Patienten, welche nicht adäquat auf die Therapie mit inhalativen Glukokortikoiden ansprechen, eine bessere Erkrankungskontrolle möglich sein (Bateman et al. 2008). Das systemisch applizierte Montelukast kann zu UAW wie abdominellen Beschwerden und Kopfschmerzen führen (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013).

Methylxanthine wie Theophyllin sind Bronchodilatoren (Bateman et al. 2008), die restriktiv in der Therapie des Asthma bronchiale sowohl als Bedarfsmedikation als auch unterstützend in der Langzeittherapie eingesetzt werden können (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Theophyllin wird systemisch verabreicht und kann bei Serumkonzentrationen  $\geq 25$  mg/l zu Krampfanfällen, gastrointestinalen Blutungen, ventrikulären Arrhythmien, Vorhofftachykardie und Blutdruckabfall führen (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013).

Acetylcholin-bindende muskarinerge Rezeptoren modulieren in der Lunge den Tonus der glatten Bronchialmuskulatur sowie die Mukusproduktion und sind daher ein therapeutisches Ziel der Asthma bronchiale-Therapie (Canning 2006, Gosens et al. 2006, Rogers 2002). In der Lunge sind drei unterschiedliche Typen muskarinergere Rezeptoren exprimiert: M1, M2 und M3 (Barnes PJ 1993). Während die Aktivierung von M1 und M3 eine Konstriktion der Bronchialmuskulatur initiiert, führt die Aktivierung von M2 zur Inhibierung der Acetylcholin-ausschüttung und konsekutiver Hemmung der Bronchokonstriktion (Soler et al. 2014). Muskarinerge Rezeptorantagonisten oder Anticholinergika können in inhalativer Form in der Be-

handlung von Asthma bronchiale eingesetzt werden. Die Tatsache, dass die verschiedenen Typen muskarinergere Rezeptoren der Lunge konkurrierende Effekte vermitteln ist für eine effektive therapeutische Anwendung problematisch (Moulton et al. 2011). Ebenso gibt es keine klinischen Studien zu einer adäquaten Dosierung, was den Einsatz dieser Substanzgruppe limitiert (Moulton et al. 2011). Deshalb werden Anticholinergika nur als alternative Bedarfsmedikation für Patienten eingesetzt, welche starke UAW infolge der Behandlung mit inhalativen  $\beta$ 2-Agonisten entwickeln (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013, Bateman et al. 2008).

#### **2.3.3.4 Weitere Therapieoptionen**

Aktuelle Untersuchungen zu weiteren Therapieoptionen bei Asthma bronchiale basieren auf der gezielten Beeinflussung inflammatorischer Mediatoren (Baker et al. 2014). Dazu gehören Anti-Zytokin-Therapien, bei welchen relevante Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 und IL-22 durch Einsatz von monoklonalen Antikörpern spezifisch ausgeschaltet werden, was zu einer verminderten eosinophilen Inflammation führt und längerfristig auch das *Remodeling* der Atemwege verhindern soll (Baker et al. 2014). In einer klinischen Studie zu SCH55700, einem humanen IL-5-Antikörper, wurde bei Patienten mit schwerwiegendem persistierendem Asthma bronchiale eine dosisabhängige Reduktion im Blut zirkulierender eosinophiler Granulozyten sowie klinisch eine Verbesserung der Lungenfunktion festgestellt (Kips et al. 2003). Vergleichbare Ergebnisse dokumentierten Leckie et al. in einer Studie mit einem monoklonalen IL-5-Antikörper, allerdings konnte kein signifikanter Effekt der Behandlung auf die Histamin-induzierte AHR beobachtet werden (Leckie et al. 2000). In Studien von Nair und Ortega et al. wurden Patienten mit schwerem Asthma bronchiale, welche trotz Behandlung mit hochdosierten inhalativen Glukokortikoiden weiterhin eine starke Eosinophilie in Sputum und Blut aufwiesen, erfolgreich mit dem IL-5-Antikörper Mepolizumab behandelt (Nair 2014, Ortega et al. 2014). In diesen Studien zeigte sich klinisch eine geringere Exazerbationsrate sowie eine verbesserte Lungenfunktion bei den Patienten (Nair 2014, Ortega et al. 2014).

Makrolid-Antibiotika wurden ebenfalls in Zusammenhang mit einer Verbesserung der Symptome von Asthma bronchiale untersucht. Reiter et al. führten eine Meta-Analyse verschiedener klinischer Studien durch und stellten fest, dass eine kurzzeitige Makrolid-Therapie einige Parameter der Lungenfunktion, klinische Symptome sowie die allgemeine Lebensqualität bei Patienten mit Asthma bronchiale verbesserte (Reiter et al. 2013). Brusselle et al. untersuchten den Langzeiteffekt einer Makrolid-Therapie in Kombination mit einer Glukokortikoid-Verabreichung hinsichtlich Parameter der Lungenfunktion. Die Autoren konnten dabei keine Verbesserungen für Patienten mit schwerwiegendem Asthma bronchiale detektieren (Brusselle et al. 2013). Patienten mit nicht-eosinophilem Asthma bronchiale wiesen in dieser

Studie allerdings ein positives Behandlungsergebnis auf, sodass ein Makrolid-Einsatz möglicherweise für diesen Asthma-Phänotyp eine Option darstellen könnte (Brusselle et al. 2013).

## **2.4 Fazit zur Therapiesituation bei pulmonalerterieller Hypertonie und Asthma bronchiale**

Das Therapiemanagement der PAH ist komplex und erfordert die Kombination der spezifischen medikamentösen Behandlung und von allgemeinen Maßnahmen (Galie et al. 2013, Galie et al. 2009). Die Optionen zur Behandlung der PAH wurden durch intensive Forschung in den letzten Jahren erfolgreich erweitert, was nachweislich zu einer verbesserten Überlebensrate von PAH-Patienten führte (Mandras et al. 2014, Seferian et al. 2013, Benza et al. 2012). Trotz der Fortschritte bewirken die zugelassenen Medikamente jedoch keine Heilung oder Umkehrung von Krankheitseffekten (Mandras et al. 2014, Sutendra et al. 2014, Seferian et al. 2013). PAH ist außerdem immer noch mit einer hohen Mortalität verbunden (Mandras et al. 2014, Seferian et al. 2013, Archer et al. 2010). Besonders die Behandlung fortgeschrittener Erkrankungsstadien bietet wenige Optionen, die entweder invasiv (z.B. Lungen- oder Herz-Lungen-Transplantation) oder mit UAW verknüpft sind (Sutendra et al. 2014, Hoeper et al. 2010, Galie et al. 2009). Für Patienten, die nicht adäquat auf eine Monotherapie ansprechen, ist die kombinierte Verabreichung mehrerer zugelassener Medikamente bereits üblich, obwohl die Effizienz und Sicherheit dieses Vorgehens noch nicht ausreichend durch klinische Studien belegt wurde (Galie et al. 2013, Hoeper et al. 2010, Galie et al. 2009). Eine frühzeitige Diagnose ist die Basis für eine effektive Behandlung (Humbert et al. 2012, Gibbs 2007). Aufgrund der unspezifischen Symptomatik bzw. Überlagerung von Symptomen durch die primäre Erkrankung, wird PAH aber häufig erst in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien erkannt (Humbert et al. 2012, Gibbs 2007). Die Optimierung der Diagnostik sowie die Erforschung von innovativen therapeutischen Substanzen könnten zu einer Verbesserung der Therapiesituation beitragen (Mandras et al. 2014, Humbert et al. 2012, Archer et al. 2010). Gegenwärtig für die Therapie von Asthma bronchiale zugelassene Medikamente können nachweislich zu einer Linderung der Krankheitssymptome, Verbesserung der Lungenfunktion und der Belastungsfähigkeit sowie zum Teil zu einer Verminderung der Erkrankungsprogression beitragen (Baker et al. 2014, Barnes PJ 2014, Bateman et al. 2008). Es existiert allerdings kein Heilmittel (Baker et al. 2014, Olin et al. 2014). Von großer Bedeutung ist, dass die verfügbaren Behandlungsoptionen für einen relevanten Anteil der Patienten keine oder nur inadäquate positive Effekte bedingen (Baker et al. 2014, Kim TH 2014, Olin et al. 2014) und mit zum Teil erheblichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen einher gehen können (Olin et al. 2014). Von Soler et al. wurde beschrieben, dass die Hälfte der Asthma bronchiale-

Patienten trotz therapeutischer Interventionen weiterhin wenig Kontrolle über ihre Erkrankung hat (Soler et al. 2014). Nach Trevor et al. leiden 10 % aller Asthma bronchiale-Patienten unter einer Glukokortikoid-resistenten Form des Asthma bronchiale (Trevor et al. 2014) und Olin et al. gaben an, dass 10-15 % der weltweit 300 Millionen Asthma bronchiale-Patienten unter schwerem Asthma bronchiale leiden und aus verschiedensten Gründen nicht auf die übliche Therapie ansprechen (Olin et al. 2014). Schwere Asthma-Exazerbationen stellen eine zusätzliche therapeutische Herausforderung dar. Die schnelle Verabreichung von inhalativen Bronchodilatoren, systemischen Glukokortikoiden und Sauerstoff sind hierbei neben der Überwachung klinisch relevanter Parameter wie der Sauerstoffsättigung, dem Blut-pH-Wert und anderen indiziert (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Jeder schwere oder lebensbedrohliche Asthmaanfall, der sich trotz intensiver medikamentöser Therapie nicht bessert (*Status asthmaticus*), bedarf einer intensivmedizinischen Versorgung und gegebenenfalls einer mechanischen Beatmung (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma 2013). Die Gruppierung des Asthma bronchiale in Phänotypen könnte als Basis für eine individuellere und gezieltere Therapie dienen (Chung et al. 2013, Wenzel 2012). Zusätzlich ist die intensive Erforschung innovativer therapeutischer Substanzen notwendig um zu einer Optimierung der Behandlungsmöglichkeiten beizutragen.

## 2.5 Die Milztyrosinkinase

Für Tyrosinkinasen wird eine Beeinflussung der bronchialen und pulmonalvaskulären Reagibilität sowie eine Rolle in der Entstehung des pulmonalvaskulären und bronchialen *Remodeling* hypothetisiert (Baker et al. 2014, Trevor et al. 2014, Gomberg-Maitland et al. 2013, Archer et al. 2010, Berlin et al. 2005). Darüber hinaus sind Tyrosinkinasen für die Funktion zahlreicher Immunzellen relevant (Lowell 2011, Kepley et al. 1998, Crowley et al. 1997, Costello et al. 1996). Aufgrund dessen sind Vertreter dieser Enzymklasse als potenzielle Zielmoleküle in der PAH- bzw. Asthma bronchiale-Therapie interessant.

Verschiedene Arbeiten präsentierten in diesem Zusammenhang bereits vielversprechende Ergebnisse. Aktuell wird Masitinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor der den *stem cell factor*-Rezeptor (c-kit) sowie den PDGF-Rezeptor hemmt (Humbert et al. 2009), in einer klinischen Studie bei Patienten mit schwerwiegendem, persistierendem Glukokortikoid-abhängigen Asthma bronchiale evaluiert (Baker et al. 2014). Die Inhibition von c-kit führte in Studien von Humbert und Reber et al. zu einer Reduktion der Anzahl und der Aktivität von Mastzellen sowie zu einer Verminderung der Atemwegshyperreagibilität *in vivo* (Humbert et al. 2009, Reber et al. 2006).

Pullamsetti et al. untersuchten die Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib (Inhibitoren der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Src und des PDGF-Rezeptors; Pullamsetti et al. 2012). Die Autoren wiesen in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen nach Applikation der drei genannten Substanzen eine Reduktion der PDGF-induzierten Zellproliferation, Zellzyklus-Genregulation sowie Zell-Migration nach (Pullamsetti et al. 2012). Daneben konnten sie zeigen, dass Dasatinib in der Monocrotalin-induzierten PH von Ratten zu einer Reduktion der Muskularisierung kleiner Pulmonalarterien mit einem Durchmesser von 20-70  $\mu\text{m}$  führte (Pullamsetti et al. 2012). Imatinib und Nilotinib erwiesen sich außerdem in einem chronischen Asthma-Tiermodell als vielversprechend, da sich durch den Einsatz positive Effekte auf die Atemwegshyperreagibilität, Atemwegsinfammation und das Atemwegs-*Remodeling* detektieren ließen (Rhee et al. 2014, Rhee et al. 2011). Von Sakai et al. wurde außerdem beschrieben, dass die Kontraktion bronchialer glatter Muskelzellen von Ratten nach G-Protein-Rezeptor-Aktivierung durch einen Signalweg mediiert wurde, der Tyrosinkinasen involvierte (Sakai H et al. 2013). Interessant ist ebenfalls, dass sich Tyrosinkinase-Inhibitoren bereits in der Krebstherapie als effizient erwiesen haben (Krause et al. 2005). Das pulmonalvaskuläre *Remodeling* bei PAH und besonders die Entstehung plexiiformer Läsionen wurden pathophysiologisch mit Vorgängen verglichen, wie sie auch bei der Entstehung von Neoplasien zu finden sind (Selektion Apoptose-resistenter Endothelzellen, Angiogenese, Produktion von Wachstumsfaktoren wie VEGF; Sutendra et al. 2014, Gomberg-Maitland et al. 2013).



Ein Vertreter der Tyrosinkinase ist die Milztyrosinkinase (*spleen tyrosine kinase*, Syk; Yaghini et al. 2007). Das zytoplasmatisch lokalisierte Syk gehört zusammen mit dem Enzym *zeta-chain-associated protein kinase* (ZAP-70) zu den Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase der Syk-Familie (Kaur et al. 2013, Futterer et al. 1998). Syk ist ein 72 kDa großes Molekül, welches als strukturelle Besonderheit zwei Src-Homologe-2 (SH2)-Domänen aufweist (Kaur et al. 2013, Futterer et al. 1998). Mit diesen kann Syk an das phosphorylierte *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) binden, welches Teil der zytoplasmatischen Region verschiedener Immunrezeptoren (Fc-Rezeptoren) sowie B- und T-Zell-Rezeptoren ist (Kaur et al. 2013, Futterer et al. 1998).

Im Detail wird nach Interaktion des Immunrezeptors mit einem Antigen bzw. Immunglobulin die Proteinkinase Lyn aktiviert, welche ITAM im zytoplasmatischen Kompartiment der Immunzelle phosphoryliert (Kaur et al. 2013). An die phosphorylierten Bereiche von ITAM kann Syk über die SH2-Domänen binden (Futterer et al. 1998). Hierdurch kommt es zu einer aktivierenden Autophosphorylierung von Syk, das in der Folge zahlreiche Adaptor-Proteine aktiviert, was eine Reihe weiterer Enzymaktivierungen nach sich zieht (Kaur et al. 2013). Eine Syk-abhängige Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) kann beispielsweise zur Freisetzung der beiden *second messenger* Inositoltriphosphat (IP $_3$ ) sowie Diacylglycerin (DAG) führen (Kaur et al. 2013). Für Syk wurde außerdem die Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beschrieben (Subramanian et al. 2014, Futosi et al. 2013, Kaur et al. 2013). Syk besitzt demnach eine äußerst wichtige Funktion in der Transduktion extrazellulärer Signale in das Zellinnere (Lowell 2011). Syk reguliert die Signalübertragung in eosinophilen (Lach-Trifilieff et al. 2000), basophilen (Kepley et al. 1998) und neutrophilen Granulozyten (Mocsai et al. 2002), Makrophagen (Crowley et al. 1997), Mastzellen (Oliver et al. 1994), B-Zellen sowie Thrombozyten (Wex et al. 2011, Turner et al. 2000). In den genannten Zellen wird Syk auch selbst exprimiert (Kaur et al. 2013). Daneben findet sich eine Expression von Syk auch in Endothelzellen, Epithelzellen, Hepatozyten, Fibroblasten und Osteoklasten (Kaur et al. 2013, Yaghini et al. 2007, Mocsai et al. 2004).

Syk wird außerdem eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität (Cheng et al. 1995) und in der embryonalen Angiogenese zugeschrieben (Turner et al. 1995), da Mäuse mit hereditärer Syk-Defizienz *in utero* schwere Hämorrhagien entwickeln und nicht lebensfähig sind (Yanagi et al. 2001, Cheng et al. 1995, Turner et al. 1995).

Im Hinblick auf die Pathogenese von PAH und Asthma bronchiale bzw. als potenzielles therapeutisches Zielmolekül für diese Erkrankungen ist Syk äußerst vielversprechend, was verschiedene Studien bereits zeigten. Syk scheint beispielsweise in intrazelluläre Signalkaskaden von vaskulären glatten Muskelzellen involviert zu sein, was für die Pathogenese und Therapie der PAH relevant sein könnte. Lee et al. und Yaghini et al. wiesen einerseits die

Expression von Syk in vaskulären glatten Muskelzellen von Ratten nach (Lee HM et al. 2007, Yaghini et al. 2007) und demonstrierten andererseits, dass Syk nach Stimulation der Muskelzellen mit Angiotensin II aktiviert wurde (Yaghini et al. 2007) bzw. dass die Endothelin-1-induzierte Kontraktion glatter Muskelzellen in Ratten-Aorten über einen Syk-abhängigen Signalweg vermittelt wurde (Lee HM et al. 2007). Weitere Untersuchungen von Lee et al. zeigten, dass Syk in Ratten-Aorten in der PDGF-induzierten Migration und Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen eine zentrale Rolle spielt (Lee CK et al. 2007, Lee HM et al. 2007). Von Gao et al. wurde demonstriert, dass Syk die Proliferation sowie die Phänotyp-Konversion pulmonalarterieller glatter Muskelzellen nach PDGF-Induktion modulierte (Gao et al. 2011). Bei der Phänotyp-Konversion dedifferenzieren vaskuläre glatte Muskelzellen und tragen so zu Zell-Proliferation und vaskulärem *Remodeling* bei (Gao et al. 2011).

Zu potenziellen Effekten einer Syk-Deletion bzw. pharmakologischen Syk-Inhibition auf die pulmonale Vasokonstriktion gibt es derzeit keine publizierten Daten.

Auch die Rolle von Syk in der Vermittlung Allergen- bzw. IgE-induzierter Mastzell-Degranulation wurde bereits untersucht. So demonstrierten Costello et al., dass Signalübertragungen nach Aktivierung des FcεR1-Rezeptors auf Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten Syk-abhängig waren und zeigten außerdem, dass Syk-defiziente Mastzellen nach FcεR1-Quervernetzung nicht mehr in der Lage waren, zu degranulieren, Leukotriene zu synthetisieren und Zytokine zu sekretieren (Costello et al. 1996). Vergleichbare Ergebnisse erzielten auch Wex et al. bei ihren Untersuchungen an Mastzellen, die Mäusen nach Induzierung einer genomischen Syk-Deletion entnommen wurden. Die Autoren analysierten den Ca<sup>2+</sup>-Influx sowie die Histamin-Freisetzung infolge der FcεR1-Aktivierung und zeigten, dass der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel der untersuchten Syk-defizienten Mastzellen nach Antigen-induzierter FcεR1-Quervernetzung nicht anstieg und die Histaminfreisetzung ausblieb (Wex et al. 2011). Zusätzlich demonstrierten sie eine dosisabhängige Hemmung von Ca<sup>2+</sup>-Influx und Histamin-Freisetzung muriner Mastzellen nach pharmakologischer Syk-Inhibition (Wex et al. 2011). Diese Ergebnisse deuten auf eine äußerst wichtige regulatorische Funktion von Syk in der Reaktion auf Allergene hin, was beispielsweise für die Pathogenese des Allergen-assoziierten Asthma bronchiale von großer Relevanz sein könnte.

Für die allergische Rhinitis und die rheumatoide Arthritis wurden in klinischen Studien durch den Einsatz von pharmakologischen Syk-Inhibitoren bereits vielversprechende therapeutische Effekte erzielt (Weinblatt et al. 2010, Masuda et al. 2008, Weinblatt et al. 2008, Meltzer et al. 2005). So zeigten Meltzer et al. in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie mit 319 Freiwilligen, die unter saisonaler allergischer Rhinitis litten, dass die intranasale Verabreichung des Syk-Inhibitors R112 Symptome der allergischen Rhinitis effektiv reduzierte (Meltzer et al. 2005). In klinischen Studien zu Effekten des Syk-Inhibitors R788 bei Patienten

mit aktiver rheumatoider Arthritis konnte ebenfalls eine Verminderung der Symptome unter Syk-Inhibition festgestellt werden (Weinblatt et al. 2010, Weinblatt et al. 2008).

Einige experimentelle Studien haben sich zudem bereits mit dem protektiven Potenzial einer pharmakologischen Syk-Inhibition auf die Allergen-induzierte pulmonale T<sub>H</sub>2-Inflammation der Atemwege befasst. Penton et al. induzierten bei Mäusen durch repetitive OVA-Sensibilisierung und OVA-Atemwegsexpositionen eine chronische pulmonale T<sub>H</sub>2-Inflammation, die mit einer erhöhten epithelialen Syk-Expression in den Atemwegen assoziiert war (Penton et al. 2013). Außerdem demonstrierten die Autoren, dass die Atemwegshyperreagibilität durch die Verabreichung eines Syk-Inhibitors abgeschwächt wurde (Penton et al. 2013). Einen Einfluss der Syk-Inhibition auf die Gesamtzahl inflammatorischer Zellen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) konnten die Autoren bei ihren Untersuchungen nicht feststellen (Penton et al. 2013).

Auch für die akute Allergen-induzierte Atemwegsinfektion wurde von verschiedenen Autoren experimentell ein protektiver Effekt einer Syk-Inhibition bzw. Syk-Deletion demonstriert (Moy et al. 2013, Matsubara et al. 2006, Matsubara et al. 2006). Matsubara et al. setzten Mäuse ohne vorherige systemische Sensibilisierung einer repetitiven OVA-Aerosolexposition aus und untersuchten anschließend die Reagibilität bronchialer glatter Muskelzellen durch Stimulation von Trachealringen der behandelten Mäuse im elektrischen Feld (Matsubara et al. 2006). Die Autoren konnten dabei einen protektiven Effekt einer Syk-Inhibition auf die Stärke der Reagibilität demonstrieren (Matsubara et al. 2006). Untersuchungen von Wex et al. zeigten, dass sowohl eine induzierte Syk-Deletion als auch eine pharmakologische Syk-Inhibition die akute OVA-induzierte Atemwegsinfektion bei Mäusen reduzierte (Wex et al. 2011). Vergleichbares wurde für die Antigen- bzw. IgE-induzierte akute Atemwegsinfektion beschrieben (Wex et al. 2014, Yamamoto et al. 2003, Seow et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen zum therapeutischen Potenzial von Syk bei PAH und Asthma bronchiale fortgeführt.

## 2.6 Arbeitshypothesen und Ziele des Dissertationsprojektes

Zentrale therapeutische Angriffspunkte bei PAH und Asthma bronchiale sind die Konstriktion glatter Muskelzellen, die chronische Inflammation sowie bronchiales und pulmonalvaskuläres *Remodeling*. Mit dem Ziel, zu einer innovativen Therapiestrategie für PAH und Asthma bronchiale beizutragen, wurden basierend auf den Erkenntnissen bislang publizierter Arbeiten folgende Hypothesen aufgestellt:

- (1) Syk ist in pulmonalvaskulären und bronchialen glatten Muskelzellen exprimiert.
- (2) Syk fördert als zentraler Signaltransduktor die pulmonale Vasokonstriktion und die Bronchokonstriktion.
- (3) Syk begünstigt die pulmonale T<sub>H</sub>2-Inflammation und das pulmonalvaskuläre *Remodeling*.

Zur Überprüfung der Hypothese 1 wurde in der vorliegenden Arbeit die Syk-Expression in humanem und murinem Lungengewebe mittels Immunfluoreszenz-Analysen charakterisiert. Die Untersuchung der Hypothese 2 erfolgte *in vivo* durch Analyse des Einflusses der Syk-Inhibition auf die bronchiale und pulmonalvaskuläre Reagibilität in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge. Zur Überprüfung der Hypothese 3 erfolgte die Untersuchung der Effekte einer Syk-Deletion auf die chronische pulmonale T<sub>H</sub>2-Inflammation in Mäusen.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Humanes Lungengewebe

Das humane Lungengewebe wurde von hospitalisierten Patienten gewonnen, bei denen eine Lungenteilresektion durchgeführt werden musste. Die Verwendung des Gewebes wurde durch die Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Von allen Donor-Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor (EA2/079/13). Aus dem Resektionsmaterial wurde tumorfreies Lungengewebe gewonnen und 3 x 8 mm große Gewebestücke ausgestanzt. Diese wurden in Paraffin eingebettet und Schnitte von 4 µm Dicke hergestellt. Die Einbettung und das Schneiden der Gewebestücke wurden freundlicherweise am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

### 3.2 Versuchstiere

Alle tierexperimentellen Arbeiten erfolgten nach Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (G 0303/10; O 0137/11; O 0309/12; O 0424/12; O 0427/12; O 0021/13; O 0039/13; O 0228/13), in enger Zusammenarbeit mit den Tierschutzbeauftragten der Charité - Universitätsmedizin Berlin und unter Beachtung der Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA).

Es wurden weibliche C57BL/6N-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) sowie Proteinkinase Ca (PKCα)-defiziente Mäuse (Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin, Charité - Universitätsmedizin Berlin) und korrespondierende 129 SV Wildtyp-Mäuse (Charles River Laboratories) verwendet. Außerdem wurden induzierbare Milztyrosinkinase (Syk)-Mäuse (Syk<sup>flox/flox</sup>) eingesetzt, die freundlicherweise von Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Biberach, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Die Syk<sup>flox/flox</sup>-Mäuse wurden durch Kreuzung von *Rosa26-CreER<sup>T2</sup>*-Mäusen und Mäusen, die das *loxP*-flankierte Exon 2 des Syk-Gens tragen, erzeugt (Wex et al. 2011, Saijo et al. 2003, Seibler et al. 2003). Der Einsatz des induzierbaren Mausstamms war notwendig, da Mäuse, die eine hereditäre Syk-Defizienz aufweisen, bereits kurz nach der Geburt aufgrund schwerer Hämorrhagien versterben (Wex et al. 2011, Yanagi et al. 2001, Cheng et al. 1995, Turner et al. 1995). Durch die konsekutive Applikation von Tamoxifen, einem selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulator, wird bei dem beschriebenen Mausstamm eine Deletion des Syk-Gens induziert (Syk<sup>del/del</sup>; Wex et al. 2011, Sauer 1998, Feil et al. 1997).

Die Versuchstiere wurden in einer spezifiziert pathogenfreien Tierhaltung in Gruppen von maximal 5 Tieren in individuell ventilierten Käfigen (Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland) gehalten. In der Tierhaltung wurde durch automatische Lichtregulation ein Tag-Nacht-

Rhythmus von jeweils 12 Stunden aufrechterhalten. Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum*.

### 3.3 Untersuchung der Syk-Expression in humanem und murinem Lungengewebe mittels Immunfluoreszenz-Analyse

Von naiven C57BL/6N-Mäusen wurde Lungengewebe gewonnen, in 4 % Formaldehyd-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die Einbettungs- und Schneidearbeiten wurden freundlicherweise durch das Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin durchgeführt. Das humane und murine Lungengewebe wurde wie folgt behandelt:

Zur Entparaffinierung wurde das Gewebe über Nacht in einem 60 °C Trockenschrank erwärmt und am folgenden Tag dreimal je 15 min in 60 °C warmes Roticlear (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getaucht. Darauf folgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe mit Ethanol. Es schloss sich die Antigendemaskierung (engl. *Antigen-Retrieval*) mit dem Demaskierungs-Puffer Natrium-Citrat an. Für den Natrium-Citrat-Puffer wurden 2,94 g Natrium-Citrat-Dihydrat (Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml *Aqua bidestillata* (*A. bidest.*) gelöst. Die Gewebeschnitte wurden in einer Küvette mit dem Puffer in einem Dampfgerät (Multi Gourmet, Braun GmbH, Kronberg/Taunus, Deutschland) für 30 min auf ca. 90 °C erhitzt. Nach der Abkühlung wurde das Gewebe mit 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in 0,01 mol/l phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, hergestellt aus 42 g Natriumchlorid (NaCl), 0,9 g Natriumdihydrogenphosphat und 7,75 g di-Natriumhydrogenphosphat (alles Carl Roth)), gelöst in 5 l *A. bidest.*; pH-Wert 7,6) permeabilisiert. Es folgte die Blockade unspezifischer Antigene mit 5 % Ziegen-Serum. Das Serum wurde in einem Verdünnungsmedium, bestehend aus 0,2 g bovinem Serumalbumin (BSA, *Bovine Serum Albumin Fraction V*, pH 7,0, Sigma-Aldrich), 20 ml 0,01 mol/l PBS und 0,01 g Tween® 20 (Sigma-Aldrich), verdünnt. Es folgte die Inkubation des Gewebes mit dem Primärantikörper Syk N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), der in der Konzentration 1:200 (in Verdünnungsmedium) eingesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Es wurde pro Lunge eine ungefärbte und eine nur mit dem sekundären Fluoreszenzantikörper behandelte Kontrolle mitgeführt. Als sekundärer Fluoreszenzantikörper diente Alexa Fluor 488 (F(ab)<sub>2</sub> *goat anti rabbit* Immunglobulin G (H+L), Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), in der Verdünnung 1:2000 (in Verdünnungsmedium mit 1 % Ziegen-Serum). Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zur Kerndarstellung mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich, 1:1000 in 0,01 mol/l PBS verdünnt) für 5 min gegengefärbt. Zuletzt erfolgte das Eindecken der Gewebeschnitte mit Mowiol 4-88 (Carl Roth). Nach 20 min Trocknung bei

4 °C wurden die Schnitte mit Klarlack versiegelt. Die Beurteilung der Antikörper-Signale erfolgte mit einem Kamera-gekoppelten Spektral-Konfokalmikroskop (LSM 780, Zeiss, Jena, Deutschland) mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. med. Andreas Hocke, Charité - Universitätsmedizin Berlin. Um die Spezifität des Syk-Antikörpers zu verifizieren wurde ein komplementäres Syk-Sperrpeptid (Syk (N-19) P, Santa Cruz Biotechnology) im Verhältnis 1:5 mit dem Syk-Antikörper vermischt, über Nacht inkubiert und auf einen Gewebeschnitt aufgetragen. Auf einen Schnitt derselben Lunge wurde als Kontrolle nur der Syk-Antikörper aufgetragen.

Für die Doppelfärbung von Syk und  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma) wurde nach Färbung der Gewebeschnitte mit dem sekundären Fluoreszenzantikörper Alexa Fluor 488 ein zweiter Primärantikörper aufgetragen, der gegen humanes und murines  $\alpha$ -sma gerichtet war ( $\alpha$ -sma-Cy3, Sigma-Aldrich). Dieser bereits fluoreszenzmarkierte Antikörper wurde in der Verdünnung 1:100 eingesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

### 3.4 Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge

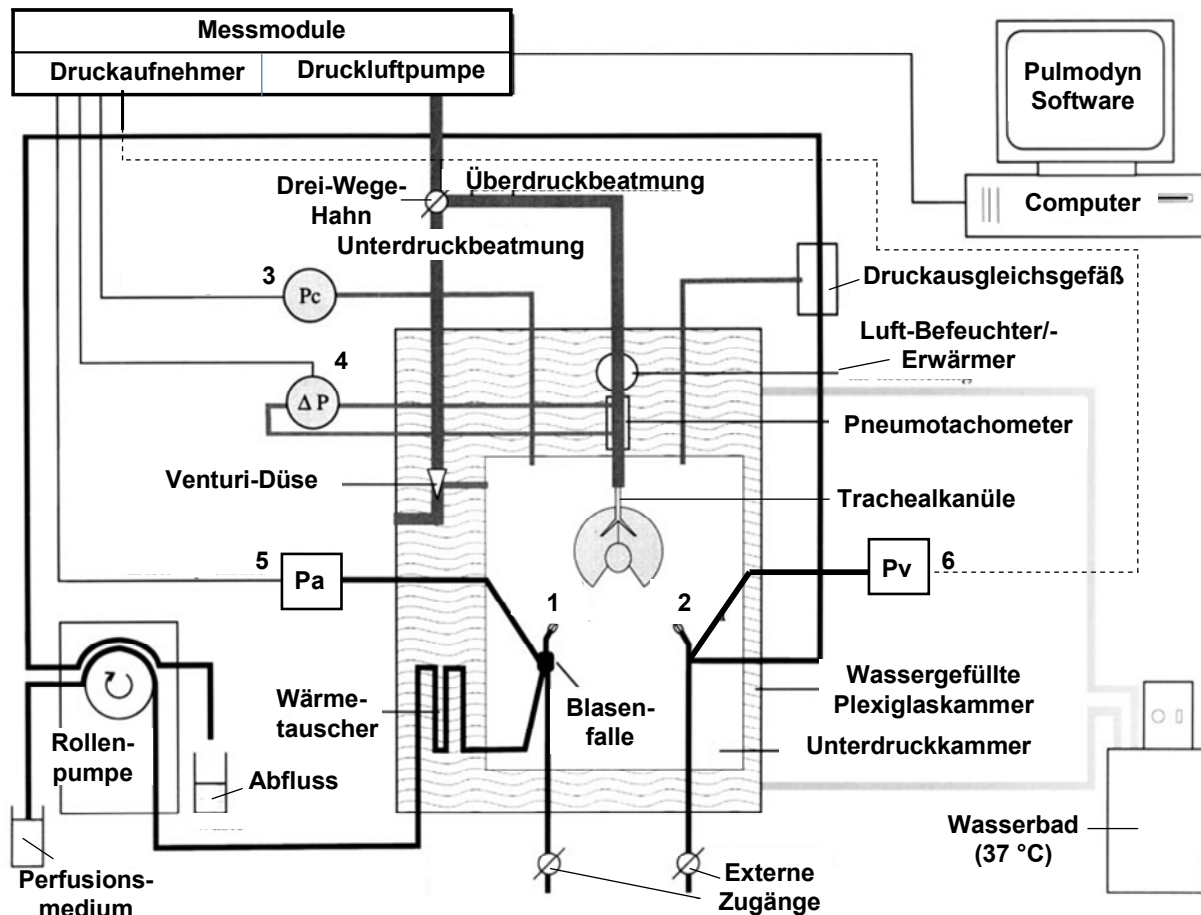
#### 3.4.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML) war darauf ausgerichtet, die physiologische Organtätigkeit der murinen Lunge aufrechtzuerhalten. Die Ventilation erfolgte bereits am noch lebenden Tier, die pulmonale Perfusion mit einer Blutersatzflüssigkeit (Perfusionsmedium/Perfusat; Elektrolytlösung II N, SERAG Wiessner, Naila, Deutschland) erfolgte nach finaler Blutentnahme. Durch Ventilation, Perfusion und Unterdruckbeatmung wurde die physiologische Lungenfunktion weitgehend aufrechterhalten.

Der Versuchsaufbau bestand aus einer mit *Aqua destillata* (*A. dest.*) gefüllten, doppelwandigen Plexiglaskammer mit zugehörigem Deckel (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland). Das *A. dest.* innerhalb der Kammer wurde durch ein Umwälzthermostat (Ecoline E103, Lauda Dr. R. Wobster GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) konstant bei 37 °C gehalten. Innerhalb der Plexiglaskammer des Versuchsaufbaus befand sich die Unterdruckkammer, in der eine Maus auf einer Silikonunterlage positioniert wurde und die mit dem Deckel verschlossen werden konnte. In der Unterdruckkammer befanden sich ein arterieller und ein venöser Metallkatheter mit angeschlossenen Schlauchverbindungen. Über den arteriellen Zufluss wurde das mit 20 mmol/l Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>, 8,4 %, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) und einem Gasgemisch (5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), 20 % Sauerstoff (O<sub>2</sub>), 75 % Stickstoff (N<sub>2</sub>), Abteilung Technische Gase Charité - Universitätsmedizin Berlin) versetzte und auf 37 °C temperierte Perfusionsmedium mit einer Flussrate von 1 ml/min in die Pulmonalarterie geleitet und nach Passage der pul-

monalen Zirkulation aus dem linken Vorhof des Herzens wieder abtransportiert. Angetrieben wurde der Perfusionsfluss durch eine Peristaltikpumpe (Ismatec® Reglo-Analog, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland). Während der Präparation der Maus erfolgte eine Überdruckbeatmung der Lunge mit Raumluft über eine Trachealkanüle, welche über ein Schlauchsystem mit einer Beatmungspumpe (Plugsys®-Grundgerät mit Messmodulen, Hugo Sachs Elektronik) verbunden war. Nach dem Schließen der Unterdruckkammer nach Beendigung der Präparation wurde auf eine Unterdruckbeatmung mit dem oben angegebenen Gasgemisch umgestellt. Der Unterdruck wurde über eine Venturi-Düse am Pneumotachometer des Versuchsaufbaus erzeugt. Maximaler und minimaler Kammerdruck wurden so eingestellt, dass sie während des gesamten Versuches bei  $-9 \text{ cmH}_2\text{O}$  (max.) bzw.  $-4,5 \text{ cmH}_2\text{O}$  (min.) gehalten wurden (druckkontrollierte Beatmung). Die Atemfrequenz lag bei  $90 \text{ /min}$ . Relevante Parameter der Atmung und zentrale vaskuläre Drücke wie pulmonalarterieller Mitteldruck, Atemwegswiderstand, Tidalvolumen und die dynamische Lungencompliance wurden digital aufgezeichnet (Computersoftware Pulmodyn, Hugo Sachs Elektronik). Zur Reduktion von Atelektasenbildung wurde eine sich im 4-Minuten-Intervall wiederholende, tiefe Inspiration ( $-24 \text{ cmH}_2\text{O}$ ) eingestellt. Mit einem Druckausgleichsgefäß außerhalb der Kammer wurde der linksatriale Mitteldruck bei  $2,2 \text{ cmH}_2\text{O}$  justiert. Nach Isolierung der Lunge wurde der stabile Verlauf der Grundwerte für 20 min beobachtet (*Baseline*-Phase), danach konnten über das Perfusionsmedium verschiedene Substanzen in die Lunge appliziert werden, deren Effekte anhand der Messparameter beobachtet und aufgezeichnet werden konnten. Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau des IPML-Arbeitsplatzes.





**Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Arbeitsplatzes der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge.**

Zur Aufrechterhaltung der physiologischen Lungentätigkeit der Maus wurde der folgende Versuchsaufbau gewählt: Das narkotisierte Versuchstier wurde in die Unterdruckkammer der mit erwärmtem Wasser gefüllten Plexiglas-Kammer gelegt und eine standardisierte Präparation vorgenommen. Dabei erfolgte zunächst die Intubation einer Trachealkanüle, um die Beatmung der Lunge über eine Druckluftpumpe aufrechtzuerhalten. Es folgte die finale Blutentnahme, die zum Tod des Versuchstiers führte. Im Anschluss wurde die künstliche Perfusion der beatmeten Lunge durch das Einführen eines Katheters (1) in die *Arteria pulmonalis* des Herzens ermöglicht. Das Perfusionsmedium wurde aus einem Vorratsbehälter über ein Schlauchsystem durch eine Rollenpumpe zum Katheter geleitet und über den venösen Abflusskatheter (2) aus dem linken Herzatrium abgezogen. Nach dem Ende der Präparation wurde die Kammer geschlossen und über eine Venturi-Düse am Pneumotachometer eine Unterdruckbeatmung induziert. Die Überwachung verschiedener Untersuchungsparameter und Einstellungen erfolgten computergestützt mittels der Software Pulmodyn. Mittels Druckaufnehmer wurden der Kammerdruck  $P_c$  (3) und der Beatmungsdruck  $\Delta P$  (4) überwacht. Die vaskulären Drücke wurden durch einen arteriellen ( $P_a$  (5)) bzw. venösen ( $P_v$  (6)) Druckaufnehmer gemessen. Über das Druckausgleichsgefäß wurde der linksatriale Druck justiert. Modifiziert nach von Bethmann et al. (von Bethmann et al. 1998).

### 3.4.2 Standardisierte Präparation

Das zu untersuchende Tier wurde mit einem intraperitoneal applizierten Narkosegemisch, bestehend aus in steriler, isotonischer Kochsalzlösung (Natriumchlorid, NaCl, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verdünntem Xylazin (160 mg/kg; Rompun 2 % Injektionslösung, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Ketamin (75 mg/kg; Ketavet Injektionslösung 100 mg/ml, Pfizer, Berlin, Deutschland), narkotisiert. Die ausreichende Narkosetiefe wurde durch Prüfung des Zwischenzehenreflexes festgestellt. Der ventrale Thorakal- und Abdominalbereich des Tieres wurde mit Braunol® (7,5 %, B. Braun Melsungen AG) bestrichen und das Tier auf eine Silikonunterlage in die Unterdruckkammer des Versuchsaufbaus gelegt. Dann wurden Haut und Unterhaut vom Xyphoid zur Mandibula eröffnet und der *Musculus trachealis* freigelegt. Dieser wurde ventral der Trachea ergriffen und abgetrennt. Die freiliegende Trachea wurde untertunnelt und eine Ligatur wurde durch den geschaffenen Tunnel gezogen. Es folgte die Tracheotomie unterhalb des Kehlkopfes und zur Beatmung der Lunge das Einführen der Trachealkanüle, welche mit der Ligatur befestigt wurde. Anschließend wurde die Bauchhöhle vom Becken bis zum Xyphoid, mit Entlastungsschnitten entlang des Rippenbogens, eröffnet. Das Zwerchfell wurde fenestriert und durch die Öffnung wurden 50 µl Heparin (70 IE Heparin-Natrium, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland, verdünnt mit 0,9 % NaCl) in den rechten Herzventrikel appliziert. Die finale Entblutung erfolgte über die *Vena cava caudalis*. Anschließend wurde der Unterleib der Maus cranial der Leber abgetrennt. Bis zur Entnahme von Leber, Milz und Nieren wurde der Unterleib auf Eis gehalten. Der verbliebene Oberkörper wurde fixiert und es folgten die Abtrennung des Perikards vom Herzen und die Sternotomie. Anschließend wurden die Thoraxwände nach lateral aufgeklappt und fixiert. Das Thymusgewebe wurde entfernt und die *Arteria pulmonalis* untertunnelt und durch die geschaffene Öffnung eine Ligatur gelegt. Im Anschluss wurde die Herzspitze abgetrennt und der rechte Herzventrikel eröffnet. Über die Rollpumpe wurde das Perfusionsmedium aus dem Vorratsgefäß zum arteriellen Katheter geleitet. Der *Arteria pulmonalis*-Katheter wurde durch die Öffnung am rechten Herzventrikel eingeführt, in die *A. pulmonalis* vorgeschoben und mit Hilfe der Ligatur in seiner Position fixiert. Der venöse Abflusskatheter wurde über die Öffnung an der Herzspitze in den linken Vorhof vorgeschoben und ebenfalls mit einer Ligatur fixiert.

### 3.4.3 Substanzapplikation

#### 3.4.3.1 Vaso- und bronchokonstriktorische Stimuli

Die vaso- und bronchokonstriktorisch wirksamen Substanzen wurden in ihrem jeweiligen Lösungsmittel (Solvent) gelöst und während der IPML-Experimente in Einzel-Applikationen in aufsteigender Dosierung verabreicht. Hierfür wurde für die Dauer der Applikation in Perfusionsmedium gewechselt, welches die jeweilige konstriktorisch wirksame Substanz in entsprechender Konzentration enthielt. Tabelle 1 zeigt die verschiedenen Substanzen, ihre eingesetzten Konzentrationen sowie die Applikationsdauer der einzelnen Dosierungen.

**Tabelle 1: Übersicht über die in der IPML eingesetzten Vaso- und Bronchokonstriktoren.**

Substanz	Solvent	Konzentration	Applikationsdauer
Angiotensin II	5 % Essigsäure	1, 3, 10 $\mu\text{mol/l}$	1 min
Endothelin-1	5 % Essigsäure	5, 50 $\text{nmol/l}$	10 min
Kaliumchlorid	<i>A. dest.</i>	20, 40, 80 $\text{mmol/l}$	3 min
Methacholin	0,9 % NaCl	3, 10, 30 $\mu\text{mol/l}$	30 s
Serotonin	<i>A. dest.</i>	3, 10, 30, 100 $\mu\text{mol/l}$	30 s
S1P	99 % Methanol	1, 3, 10 $\mu\text{mol/l}$	10 min
U46619	DMSO	30, 100, 300 $\text{nmol/l}$	3 min

IPML = Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge, *A. dest.* = *Aqua destillata*, NaCl = Natriumchlorid, S1P = Sphingosin-1-Phosphat, U46619 = Thromboxan-Rezeptor-Agonist, DMSO = Dimethylsulfoxid

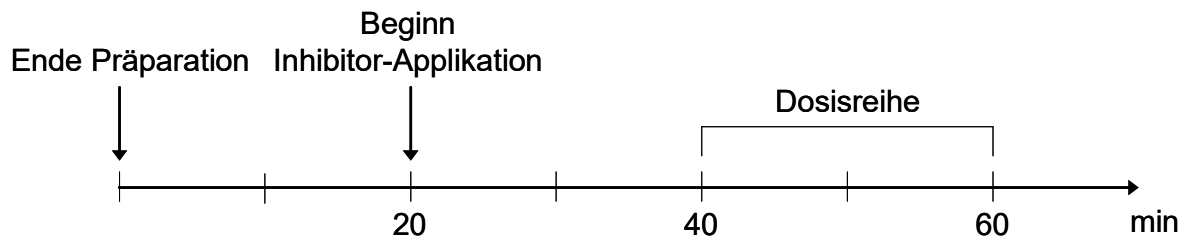
### 3.4.3.2 Inhibitoren

Die Inhibitoren (Tabelle 2) wurden in ihrem entsprechenden Solvent gelöst und während der IPML-Experimente kontinuierlich bis zum Versuchsende über das Perfusionsmedium appliziert. Der dabei mit dem Inhibitor in das Perfusionsmedium eingebrachte Lösungsmittelanteil lag unter 0,1 %. In den Kontrollgruppen wurde die entsprechende Solventmenge appliziert. Damit die Inhibitoren ihre Wirkung in der Lunge bereits entfalten konnten, erfolgte die Applikation einer Dosisreihe konstriktorisch wirksamer Stimuli 20 min nach Beginn der Inhibitor-Applikation. Abbildung 2 zeigt schematisch den Ablauf eines IPML-Experiments mit Inhibitor-Applikation. Abweichende Vorgehensweisen bei der Versuchsdurchführung werden gesondert beschrieben.

**Tabelle 2: Übersicht über die in der IPML eingesetzten Inhibitoren.**

Name	Funktion	Konzentration	Solvent
BAY 61-3606	Syk-Inhibitor	1 µmol/l	<i>A. ad inj.</i>
BIM	PKC-Inhibitor	10 µmol/l	60 % <i>A. ad inj.</i> und 40 % Perfusat
Indomethacin	COX-1- und -2- Inhibitor	30 µmol/l	DMSO
L-NAME	NO-Synthase- Inhibitor	1 mmol/l	Perfusat
R406	Syk-Inhibitor	1 µmol/l	DMSO
SB 203580	p38 MAPK-Inhibitor	10 µmol/l	DMSO
Y-27632	Rho-Kinase-Inhibitor	5 µmol/l	<i>A. ad inj.</i>

IPML = Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge, Syk = Milztyrosinkinase, *A. ad inj.* = *Aqua ad injectabilia*, BIM = *Bisindolylmaleimide I, Hydrochloride*, PKC = Proteinkinase C, COX = Cyclooxygenase, DMSO = Dimethylsulfoxid, L-NAME = *Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride*, NO = Stickstoffmonoxid, p38 MAPK = p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase



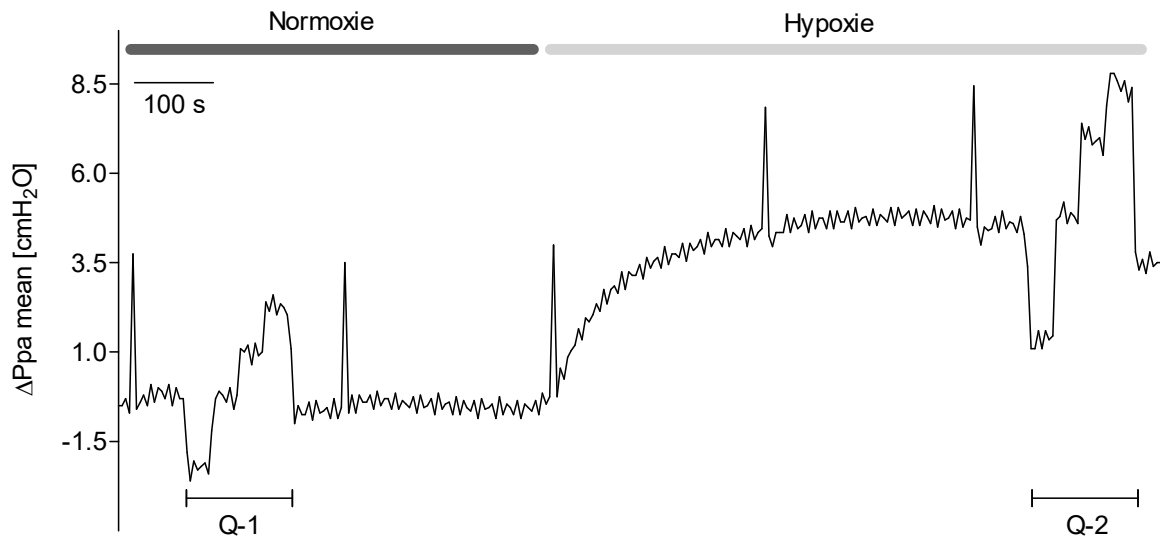
**Abbildung 2: Schematischer Ablauf eines IPML-Experiments mit Inhibitor-Applikation.**

Nach dem Ende der standardisierten Präparation und einer 20-minütigen Phase, in der die Grundwerte der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML) beobachtet wurden, erfolgte die kontinuierliche Applikation des Inhibitors über das Perfusionsmedium bis zum Versuchsende. Die Applikation einer aufsteigenden Dosisreihe konstriktorischer Stimuli erfolgte 20 min nach Beginn der Inhibitor-Applikation. Die Dosisreihe umfasste je nach Substanz bei unterschiedlicher Applikationsdauer 2-4 Einzel-Applikationen.

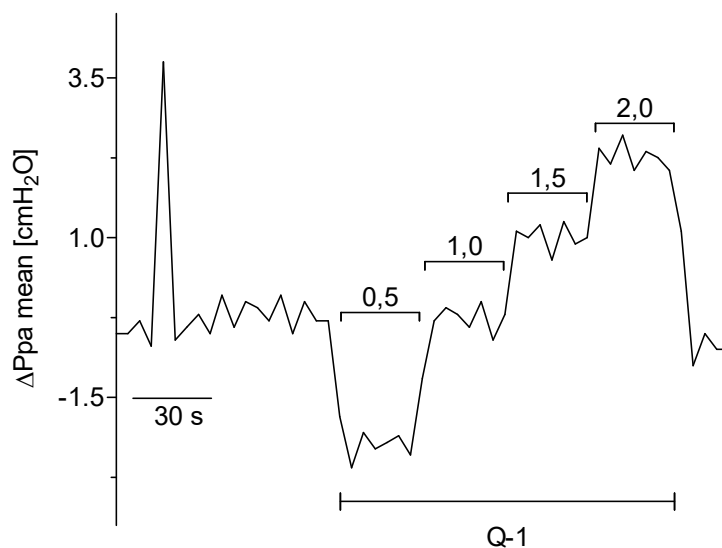
### 3.4.4 Hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion

Zur Untersuchung der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) in der IPML wurden der Cyclooxygenase (COX)-1- und -2-Inhibitor Indomethacin ( $\geq 99\%$  (TLC), Sigma-Aldrich) und der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase-Inhibitor *N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME, Sigma-Aldrich) in das Perfusionsmedium gegeben, um eine Beeinflussung der vaskulären Reagibilität durch NO bzw. Arachidonsäure-Metabolite zu hemmen. Die beiden Inhibitoren wurden von Versuchsbeginn bis Versuchsende appliziert. Im Gegensatz zu der bisher beschriebenen druckkontrollierten Beatmung wurde eine Volumen-kontrollierte Beatmung angewandt. Dazu wurde das Tidalvolumen dem Körpergewicht des Versuchstieres entsprechend eingestellt ( $\sim 10 \mu\text{l}/\text{kg}$ ), bei einem pulmonalen endexpiratorischen Druck (PEEP) von  $-2 \text{ cmH}_2\text{O}$ . Nach einer 10-minütigen *Baseline*-Phase mit BAY 61-3606 bzw. Solvent im Perfusionsmedium wurde die Flussgeschwindigkeit des Perfusionsmediums für 30 s auf  $0,5 \text{ ml}/\text{min}$  reduziert, darauf folgten die Wechsel zu  $1 \text{ ml}/\text{min}$ ,  $1,5 \text{ ml}/\text{min}$  und  $2 \text{ ml}/\text{min}$  für jeweils 30 s, um dann wieder auf den Ausgangswert von  $1 \text{ ml}/\text{min}$  zurückzukehren (Perfusionsfluss (Q)-Druck-Kurve (Q-1) in der normoxischen Phase des Versuchs). Im Anschluss wurde die Sauerstoff-Anreicherung des Perfusates beendet und von der nicht-rezirkulierenden auf eine rezirkulierende Perfusion umgestellt. Anschließend erfolgte der Wechsel von normoxischer ( $20\% \text{ O}_2$ ) zu hypoxischer ( $1\% \text{ O}_2$ ) Beatmung. 10 min nach Initiierung der hypoxischen Ventilation wurde erneut die wechselnde Justierung des Perfusionsflusses vorgenommen (Q-2 in der hypoxischen Phase des Versuchs). Die Abbildungen 3 A und B zeigen schematisch den Verlauf der Perfusionsfluss (Q)-Druck-Kurve während eines HPV-IPML-Experiments.

A



B



**Abbildung 3: Schematischer Verlauf der Perfusionsfluss (Q)-Druck-Kurve.**

(A) Gesamter Verlauf der Perfusionsfluss (Q)-Druck-Kurve im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge bei Normoxie (20 %  $O_2$ ) und Hypoxie (1 %  $O_2$ ). Justierung der Perfusionsflussgeschwindigkeit bei Q-1 und Q-2. Der pulmonalvaskuläre Druckanstieg ( $\Delta Ppa$  mean) ergab sich aus der Differenz zwischen dem pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) zum jeweiligen Zeitpunkt und dem basalen Ppa mean. (B) Verlauf der Perfusionsfluss (Q)-Druck-Kurve bei Justierung der Perfusionsflussgeschwindigkeit (Q-1), ausgehend von 1,0 ml/min für jeweils 30 s auf 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ml/min, mit anschließender Rückkehr auf den Ausgangswert.

### 3.4.5 Untersuchung vaso- und bronchodilatatorischer Effekte in präkonstrin- gierten Gefäßen und Bronchien

Im Modell der IPML wurde nach standardisierter Präparation, Kammerschluss und einer 12-minütigen *Baseline*-Phase aus dem reinen Perfusionsmedium in U46619 (100 nmol/l, Merck-Millipore)- bzw. Methacholin (MCh, 30 µmol/l, Sigma-Aldrich)-haltiges Perfusionsmedium gewechselt. U46619 führt zu einer anhaltenden Kontraktion pulmonaler Gefäße und damit zu einem plateauartigen Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (Ppa mean). Analog bewirkt MCh eine anhaltende Kontraktion der Bronchialmuskulatur (plateauartiger Anstieg des Atemwegswiderstands  $Res_{aw}$ ). Nach 28-minütiger U46619- bzw. MCh-Applikation wurde BAY 61-3606 zusätzlich zu U46619 bzw. MCh für 16 min appliziert. Danach wurde erneut U46619- bzw. MCh-haltiges Perfusionsmedium bis zum Versuchsende appliziert. Um potenzielle NO-vermittelte Effekte auszuschließen, wurden die Experimente zudem unter Einsatz des NO-Synthase-Hemmers L-NAME durchgeführt, der von Versuchsbeginn bis Versuchsende appliziert wurde.

### 3.4.6 Untersuchung potenzieller Mechanismen der Syk-vermittelten Broncho- und Vasokonstriktion

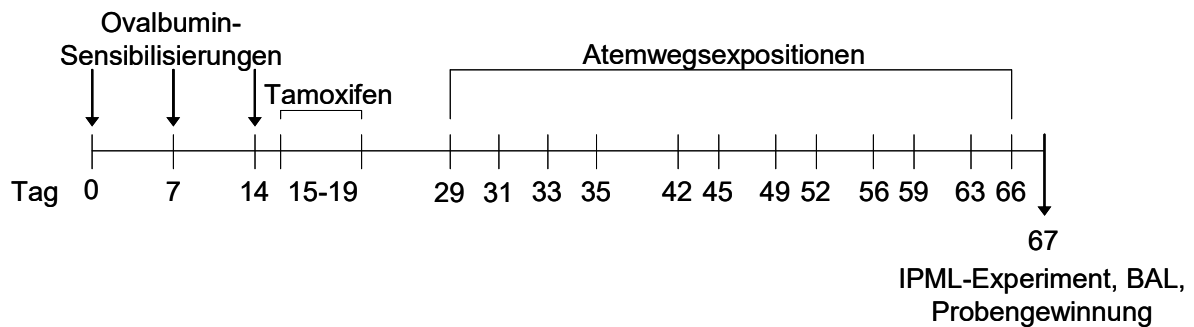
Im Modell der IPML wurden die Effekte des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 (Merck-Millipore), des Proteinkinase C (PKC)-Inhibitors *Bisindolylmaleimide I, Hydrochloride* (BIM, Merck-Millipore) und des p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Inhibitors SB 203580 (Merck/Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) auf die Serotonin (Sigma-Aldrich)-induzierte Broncho- und Vasokonstriktion untersucht. Außerdem wurde jeweils die Wirkung einer kombinierten Enzymhemmung mit BAY 61-3606 vergleichend untersucht. Nach standardisierter Präparation und einer 12-minütigen *Baseline*-Phase begann die Verabreichung von Y-27632, BIM, SB 203580 mit/ohne BAY 61-3606 bzw. Solvent. Nach einem Intervall von  $\geq 10$  min wurde die erste Serotonin-Dosis appliziert. Die Inhibitoren wurden bis zum Versuchsende verabreicht.

## 3.5 Modell der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation

### 3.5.1 Systemische Sensibilisierung, Induzierung der Syk-Deletion und Atemwegsexpositionen

Zur Induktion einer chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation wurden die Tiere des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) und die korrespondierenden Wildtyp-Mäuse an den Tagen 0, 7 und 14 sensibilisiert. Dazu wurde den Tieren 50 µg Ovalbumin (OVA, Albumin, *from chicken egg white*, Grade V, Sigma-Aldrich) in 20 µl Aluminiumhydroxid (Alu-Gel-S, 1,3 %, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und 180 µl PBS (Gibco® life technologies™ über Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) verabreicht. Kontrolltiere erhielten bei jeder Behandlung 20 µl Aluminiumhydroxid und 180 µl PBS (Scheinsensibilisierung). Das Gemisch wurde mittels einer 27 G-Kanüle (B. Braun Melsungen AG) intraperitoneal appliziert. An den Tagen 15-19 wurde den Tieren einmal täglich 20 mg/kg Tamoxifen (Free Base, Sigma-Aldrich) *per os* über eine Fütterungssonde (*stainless steel feeding needles*, UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande) verabreicht. Die Dosis bestand aus 0,5 mg Tamoxifen in 9 µl Ethanol (Merck) und 91 µl Sonnenblumenöl (*Sunflower Seed Oil*, Sigma-Aldrich). Kontrolltiere erhielten 9 µl Ethanol gemischt mit 91 µl Sonnenblumenöl (Vehikel). Beginnend 10 Tage nach der letzten Tamoxifen- bzw. Vehikel-Applikation schlossen sich repetitive Atemwegsexpositionen an. Hierbei wurden alle Mäuse wiederholt für jeweils 30 min in ein Aerosol-Expositions-System (Föhr Medical Instruments (FMI), Seeheim/ Ober-Beerbach, Deutschland) gesetzt, in das ein 1 % OVA-haltiges Aerosol geleitet wurde, das durch einen Ultraschall-Aerosolgenerator (Aerosol-Expositions-System AES-0702, FMI) erzeugt wurde. An den Tagen 29, 31, 33 und 35 wurden die Tiere 3 mal 30 min exponiert, mit einer 30-minütigen Pause zwischen den einzelnen Expositionen. An den Tagen 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66 wurden die Tiere 2 mal 30 min exponiert, mit einer 30-minütigen Pause zwischen den beiden Expositionen. An Tag 67 fand die standardisierte Präparation der Tiere mit anschließendem IPML-Experiment, Gewinnung von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und Entnahme von Organproben statt. Abbildung 4 zeigt schematisch das Versuchsprotokoll.





**Abbildung 4: Versuchsprotokoll für das Modell der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Entzündung.**

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms (*Syk<sup>flox/flox</sup>*) und korrespondierende Wildtyp-Mäuse wurden an den Tagen 0, 7 und 14 mit Ovalbumin sensibilisiert bzw. mit phosphatgepufferter Salzlösung und Aluminiumhydroxid scheinensensibilisiert. An den Tagen 15-19 erfolgte täglich die orale Gabe von 20 mg/kg Tamoxifen bzw. Vehikel. 10 Tage nach der letzten Tamoxifen-Applikation erfolgten repetitive Atemwegsexpositionen an den Tagen 29, 31, 33, 35, 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66. An Tag 67 fand das Experiment der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge (IPML) mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) und Probengewinnung statt.

**3.5.2 Nachweis der Syk-Deletion mittels Desoxyribonukleinsäure-Extraktion, Polymerase-Kettenreaktion und anschließender Gel-Elektrophorese**

Zur Verifizierung der Tamoxifen-induzierten Syk-Deletion wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die Schwanzspitzen aller untersuchten Tiere wurden während der Präparation an Tag 67 des Protokolls asserviert und bei -20 °C gelagert. Die Extraktion der Desoxyribonukleinsäure (DNA) erfolgte aus einem ~3 mm großen Stück der Schwanzspitze mit 500 µl Lysis-Puffer bestehend aus 10 mol/l Tris (Carl Roth), 0,1 mol/l *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) und 0,5 % Natrium-Dodecylsulfat (Merck-Millipore) sowie 5 µl Proteinase K (Novagen, Darmstadt, Deutschland). Das Gewebe wurde über Nacht auf einem Thermorüttler (Thermomixer Comfort, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf) bei 54 °C, 715 x g inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus über Thermo Fisher Scientific, 10 min, 16060 x g). Danach wurde der Überstand der Proben in 600 µl Isopropanol (SERVA) überführt. Nach mehrmaligem Schwenken des Gefäßes wurde eine DNA-Flocke sichtbar. Die Proben wurden anschließend erneut zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Zuletzt wurde das gesamte Ethanol abpipettiert, die Proben 10 min zum Trocknen stehen gelassen und anschließend mit 200 µl Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer, 1 mol/l Tris und 0,5 mol/l EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Danach wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Für den Nachweis der Syk-Deletion (*Knock-out* des Exon 2 des Syk-Gens (Wex et al. 2011)) mittels PCR wurde ein Mastermix aus den Komponenten des *PCR-Core-Kit* (Roche Diagnos-

tics, Mannheim, Deutschland), *A. dest.* und dem *Primer*-Paar mit der Vorwärtssequenz 5'-GCCCGTTCTGTGCCTACTGG-3' und der Rückwärtssequenz 5'-GCTGGTTCCCTTTTCCTTCC-3' hergestellt. Zu jeweils 3 µl DNA-TE-Probe wurden je 50 µl Mastermix gegeben und die Proben in einem Thermocycler (T1, Biometra, Göttingen, Deutschland) bei definierten Reaktionsbedingungen (Tabelle 3) inkubiert.

**Tabelle 3: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion.**

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	94 °C	3 min
Primerhybridisierung und Elongation	30	94 °C	45 s
		56 °C	1 min
		72 °C	2 min
terminale Elongation	1	72 °C	5 min
Kühlung	-	4 °C	-

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit je 5 µl Ladepuffer versetzt und anschließend in die Taschen eines Agarosegels (1,5 % Agarose (Ultra Pure™ Agarose, Invitrogen) in 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50 x TAE-Puffer: 242 g Tris, 57,1 ml reine Essigsäure und 100 ml 0,5 mol/l EDTA, pH 8,0 in 1 l *A. bidest.*, pH 8,3)) mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml, Carl Roth) pipettiert. Als Längenstandard diente *Smart Ladder* (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln, Deutschland). Das Gel wurde in einer Gel-Elektrophoresekammer (SUB-CELL GT, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) bei 130 V und 400 mA für ca. 45-60 min belassen. Danach wurde es mit einem UV-Licht-Betrachter (*Gel Jet Imager* Version 2004, Intas *Science Imaging Instruments* GmbH, Göttingen, Deutschland) ausgewertet. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms ( $Syk^{flox/flox}$ ) führte zu einer Deletion des *Syk*-Gens ( $Syk^{del/del}$ ). Tabelle 4 zeigt die Anzahl der Basenpaare des *Syk*-Gens der  $Syk^{flox/flox}$ -,  $Syk^{del/del}$ - und WT-Mäuse.

**Tabelle 4: Anzahl der Basenpaare des *Syk*-Gens in  $Syk^{flox/flox}$ -,  $Syk^{del/del}$ - und Wildtyp-Mäusen.**

Maus	$Syk^{flox/flox}$	$Syk^{del/del}$	Wildtyp
Syk-Basenpaare	1429	321	1186

Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms ( $Syk^{flox/flox}$ ) führte zu einer Deletion des *Syk*-Gens ( $Syk^{del/del}$ ).

### 3.5.3 Nachweis der Syk-Deletion mittels Western Blot-Analyse

Die Verifizierung der Syk-Deletion auf Proteinebene wurde durch Western Blot-Analyse der am finalen Versuchstag asservierten Milzen vorgenommen. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG freundlicherweise von Frau Dr. Eva Wex nach einem etablierten Protokoll durchgeführt (Wex et al. 2011).

### 3.5.4 Zellzahlbestimmung und Zelldifferenzierung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die BALF wurde aus der rechten Lunge gewonnen, nachdem die linke Lunge abgesetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Über die Trachealkanüle wurden 650 µl eisgekühltes PBS, in dem der Protease-Inhibitor Complete™ Mini (1 Tablette in 10 ml PBS, Roche Diagnostics) gelöst war, in die Lungenhälfte infundiert. Die Flüssigkeit wurde aspiriert, in ein Reaktionsröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gegeben und auf Eis gelagert (BALF 1). Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt (BALF 2). BALF 1 und 2 wurden anschließend bei 4°C 10 min bei 1152 x g zentrifugiert (Megafuge 1,0 R, Heraeus über Thermo Fisher Scientific). Der Überstand wurde in Eppendorf-Gefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. In jedem Reaktionsröhrchen wurden 50 µl des Überstandes belassen. Es wurden jeweils 450 µl PBS hinzu pipettiert, das Zellpellet aufgeschüttelt, und BALF 1 mit BALF 2 vermischt (BALF-Gemisch). Zur Ermittlung der Zelldichte wurden 7 µl des BALF-Gemisches mit 7 µl Methylviolett (verdünnt in 5 % Essigsäure, Merck-Millipore) in einem Eppendorf-Gefäß vermischt. Daraus wurden 7 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden mit der 400-fachen Vergrößerung eines Mikroskops (Axioskop, Zeiss) alle 4 Großquadrate der Kammer ausgezählt. Aus der Zählung wurde der Mittelwert gebildet und die Zellzahl auf die Gesamtmenge von 1 ml umgerechnet (Mittelwert x 2 x 10.000 = Zellzahl/ ml BALF). Um zytologische Präparate für die Zelldifferenzierung der BALF herzustellen, wurden 100 µl des BALF-Gemisches mit einer Zytospin-Zentrifuge (Cytospin 3, Shandon, Harlow Scientific, Arlington, Massachusetts, USA) auf einen Objektträger aufgebracht. Pro BALF-Probe und Tier wurden zwei Objektträger hergestellt. Die Präparate wurden nach Pappenheim gefärbt und mit Eindeckmedium (Clarion Permanent Mounting Media; Biomedica Corporation, Foster City, Kalifornien, USA) eingedeckt. Zur Zellzählung wurden die Präparate mit dem Ölimmersionsobjektiv bei 1000-facher Vergrößerung mikroskopisch analysiert (Axioskop, Zeiss). Es wurden pro BALF-Probe 200 Zellen gezählt. Die relativen Zahlen der unterschiedlichen Zell-Populationen (Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten) wurden mit der Gesamtzellzahl verrechnet, um die absoluten Zellzahlen zu ermitteln.

### 3.5.5 Zytokin- und Chemokin-Bestimmung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die Quantifizierung der Zytokine IL-5 und IL-6 sowie des Chemokins RANTES erfolgte in Doppelbestimmung mittels Multiplex-Analyse unter Nutzung des Bio-Plex Pro™ Assay (Bio-Rad Laboratories) und wurde streng nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung der Platten erfolgte mittels der Bio-Plex™ Workstation, bestehend aus Bio-Plex™ Array Reader und Bio-Plex™ Millipore unter zu Hilfenahme der Software Bio-Plex™ Manager Version 4.1.1 (alles Bio-Rad Laboratories).

### 3.5.6 Quantifizierung der Ovalbumin-spezifischen Plasma-Immunglobuline mittels *enzyme linked immunosorbent assay*

#### 3.5.6.1 Ovalbumin-spezifisches Immunglobulin E

Eine Mikrotiterplatte (Merck-Millipore) wurde mittels in *Coating*-Puffer gelöstem Anti-Immunglobulin (Ig) E (*Anti-murine IgE unlabeled (purified Rat-anti-Mouse-IgE)* BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) vorbereitet. Der *Coating*-Puffer wurde hergestellt aus Natriumhydrogencarbonat, Natriumchlorid und Di-Natriumcarbonat, welche in *A. bidest.* gelöst wurden. Der pH-Wert des Puffers betrug 9,6. Die vorbereitete Platte wurde über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden nacheinander dreimal 200 µl Waschpuffer in jede Vertiefung der Platte gegeben (Wasch-Schritt). Der Waschpuffer bestand aus PBS und 0,05 % Tween® 20 (Sigma-Aldrich). Der Waschpuffer wurde abgegossen und die Platte trockengeklopft. Es folgte das Blocken unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen mit 3 % BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT). Nach einem Wasch-Schritt wurden die Standards und Proben aufgetragen. Als Standard diente der Serumpool von insgesamt 35 OVA-sensibilisierten und OVA-atemwegsexponierten Syk<sup>flox/flox</sup>-, Syk<sup>del/del</sup>- und Wildtyp-Mäusen. Der Standard wurde in 1 % BSA/PBS zunächst 1:2 verdünnt aufgetragen und schließlich mit 1 % BSA/PBS 1:2 weiter verdünnt. Plasmaproben von scheinensensibilisierten Kontrolltieren wurden pur aufgetragen, Plasmaproben von OVA-sensibilisierten Tieren in den Verdünnungen 1:3 und 1:15 (in 1 % BSA/PBS). Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Proben inkubierten 2 Stunden bei RT. Nach einem Wasch-Schritt wurde in jede Vertiefung OVA-Biotin (0,5 mg/ml, 1:400 verdünnt in 1 % BSA/PBS) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden folgte ein weiterer Wasch-Schritt, dem sich eine einstündige Inkubation der Proben mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) in PBS (1:1000) anschloss. Nach einem letzten Wasch-Schritt wurden die Proben mit Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid (TMB, 1,46 mmol/l, Merck/Calbiochem) inkubiert. Die Reaktion wurde mit einer 2-molaren Schwefelsäure abgestoppt. Die photometri-

sche Messung erfolgte mit dem Photometer HT-2 (anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland) bei 450 nm. Für den Standard wurden Plasma-IgE-Werte festgelegt. Der erste Standard (S1) wurde mit 1000 U/ml definiert. Entsprechend der 1:2 Verdünnung des Standards ergaben sich folgende Werte für den Standard: S2 = 500 U/ml, S3 = 250 U/ml, S4 = 125 U/ml usw.

### 3.5.6.2 Ovalbumin-spezifisches Immunglobulin G1

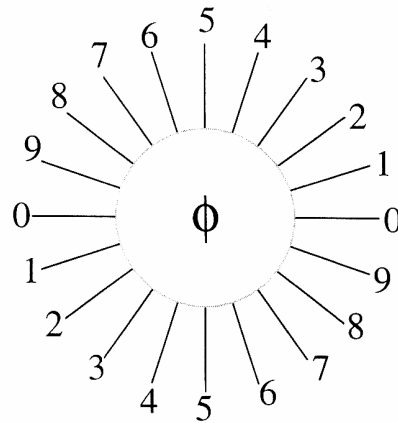
In die Vertiefungen einer 96-Mikrotiterplatte wurde in *Coating*-Puffer gelöstes OVA im Verhältnis 1:200 gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem Wasch-Schritt wurde 3 % Milchpulver (MP) in PBS in die Vertiefungen pipettiert und bei RT für eine Stunde inkubiert. Nach einem Wasch-Schritt wurden der Standard und die Proben aufgetragen. Als Standard diente OVA-14, 10 mg/ml (Sigma-Aldrich), welches mit 1 % MP/PBS in einem Verhältnis von 1:400 vorverdünnt und dann im Verhältnis 1:2 mit 1 % MP/PBS weiter verdünnt wurde. Die Proben von scheinensensibilisierten Kontrolltieren wurden in den Verdünnungen 1:50 und 1:100 aufgetragen. Die Proben OVA-sensibilisierter Tiere wurden in den Verdünnungen 1:200 und 1:400 eingesetzt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Inkubation der Proben erfolgte für 2 Stunden bei RT. Nach einem Wasch-Schritt wurde zur Detektion Biotin *rat anti-mouse* IgG1 (BD Biosciences) in 1 % MP/PBS 1:1000 verdünnt hinzugefügt und 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Wasch-Schritt wurden die Proben für 1 Stunde mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (Verdünnung 1:1000) inkubiert. An einen letzten Wasch-Schritt schloss sich die Inkubation der Proben mit TMB an. Die Reaktion wurde mit einer 2-molaren Schwefelsäure abgestoppt. Die photometrische Messung mit dem Photometer HT-2 erfolgte bei 450 nm.

### 3.5.7 Stereologische Quantifizierung des T<sub>H</sub>2-induzierten pulmonalarteriellen *Remodeling*

Die Untersuchungen wurden mit den rechten Lungen der PBS/OVA- bzw. OVA/OVA-behandelten Syk<sup>flox/flox</sup>- und Syk<sup>del/del</sup>-Mäuse (jeweils 3 Lungen pro Gruppe) durchgeführt. Im Anschluss an das IPML-Experiment und die Gewinnung der BALF wurde die rechte Lunge für 15 min mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung instilliert. Nach Ligation der Trachea wurde das Organ für 24 Stunden in 4 % Formaldehyd-Lösung gelagert und im Anschluss bei 4 °C in PBS bewahrt. Die Quantifizierung des T<sub>H</sub>2-induzierten pulmonalvaskulären *Remodeling* durch stereologische Analyse des Lungengewebes erfolgte in den Räumlichkeiten des Leibniz-Zentrums für Medizin und Biowissenschaften, Forschungszentrum Borstel, mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Heinz Fehrenbach (Leiter der Forschungsgruppe Experimentelle Pneumologie im Programmbereich Asthma und Allergie).

#### 3.5.7.1 Einbettung und Anfertigung der Gewebeschnitte

Die jeweils rechte Lunge der Syk<sup>flox/flox</sup>- bzw. Syk<sup>del/del</sup>-Mäuse wurde von makroskopisch lungenfremden Strukturen befreit und anschließend in einen Plastikbecher überführt, der 50 ml flüssigen Agar (2 % Agar-Agar in *A. dest.*, Merck-Millipore) enthielt. Das Organ wurde so ausgerichtet, dass sich die dorsale Lungenfläche waagrecht zur Agar-Oberfläche befand. Der Agar härtete über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aus. Vor dem Schneiden wurde das Organ ausgerichtet. Lungengewebe ist anisotrop, das heißt die Organstrukturen sind in eine Hauptrichtung ausgerichtet (Müller SA 2008). Das Gegenteil hiervon ist die Isotropie: alle Richtungen sind gleichermaßen möglich, wie z.B. auf der Oberfläche einer Kugel (Müller SA 2008). Für die Analyse sollten die Proben systematisch einheitlich zufällig gewählt werden (*systematic uniformly random sampling*), sodass jede Struktur des Lungengewebes die gleiche Wahrscheinlichkeit besaß, im resultierenden Schnitt zu erscheinen. Dafür wurden die Lungen mit einer Orientierungshilfe (engl. *Orientator Clock*, Abbildung 5) und einer Zufallszahlentabelle ausgerichtet. Entlang der Ausrichtung erfolgte das Schneiden des Organs mittels *Slicer* (Sonderanfertigung, Dänemark) mit einer *feather trimming blade* (pfm medical AG, Köln, Deutschland) in 2 mm dicke Scheiben. Die Scheiben wurden in Einbettungskassetten (Rotilabo, Carl Roth) positioniert und in einem Gewebe-Entwässerungsautomaten (Tissue-Tek® Xpress®; Sakura Finetek, Breisgau, Deutschland) entwässert. Es schloss sich die Paraffinierung des Gewebes an. Mit dem Rotationsmikrotom Microm HM 355 S *Cool Cut* (Thermo Fisher Scientific) wurden 1,5 µm dicke Schnitte der paraffinierten Lungen angefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und auf einer Wärmeplatte (Medax GmbH, Neumünster, Deutschland) getrocknet.



**Abbildung 5: Orientator-Clock mit 20 Teilstrichen gleichen Abstands (Howard et al. 2005).**

Orientierungshilfe zur Ausrichtung des Lungengewebes vor dem Schneiden. Lungengewebe ist anisotrop, das heißt alle Strukturen sind in eine Hauptrichtung ausgerichtet (Müller SA 2008). Jede Struktur des Lungengewebes musste aber die gleiche Wahrscheinlichkeit haben, im resultierenden Schnitt zu erscheinen (systematisch einheitlich zufällige Proben). Hierfür wurde die in Agar fixierte Lunge entlang der Teilstriche der *Orientator-Clock* ausgerichtet und anschließend in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Die resultierenden Gewebeschnitte wurden entwässert und paraffiniert. Von dem paraffinierten Lungengewebe wurden 1,5 µm dicke Schnitte angefertigt, um anschließend das *α-smooth muscle actin* zu färben.

### 3.5.7.2 Färbung von *α-smooth muscle actin* und stereologische Quantifizierung

Die Schnitte wurden entparaffiniert und die endogene Peroxidaseaktivität mit 3 % Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Merck-Millipore) geblockt. Die Färbung des *α-sma* in den Lungengewebeschnitten zur Darstellung der pulmonalen Gefäße wurde nach den Herstellerangaben des *Vector Mouse on Mouse Immunodetection Kits* (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA), mit einem *α-sma*-Antikörper (1:100, *monoclonal Anti-Actin, α-smooth muscle*, Sigma-Aldrich) und mit Hilfe des *Coverplate Slide Racks* und Immunfärbecenter (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mittels Entellan® (Merck-Millipore).

Die stereologischen Analysen erfolgten mit einem computergestützten, kameragekoppelten Konfokal-Mikroskop (Olympus Corporation, Hamburg, Deutschland). Mit Hilfe der Software NewCAST™ (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) wurden nach Festlegung der *region of interest* (ROI) Zählhilfen über den Schnitt gelegt. Die Zählhilfen bestanden aus Punkten bzw. Linien in definierter Anzahl, Abständen und Linienlänge, welche entsprechend ihrer Lokalisation auf dem Schnitt einem bestimmten Zählereignis zugeordnet wurden. So wurden Punkte auf glatten Muskelzellen von Arterien als *Point smooth muscle artery* (P sm-art) gezählt und Linien, welche die Basalmembran einer Arterie kreuzten, als *Intersection basal artery* (I art-bas). Die zur Berechnung der arteriellen Muskelzellschichtdicke (V<sub>s</sub> sm-art, [µm]) relevanten

Zählereignisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Zur finalen Auswertung wurden diese Zählereignisse in eine definierte Formel (Tabelle 5) eingesetzt. Die Berechnungen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Heinz Fehrenbach, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Forschungszentrum Borstel, durchgeführt.

**Tabelle 5: Relevante Zählereignisse bei der Auswertung der  $\alpha$ -sma-gefärbten Lungenschnitte und Formel zur Berechnung der arteriellen Muskelzellschichtdicke.**

Zählereignisse	Formel zur Berechnung der arteriellen Muskelzellschichtdicke (Vs sm-art) [ $\mu\text{m}$ ]
<i>Point smooth muscle artery</i> (P sm-art)	$V_{s \text{ sm-art}} = l_{t/p} * \sum P \text{ sm-art} / (\sum 2 * l \text{ art-bas})$
<i>Intersection basal artery</i> (I art-bas)	

$\alpha$ -sma =  $\alpha$ -smooth muscle actin,  $l_{t/p}$  = Länge der Testlinie pro Testpunkt

### 3.6 Statistische Datenanalyse

Zur Auswertung der erhobenen Daten wurde das Statistikprogramm GraphPad Prism 5 der Firma GraphPad Software (La Jolla, Kalifornien, USA) genutzt. Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden mittels Varianzanalyse (*Two-Way ANOVA*) ausgewertet. Zudem wurde für nicht-parametrische Daten der Mann-Whitney-U-Test und für den Vergleich abhängiger Stichproben der gepaarte t-Test angewandt. Ergebnisse mit einem P-Wert  $< 0,05$  wurden als signifikant betrachtet. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) bzw. als Kastengrafik angegeben.

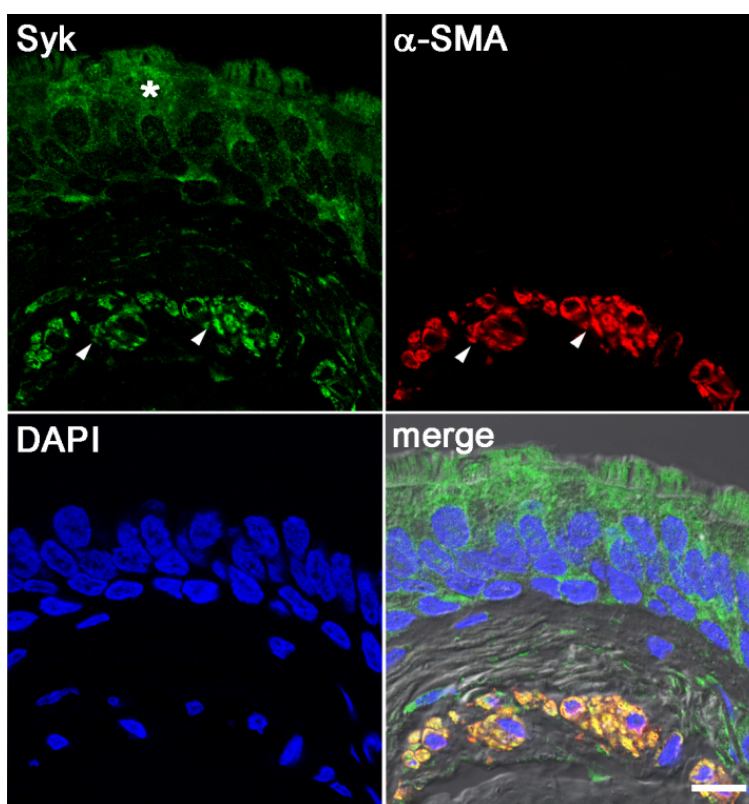
Präparationsfehler, pulmonale Minderperfusion, Lungenödem, Atelektasen, Embolien sowie Störungen der Computer-Aufzeichnung oder technische Messfehler führten zur Exklusion der kompletten Datensätze des betroffenen Tieres aus der Auswertung. Bei einem induzierbaren, Vehikel-behandelten  $\text{Syk}^{\text{flox/flox}}$ -Tier zeigte die Auswertung der PCR, dass eine Deletion des Syk-Gens erfolgt war. Aus diesem Grund wurde auch dieses Tier aus der Gesamtauswertung ausgeschlossen.



## 4 ERGEBNISSE

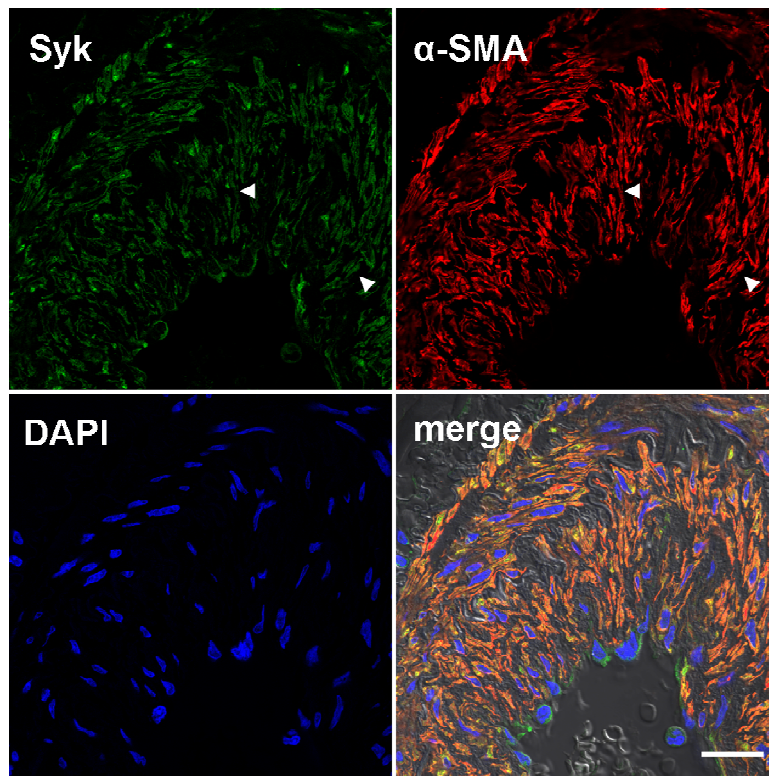
### 4.1 Syk-Expressionsprofil in humanem und murinem Lungengewebe

Die Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, dass Syk mit dem  $\alpha$ -Aktin glatter bronchialer und vaskulärer Muskelzellen in der humanen und murinen Lunge kolokalisiert ist. Daneben wurde Syk in Bronchialepithelzellen detektiert (Abbildungen 6 bis 8). Die Syk-Antikörper-Spezifität wurde durch den Einsatz des Syk-Sperrpeptids (Abbildung 8) sowie durch Western-Blot-Analyse (Abbildung 24) verifiziert.



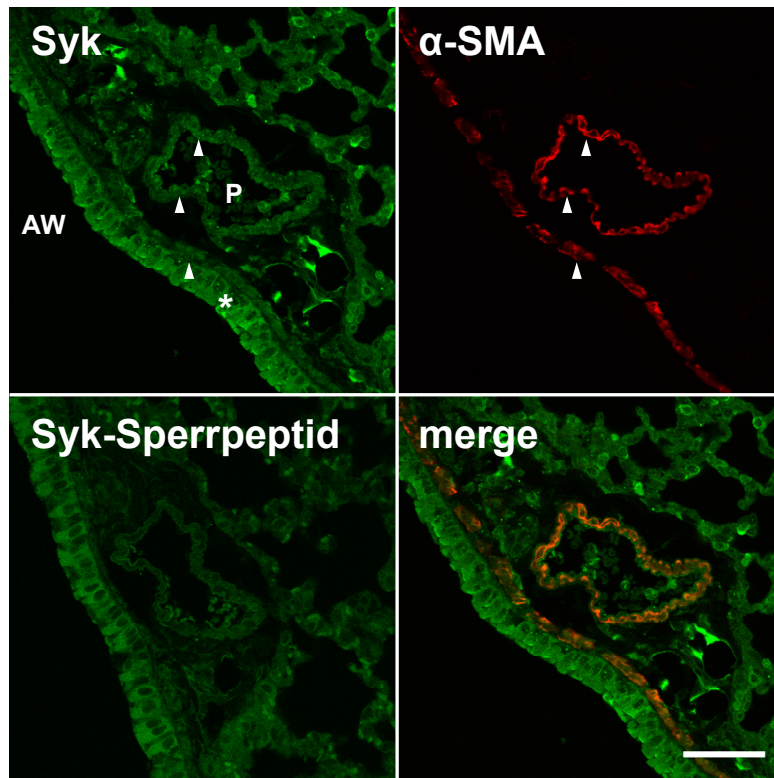
**Abbildung 6: Die Expression der Milztyrosinkinase (Syk) in humanen Atemwegen.**

Durch Immunfluoreszenz-Analysen wurde Syk (grünes Signal) im Zytosol bronchialer Epithelzellen (Sternchen) sowie in den glatten Muskelzellen der Atemwege (Pfeilköpfe) detektiert, nachgewiesen durch Kolokalisation (*merge*, oranges Signal) mit dem  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskelzellen ( $\alpha$ -SMA, rotes Signal). Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht. Zur Darstellung der Lungenmorphologie (grau) wurde die Fusion der Einzelbilder (*merge*) mit einem Differenzialinterferenzkontrast kombiniert. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m und gilt für alle Einzelbilder. Repräsentative Aufnahme von n = 3 Lungen.



**Abbildung 7: Die Expression der Milztyrosinkinase (Syk) in humanen Pulmonalgefäßen.**

Durch Immunfluoreszenz-Analysen wurde Syk (grünes Signal) in pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen (Pfeilköpfe) detektiert, nachgewiesen durch Kolokalisation (*merge*, oranges Signal) mit dem  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskelzellen ( $\alpha$ -SMA, rotes Signal). Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht. Zur Darstellung der Lungenmorphologie (grau) wurde die Fusion der Einzelbilder (*merge*) mit einem Differenzialinterferenzkontrast kombiniert. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu$ m und gilt für alle Einzelbilder. Repräsentative Aufnahme von n = 3 Lungen.



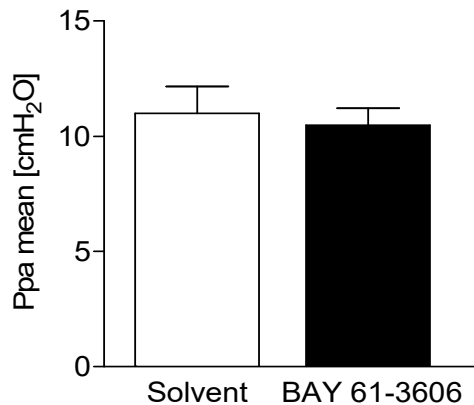
**Abbildung 8: Die Expression der Milztyrosinkinase (Syk) in Atemwegen (AW) und Pulmonalgefäßen (P) der murinen Lunge.**

Durch Immunfluoreszenz-Analysen wurde Syk (grünes Signal) im Zytosol bronchialer Epithelzellen (Sternchen) sowie in bronchialen und pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen (Pfeilköpfe) detektiert, nachgewiesen durch Kolokalisation (*merge*, oranges Signal) mit dem  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskelzellen ( $\alpha$ -SMA, rotes Signal). Die Syk-Antikörper-Spezifität wurde durch den Einsatz des Syk-Sperrpeptids verifiziert. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m und gilt für alle Einzelbilder. Repräsentative Aufnahmen von  $n = 3$  Lungen.

## 4.2 Einfluss der Syk-Inhibition auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge

### 4.2.1 Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 reduzierte die pulmonalvaskuläre Reagibilität

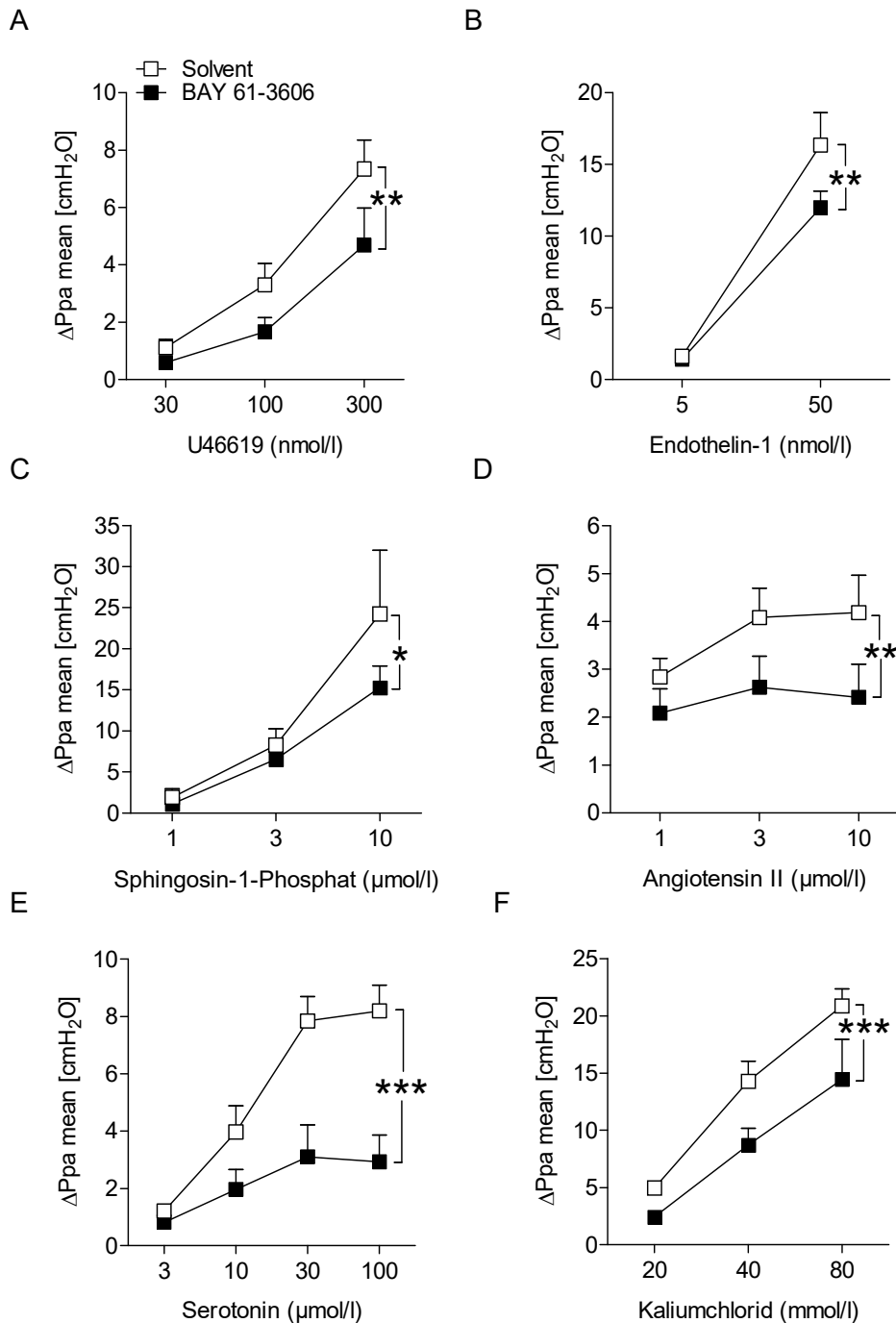
Die Applikation von BAY 61-3606 in Experimenten der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge (IPML) begann 20 min vor der Verabreichung aufsteigender Dosierungen vaso-konstriktorischer Stimuli, sodass sich ein konstanter Wirkspiegel in der Lunge einstellen konnte. Der Inhibitor wurde bis zum Versuchsende appliziert. BAY 61-3606 hatte keinen Einfluss auf den basalen pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean; Abbildung 9).



**Abbildung 9: Der Einfluss des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 auf den basalen pulmonalarteriellen Mitteldruck.**

Der basale pulmonalarterielle Mitteldruck (Ppa mean) wurde 20 min nach Beginn der Applikation des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) bzw. des Solvents in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von  $n = 28$  (BAY 61-3606) bzw. 26 (Solvent) Tieren.

In der IPML führte die Applikation verschiedener vasokonstriktorischer Substanzen zu einem unterschiedlich starken Anstieg des Ppa mean, je nach Vasokonstriktor und Dauer der Verabreichung. Der pulmonalvaskuläre Druckanstieg ( $\Delta\text{Ppa mean}$ ) ergab sich aus der Differenz zwischen dem Ppa mean am Reaktionsmaximum und dem basalen Ppa mean und war Ausdruck der Reagibilität der pulmonalen Gefäße auf den jeweiligen spezifischen vasokonstriktorisches Stimulus. Der Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619, Endothelin-1, Sphingosin-1-Phosphat, Angiotensin II und Serotonin wurden in aufsteigenden Dosierungen verabreicht. Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 führte dabei im Gegensatz zu den Solvent-Gruppen zu einer geringeren pulmonalvaskulären Reagibilität (Abbildung 10 A-E). Die genannten Substanzen vermitteln die Vasokonstriktion über die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Zur Untersuchung, ob die Wirkung von BAY 61-3606 spezifisch für die G-Protein-vermittelte Vasokonstriktion war, wurde Kaliumchlorid als rezeptorunabhängiger Vasokonstriktor getestet. Auch hier kam es zu einer reduzierten pulmonalvaskulären Reagibilität nach Syk-Inhibierung (Abbildung 10 F).

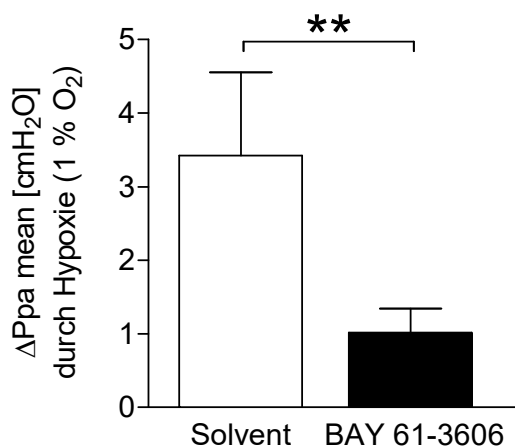


**Abbildung 10: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität.**

Die Applikation des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 (1 μmol/l) im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslung begann 20 min vor Applikation einer Dosisreihe vasokonstriktorischer Stimuli, damit sich ein konstanter Wirkspiegel in der Lunge einstellen konnte. Der Inhibitor wurde bis zum Versuchsende verabreicht, in Kontrollgruppen wurde das Solvent appliziert. Als vasokonstriktorisches Stimuli wurden der Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619 (A), Endothelin-1 (B), Sphingosin-1-Phosphat (C), Angiotensin II (D), Serotonin (E) und Kaliumchlorid (F) eingesetzt. Der pulmonalvaskuläre Druckanstieg (ΔPpa mean) ergab sich aus der Differenz zwischen dem pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) am Reaktionsmaximum und dem basalen Ppa mean. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 5-7 Tieren. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001

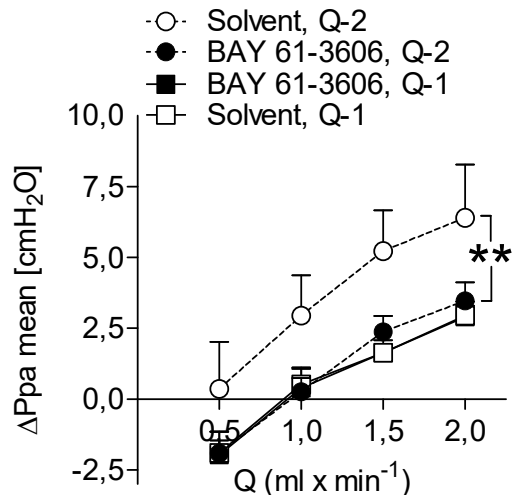
#### 4.2.2 Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 reduzierte die Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion

Im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge wurden zur Untersuchung der HPV über das Perfusionsmedium neben dem Syk-Inhibitor BAY 61-3606 bzw. Solvent der COX-1- und -2-Hemmer Indomethacin und der NO-Synthase-Hemmer L-NAME verabreicht. Dadurch wurde eine gegenregulatorische, durch NO und Arachidonsäure-Metabolite hervorgerufene, vasodilatierende Antwort der Gefäße auf die HPV gehemmt. Die Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>)-induzierte Konstriktion der pulmonalen Gefäße war nach Syk-Inhibierung durch BAY 61-3606 gegenüber der Kontrollgruppe deutlich vermindert, was sich in einem reduzierten  $\Delta$ Ppa mean zeigte (Abbildung 11). Die jeweils 30 Sekunden andauernde transiente Änderung des Perfusionsflusses ging mit einer pulmonalvaskulären Druckänderung einher. Durch die Syk-Inhibition mit BAY 61-3606 war die Perfusionsfluss-induzierte Druckänderung unter Hypoxie gegenüber der Kontrollgruppe reduziert (Abbildung 12).



**Abbildung 11: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion.**

Im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge wurden über das Perfusionsmedium neben BAY 61-3606 (1  $\mu$ mol/l) bzw. Solvent von Versuchsbeginn an zusätzlich 30  $\mu$ mol/l Indomethacin (Inhibitor der Cyclooxygenase-1 und -2) und 1 mmol/l *Nw-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME, Inhibitor der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase) appliziert, um eine gegenregulatorische, durch NO bzw. Arachidonsäure-Metabolite hervorgerufene Vasodilatation zu hemmen. Die Inhibitoren wurden bis zum Versuchsende verabreicht. Der pulmonalvaskuläre Druckanstieg ( $\Delta$ Ppa mean) ergab sich aus der Differenz zwischen dem pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) am Reaktionsmaximum und dem basalen Ppa mean. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 7 Tieren. \*\* P < 0,01

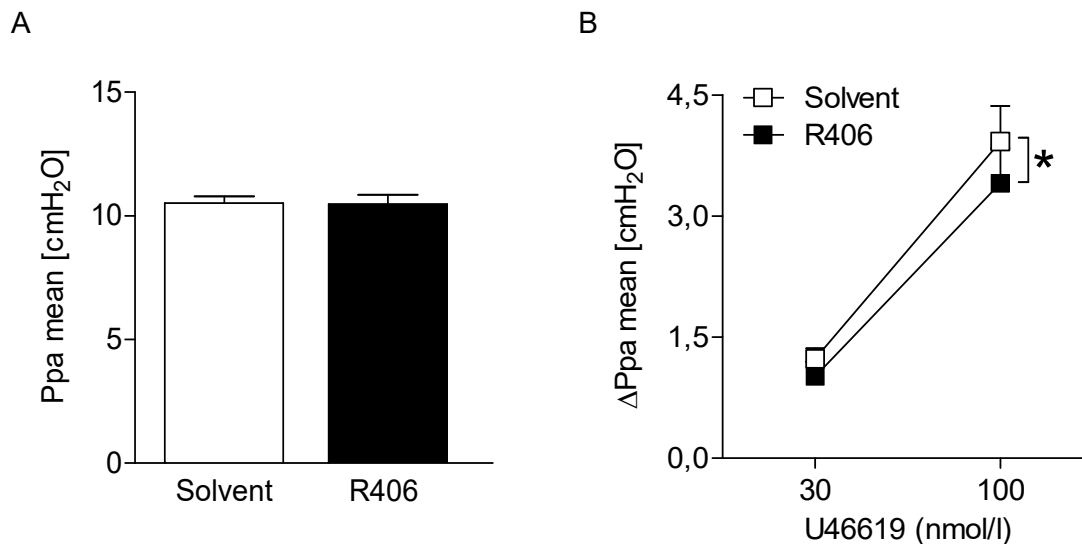


**Abbildung 12: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die Perfusionsfluss-induzierte Druckänderung unter Normoxie und Hypoxie.**

Der Perfusionsfluss (Q) wurde im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge für jeweils 30 s alteriert (0,5/ 1,0/ 1,5/ 2,0 ml/min). Dies erfolgte jeweils einmalig unter Normoxie (Q-1) bzw. Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>, Q-2). Über das Perfusionsmedium wurden neben BAY 61-3606 (1 μmol/l) bzw. Solvent von Versuchsbeginn an zusätzlich 30 μmol/l Indomethacin (Inhibitor der Cyclooxygenase-1 und -2) und 1 mmol/l *Nw-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME, Inhibitor der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase) appliziert, um eine gegenregulatorische, durch NO bzw. Arachidonsäure-Metabolite hervorgerufene Vasodilatation zu hemmen. Der pulmonalvaskuläre Druckanstieg (ΔPpa mean) ergab sich aus der Differenz zwischen dem pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) am Reaktionsmaximum und dem basalen Ppa mean. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 7 Tieren. \*\* P < 0,01

#### 4.2.3 Die Syk-Inhibition durch R406 reduzierte die pulmonalvaskuläre Reagibilität

Um zu verifizieren, dass die bisher gezeigten Effekte Syk-spezifisch und unabhängig von der eingesetzten inhibierenden Substanz waren, wurde der Einfluss eines weiteren Syk-Inhibitors (R406) auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität analysiert. Der Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619 diente dabei als vasokonstriktorisches Stimulus. Die IPML-Experimente erfolgten analog zu jenen mit BAY 61-3606. R406 zeigte, ebenso wie BAY 61-3606, keinen Einfluss auf den basalen pulmonalarteriellen Mitteldruck (Abbildung 13 A). Analog zu den Effekten von BAY 61-3606 führte die R406-vermittelte Syk-Inhibition zu einer verminderten pulmonalvaskulären Reagibilität (Abbildung 13 B), wenngleich die Effekte im Gegensatz zu BAY 61-3606 weniger stark ausgeprägt waren.



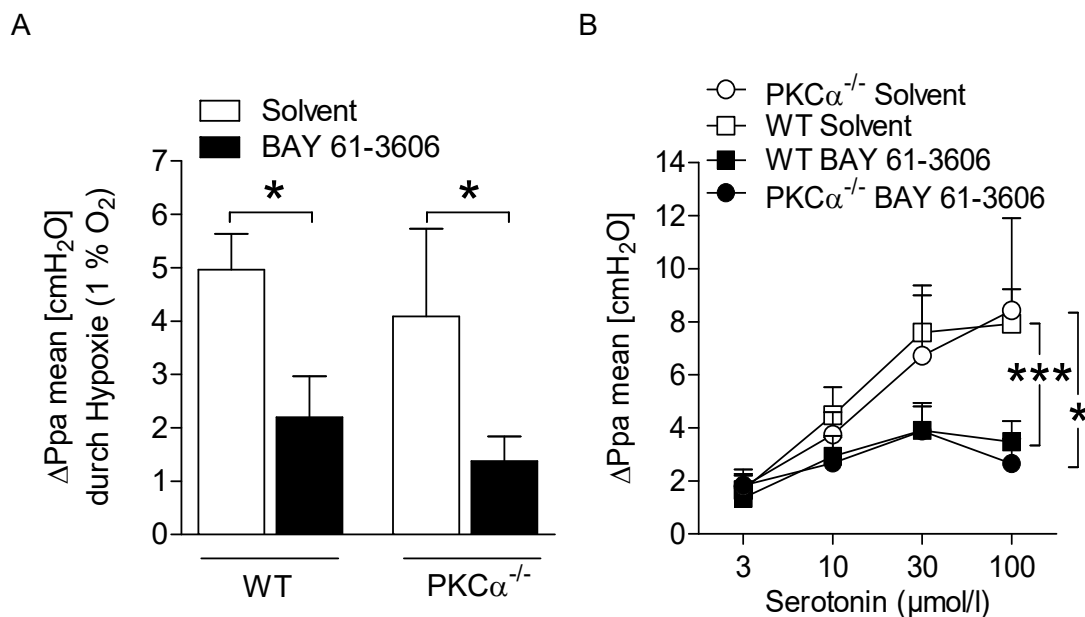
**Abbildung 13: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch R406 auf den basalen pulmonalarteriellen Mitteldruck und die pulmonalvaskuläre Reagibilität.**

(A) Der basale pulmonalarterielle Mitteldruck (Ppa mean) wurde 20 min nach Beginn der Applikation des Syk-Inhibitors R406 (1  $\mu$ mol/l) bzw. des Solvents in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 7 Tieren. (B) Die Applikation des Syk-Inhibitors R406 (1  $\mu$ mol/l) begann 20 min vor Applikation der aufsteigenden Dosisreihe des Thromboxan-Rezeptor-Agonisten U46619, damit sich ein konstanter Wirkspiegel in der Lunge einstellen konnte. Der Inhibitor wurde bis zum Versuchsende verabreicht, in der Kontrollgruppe wurde das Solvent appliziert. Der pulmonalvaskuläre Druckanstieg ( $\Delta$ Ppa mean) ergab sich aus der Differenz zwischen dem Ppa mean am Reaktionsmaximum und dem basalen Ppa mean. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 7 Tieren. \* P < 0,05

#### 4.2.4 Der BAY 61-3606-induzierte Effekt auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität war Proteinkinase C $\alpha$ -unabhängig

Für BAY 61-3606 wurde, neben seiner inhibierenden Wirkung auf Syk, für höhere Konzentrationen auch die Hemmung des Proteinkinase C Isoenzym  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) beschrieben (Yamamoto et al. 2003). Um zu verifizieren, ob der BAY 61-3606-vermittelte Effekt der verminderten pulmonalvaskulären Reagibilität unabhängig von der Expression von PKC $\alpha$  auftritt, wurden isoliert perfundierte Lungen PKC $\alpha$ -defizienter Mäuse (PKC $\alpha$ <sup>-/-</sup>) und korrespondierender Wildtyp-Mäuse (WT) untersucht. Als vasokonstriktorische Stimuli wurden Hypoxie und Serotonin eingesetzt. Die PKC $\alpha$ -Defizienz beeinflusste die BAY 61-3606-induzierten Effekte nicht (Abbildung 14 A und B).





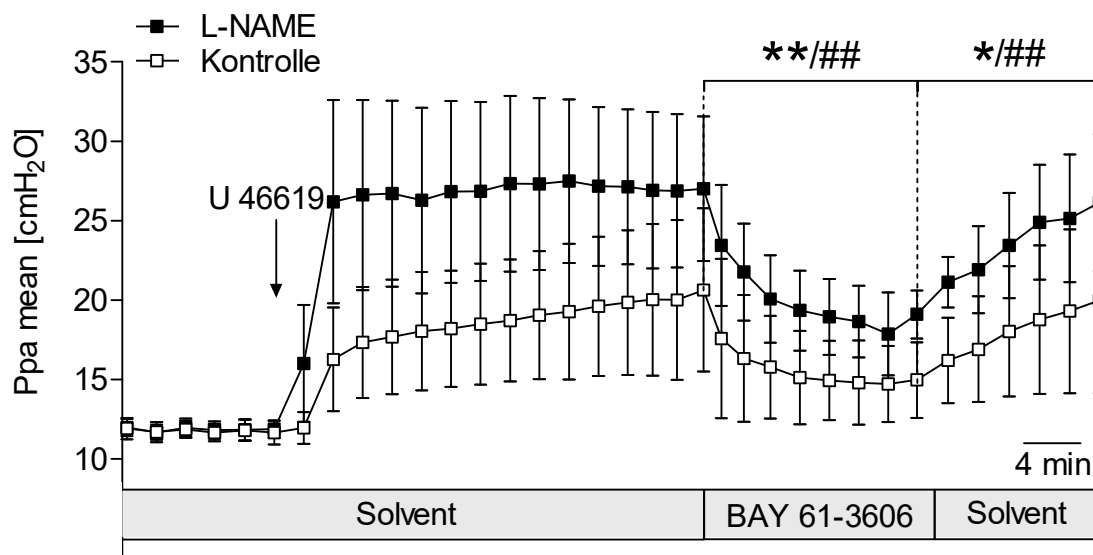
**Abbildung 14: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität bei Proteinkinase Cα-Defizienz.**

Im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge wurden Mäuse mit Proteinkinase Cα-Defizienz (PKCα<sup>-/-</sup>) und die korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäuse untersucht. (A) Als vasokonstriktorisches Stimulus diente die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion. Über das Perfusionsmedium wurden neben BAY 61-3606 (1 μmol/l) bzw. Solvent von Versuchsbeginn an zusätzlich 30 μmol/l Indomethacin (Inhibitor der Cyclooxygenase-1 und -2) und 1 mmol/l *Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME, Inhibitor der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase) appliziert, um eine gegenregulatorische, durch NO bzw. Arachidonsäure-Metabolite hervorgerufene Vasodilatation zu hemmen. Die Inhibitoren wurden bis zum Versuchsende verabreicht. Der pulmonalvaskuläre Druckanstieg (ΔPpa mean) ergab sich aus der Differenz zwischen dem pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) am Reaktionsmaximum und dem basalen Ppa mean. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 4 Tieren. \* P < 0,05 (B) Die Applikation des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 (1 μmol/l) begann 20 min vor Applikation einer aufsteigenden Dosisreihe des vasokonstriktorisches Stimulus Serotonin, damit sich ein konstanter Wirkspiegel in der Lunge einstellen konnte. Der Inhibitor wurde bis zum Versuchsende verabreicht, in Kontrollgruppen wurde das Solvent appliziert. Der pulmonalvaskuläre Druckanstieg (ΔPpa mean) ergab sich aus der Differenz zwischen dem pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) am Reaktionsmaximum und dem basalen Ppa mean. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 5-6 Tieren. \* P < 0,05; \*\*\* P < 0,001

#### 4.2.5 Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 induzierte eine Dilatation in präkonstringierten pulmonalen Gefäßen

Zur Induktion einer Präkonstriktion pulmonaler Gefäße erfolgte die kontinuierliche Applikation von U46619 im Modell der IPML. Hierbei kam es initial zu einem raschen Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks, gefolgt von einer Plateauphase. Innerhalb der Plateauphase führte die Applikation von BAY 61-3606 zu einer unmittelbaren, progredienten Abnahme des pulmonalarteriellen Mitteldrucks. Nach Beendigung der BAY 61-3606 Applikation verschwand dieser Effekt rasch.

Zur Untersuchung, ob der beobachtete Effekt auf einer Syk-abhängigen Regulation des endothelialen NO-Signalweges basierte, erfolgten separate Experimente unter Einsatz des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME. Die NO-Synthase-Inhibition verursachte initial erwartungsgemäß eine stärkere U46619-induzierte pulmonale Vasokonstriktion. Die Inhibierung von Syk durch BAY 61-3606 resultierte jedoch in einer vergleichbaren, signifikanten Abnahme der U46619-induzierten pulmonalvaskulären Kontraktion von rund 65 % (Abbildung 15).

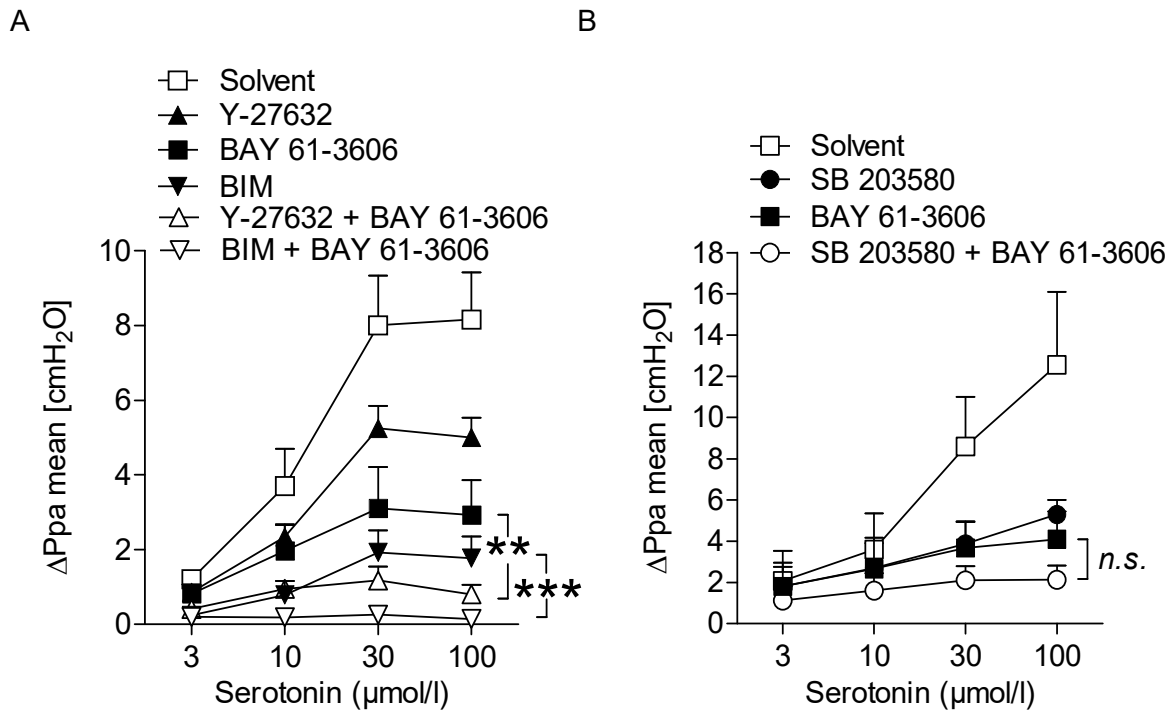


**Abbildung 15: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf präkonstringierte pulmonale Gefäße.**

Im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslung wurde eine Präkonstriktion pulmonaler Gefäße durch die kontinuierliche Applikation des Thromboxan-Rezeptor-Agonisten U46619 (100 nmol/l) induziert. U46619 verursachte initial einen raschen Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (Ppa mean), mit einer darauf folgenden Plateauphase. Innerhalb der Plateauphase erfolgte die Applikation des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 (1 µmol/l) für 16 min. Vor bzw. nach BAY 61-3606-Applikation wurde die entsprechende Solvent-Menge appliziert. Zur Untersuchung einer möglichen Syk-vermittelten Regulation der vasodilatatorischen Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO) erfolgte in einer separaten Versuchsreihe bei gleichem Vorgehen von Versuchsbeginn an die Applikation des NO-Synthase-Inhibitors *Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME) über das Perfusionsmedium. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 6 (Kontrolle) bzw. 7 (L-NAME) Tieren. In beiden Gruppen erfolgte der Vergleich der Ppa mean-Werte vor Applikation von BAY 61-3606 gegenüber den Ppa mean-Werten am Ende der Applikation bzw. der Vergleich der Ppa mean-Werte am Ende der BAY 61-3606-Applikation mit den Ppa mean-Werten am Versuchsende (siehe Klammern). Sternchen geben signifikante Unterschiede in der Kontrollgruppe, Rauten in der L-NAME-Gruppe an. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; ### P < 0,001

#### 4.2.6 Die pulmonalvaskuläre Syk-vermittelte Signaltransduktion

Die genauen Signalwege, über welche Syk die pulmonalvaskuläre Reagibilität beeinflusst, sind noch unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass dies über eine Modulation von Enzymen erfolgt, welche an der Vermittlung der Kontraktion glatter Muskelzellen beteiligt sind. Daher wurden insbesondere zentrale regulatorische Enzyme der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen glatten Muskelzellkontraktion in Kombination mit einer Syk-Hemmung untersucht, um zu determinieren, welche Rolle Syk in der Vermittlung der Vasokonstriktion spielen könnte. Hierfür wurden die folgenden Inhibitoren eingesetzt: Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632, pan-PKC-Inhibitor (BIM), p38 MAPK-Inhibitor SB 203580. Als vasokonstriktorisches Stimulus diente Serotonin, das in der IPML in aufsteigender Dosierung appliziert wurde. Die Inhibition von Rho-Kinase bzw. PKC führte, analog zu den BAY 61-3606-Effekten, zu einer verminderten kontraktilen Antwort der Lungengefäße (Abbildung 16 A). Bei gleichzeitiger Hemmung von Syk und Rho-Kinase bzw. Syk und PKC kam es zu additiven inhibitorischen Effekten, was sich in einer stark verminderten vasokonstriktorisches Antwort äußerte (Abbildung 16 A). Die pulmonalvaskuläre Reagibilität bei Inhibition der p38 MAPK war mit der alleinigen Hemmung von Syk vergleichbar (Abbildung 16 B). Die kombinierte Enzymhemmung von Syk und p38 MAPK führte im Vergleich zur singulären Syk-Inhibition zu keinen additiven Effekten (Abbildung 16 B).



**Abbildung 16: Der Einfluss der Inhibition von Syk durch BAY 61-3606, von Rho-Kinase durch Y-27632, von PKC durch BIM und von p38 MAPK durch SB 203580 auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität.**

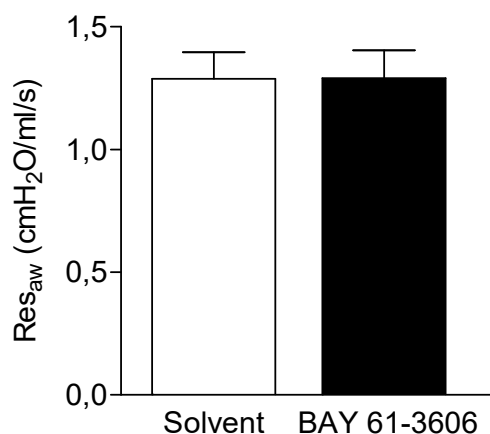
Zur Untersuchung, ob Syk eine Rolle in der Vermittlung der Kontraktion glatter vaskulärer Muskelzellen spielt, erfolgte die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 (1 μmol/l) in Kombination mit der Inhibition relevanter regulatorischer Enzyme der Calcium-unabhängigen Kontraktion glatter Muskelzellen im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge. (A) Applikation des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 (5 μmol/l), des pan-Proteinkinase C (PKC)-Inhibitors *Bisindolylmaleimide I, Hydrochloride* (BIM, 10 μmol/l) bzw. von BAY 61-3606. Damit sich ein konstanter Inhibitor-Wirkspiegel in der Lunge einstellen konnte, erfolgte die Applikation einer aufsteigenden Dosisreihe des Vasokonstriktors Serotonin erst nach einem Intervall von ≥ 10 min nach Beginn der Inhibitor-Applikation. Die Inhibitoren wurden bis zum Versuchsende verabreicht, in der Kontrollgruppe wurde das Solvent appliziert. In separaten Experimenten erfolgte nach gleichem Vorgehen die kombinierte Applikation von Y-27632 + BAY 61-3606 bzw. BIM + BAY 61-3606. Der pulmonalvaskuläre Druckanstieg (ΔPpa mean) ergab sich aus der Differenz zwischen dem pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) am Reaktionsmaximum und dem basalen Ppa mean. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 4-7 Tieren. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 (B) BAY 61-3606 (1 μmol/l) bzw. der p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Inhibitor SB 203580 (10 μmol/l) wurden analog zum unter (A) beschriebenen Vorgehen appliziert. In separaten Experimenten erfolgte nach gleichem Vorgehen die kombinierte Applikation von SB 203580 + BAY 61-3606. Der pulmonalvaskuläre Druckanstieg (ΔPpa mean) ergab sich aus der Differenz zwischen dem pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) am Reaktionsmaximum und dem basalen Ppa mean. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 5-7 Tieren. n.s. = nicht signifikant

### 4.3 Einfluss der Syk-Inhibition auf die Atemwegsreagibilität im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge

#### 4.3.1 Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 reduzierte die Atemwegsreagibilität

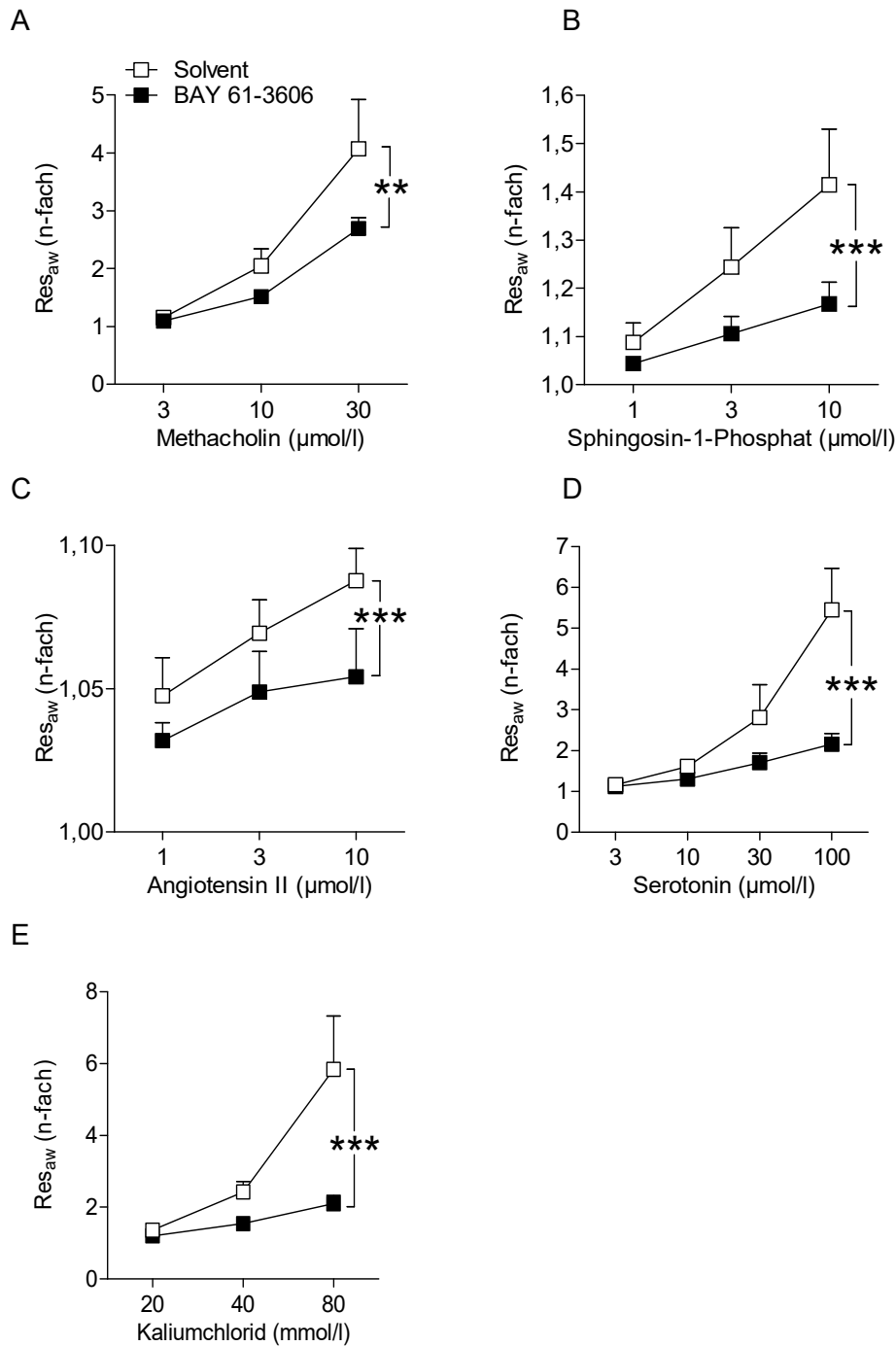
Zu den im Modell der IPML untersuchten bronchokonstriktorisch wirksamen Substanzen gehörten Methacholin, Sphingosin-1-Phosphat, Angiotensin II, Serotonin und Kaliumchlorid. Die Applikation der genannten Substanzen führte zu einem transienten Anstieg des kontinuierlich aufgezeichneten Atemwegswiderstands ( $Res_{aw}$ ). Die n-fache Erhöhung des  $Res_{aw}$  in Relation zum basalen  $Res_{aw}$  diente als Maß für die Atemwegsreagibilität.

BAY 61-3606 hatte keinen Einfluss auf den basalen Atemwegswiderstand (Abbildung 17). Die durch BAY 61-3606 induzierte Syk-Inhibierung führte jedoch nach Bronchokonstriktorgabe zu einer reduzierten Atemwegsreagibilität gegenüber der jeweiligen Solvent-Kontrollgruppe (Abbildung 18 A-E).



**Abbildung 17: Der Einfluss des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 auf den basalen Atemwegswiderstand.**

Der basale Atemwegswiderstand ( $Res_{aw}$ ) wurde 20 min nach Beginn der Applikation des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 (1  $\mu$ mol/l) bzw. des Solvents in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 32 (BAY 61-3606) bzw. 29 (Solvent) Tieren.



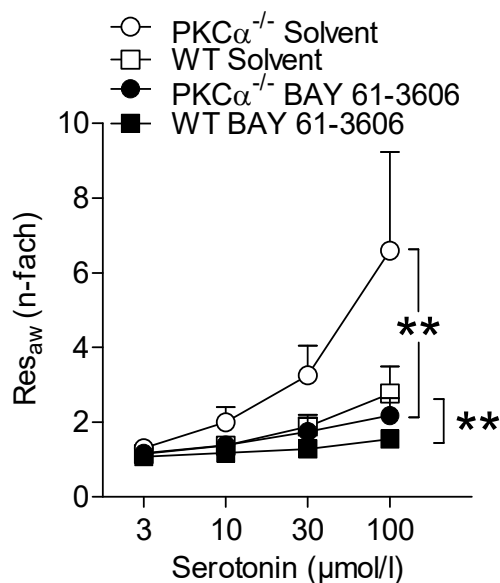
**Abbildung 18: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die Atemwegsreagibilität.**

Die Applikation des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 (1 µmol/l) in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge begann 20 min vor Applikation einer Dosisreihe bronchokonstriktorisches Stimuli, damit sich ein konstanter Wirkspiegel in der Lunge einstellen konnte. Der Inhibitor wurde bis zum Versuchsende verabreicht, in Kontrollgruppen wurde das Solvent appliziert. Als bronchokonstriktorisches Stimuli wurden Methacholin (A), Sphingosin-1-Phosphat (B), Angiotensin II (C), Serotonin (D) und Kaliumchlorid (E) eingesetzt. Die Daten zeigen die n-fache Erhöhung des Atemwegswiderstands ( $Res_{aw}$ ) in Relation zum basalen  $Res_{aw}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 5-7 Tieren. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001

### 4.3.2 Der BAY 61-3606-induzierte Effekt auf die Atemwegsreagibilität war Proteinkinase C $\alpha$ -unabhängig

Neben der Inhibition von Syk wurde für BAY 61-3606 für höhere Konzentrationen auch eine Beeinflussung der PKC $\alpha$  beschrieben (Yamamoto et al. 2003). Zur Untersuchung, ob die bisher beobachteten Effekte der Syk-Inhibition auf die Atemwegsreagibilität PKC $\alpha$ -unabhängig waren, erfolgte analog zur Analyse der pulmonalvaskulären Reagibilität die Verifizierung des BAY 61-3606-induzierten Effektes in PKC $\alpha$ -defizienten Mäusen. Hierbei zeigte sich, dass die Serotonin-vermittelte Bronchokonstriktion bei Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 gegenüber der Solvent-Kontrolle zu einer deutlich reduzierten Atemwegsreagibilität führte (Abbildung 19). Die Expression der PKC $\alpha$  hatte demnach keinen Einfluss auf die BAY 61-3606-vermittelten Effekte.

Als Zufallsergebnis ergab sich bei Untersuchung der oben beschriebenen Fragestellung in den Solvent-Kontrollgruppen ein Unterschied zwischen der Serotonin-induzierten Atemwegsreagibilität PKC $\alpha$ -defizienter Mäuse und den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen.



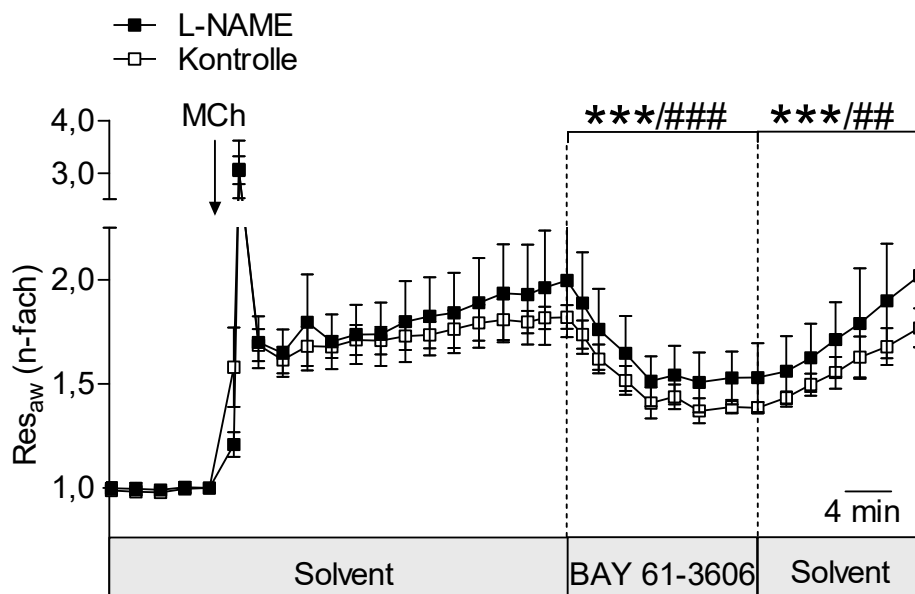
**Abbildung 19: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die Atemwegsreagibilität bei Proteinkinase C $\alpha$ -Defizienz.**

Im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge wurden Mäuse mit Proteinkinase C $\alpha$ -Defizienz (PKC $\alpha^{-/-}$ ) und die korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäuse untersucht. Die Applikation des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 (1  $\mu$ mol/l) begann 20 min vor Applikation einer aufsteigenden Dosisreihe des bronchokonstriktorisches Stimulus Serotonin, damit sich ein konstanter Wirkspiegel in der Lunge einstellen konnte. Der Inhibitor wurde bis zum Versuchsende verabreicht, in Kontrollgruppen wurde das Solvent appliziert. Die Daten zeigen die n-fache Erhöhung des Atemwegswiderstands ( $Res_{aw}$ ) in Relation zum basalen  $Res_{aw}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 5-6 Tieren. \*\* P < 0,01

### **4.3.3 Die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 induzierte eine Dilatation in präkonstringierten Bronchien**

Analog zur Untersuchung der Syk-Inhibierung durch BAY 61-3606 in präkonstringierten pulmonalen Gefäßen wurden IPML-Experimente durchgeführt, um den Effekt einer Syk-Inhibierung auf präkonstringierte Bronchien zu untersuchen. Hierbei wurde Methacholin verabreicht, um die Bronchokonstriktion zu induzieren, welche initial zu einem starken Anstieg des Atemwegswiderstands mit einer darauffolgenden Plateauphase führte. Es zeigte sich, dass die Applikation von BAY 61-3606 zu einer raschen Dilatation der Bronchien führte, was sich in einer signifikanten Reduktion des Atemwegswiderstands um rund 65 % äußerte (Abbildung 20). Nach Beendigung der Syk-Inhibitor-Applikation verschwand der beobachtete Effekt rasch wieder. Es wurde hypothetisiert, dass Syk diese Effekte über die NO-Synthese und/oder NO-Freisetzung regulieren könnte. Die Ergebnisse der separaten Versuchsreihe mit Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME waren jedoch vergleichbar mit der Kontrollgruppe ohne L-NAME (Abbildung 20).





**Abbildung 20: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf präkonstringierte Bronchien.**

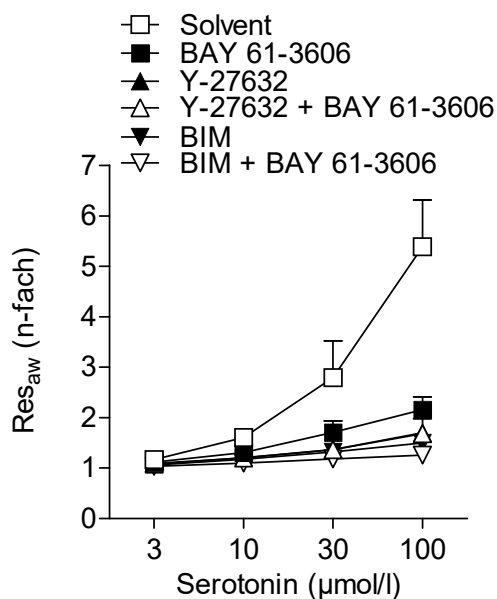
Im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge wurde eine Präkonstriktion der Bronchien durch die kontinuierliche Applikation von Methacholin (MCh, 30  $\mu\text{mol/l}$ ) induziert. MCh verursachte initial einen raschen Anstieg des Atemwegswiderstands ( $\text{Res}_{\text{aw}}$ ), mit einer darauf folgenden Plateauphase. Innerhalb der Plateauphase erfolgte die Applikation des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) für 16 min. Vor bzw. nach BAY 61-3606-Applikation wurde die entsprechende Solvent-Menge appliziert. Zur Untersuchung einer möglichen Syk-vermittelten Regulation der bronchodilatatorischen Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO) erfolgte in einer separaten Versuchsreihe bei gleichem Vorgehen von Versuchsbeginn an die Applikation des NO-Synthase-Inhibitors *N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME) über das Perfusionsmedium. Die Daten zeigen die n-fache Erhöhung des Atemwegswiderstands in Relation zum basalen  $\text{Res}_{\text{aw}}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  (Kontrolle) bzw. 7 (L-NAME) Tieren. In beiden Gruppen erfolgte der Vergleich der  $\text{Res}_{\text{aw}}$ -Werte vor Applikation von BAY 61-3606 gegenüber den  $\text{Res}_{\text{aw}}$ -Werten am Ende der Applikation bzw. der Vergleich der  $\text{Res}_{\text{aw}}$ -Werte am Ende der BAY 61-3606-Applikation mit den  $\text{Res}_{\text{aw}}$ -Werten am Versuchsende (siehe Klammern). Sternchen geben signifikante Unterschiede in der Kontrollgruppe, Rauten in der L-NAME-Gruppe an. ##  $P < 0,01$ ; \*\*\*/####  $P < 0,001$

#### 4.3.4 Die bronchiale Syk-vermittelte Signaltransduktion

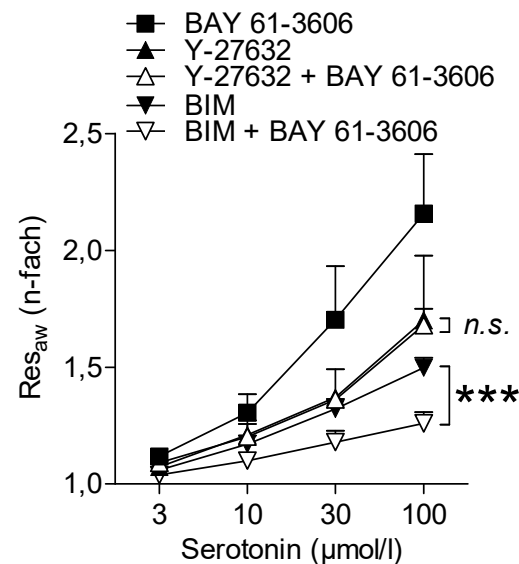
Basierend auf den beobachteten Effekten der Syk-Inhibition auf die bronchiale Reagibilität wurde für Syk eine Rolle in der Vermittlung der Kontraktion glatter bronchialer Muskelzellen vermutet. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung der Serotonin-induzierten Bronchokonstriktion bei Inhibition relevanter, an der Vermittlung der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion glatter Muskelzellen beteiligter Enzyme, in Kombination mit der Syk-Inhibition.

Es zeigte sich, dass die Inhibition von Rho-Kinase mit Y-27632, von PKC mit BIM bzw. von p38 MAPK mit SB 203580 zu einer reduzierten bronchialen Reagibilität führte (Abbildung 21 A und B, Abbildung 22). Bei gleichzeitiger Hemmung von Rho-Kinase und Syk zeigte sich eine Hemmung der Bronchokonstriktion in vergleichbarer Größenordnung gegenüber der alleinigen Inhibition der Rho-Kinase (Abbildung 21 A und B). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei kombinierter Hemmung von Syk und p38 MAPK, bei der gegenüber der alleinigen Syk-Inhibition keine additiven Effekte zu beobachten waren (Abbildung 22). Bei gleichzeitiger Inhibition von PKC und Syk zeigte sich hingegen eine Addition der hemmenden Effekte (Abbildung 21 A und B).

A

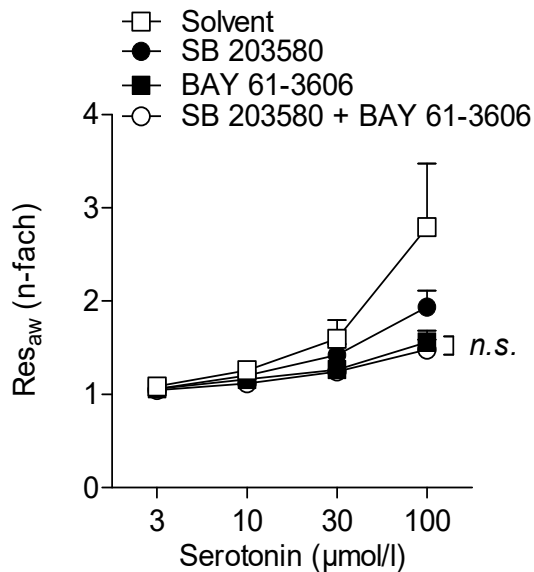


B



**Abbildung 21: Der Einfluss der Inhibition von Syk durch BAY 61-3606, von Rho-Kinase durch Y-27632 und von PKC durch BIM auf die Atemwegsreagibilität.**

Zur Untersuchung, ob Syk eine Rolle in der Vermittlung der Kontraktion glatter bronchialer Muskelzellen spielt, erfolgte die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 (1 µmol/l) in Kombination mit der Inhibition relevanter regulatorischer Enzyme der Calcium-unabhängigen Kontraktion glatter Muskelzellen im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge. (A) Applikation des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 (5 µmol/l), des pan-Proteinkinase C (PKC)-Inhibitors *Bisindolylmaleimide I, Hydrochloride* (BIM, 10 µmol/l) bzw. von BAY 61-3606. Damit sich ein konstanter Inhibitor-Wirkspiegel in der Lunge einstellen konnte, erfolgte die Applikation einer aufsteigenden Dosisreihe des Bronchokonstriktors Serotonin erst nach einem Intervall von  $\geq 10$  min nach Beginn der Inhibitor-Applikation. Die Inhibitoren wurden bis zum Versuchsende verabreicht, in der Kontrollgruppe wurde das Solvent appliziert. In separaten Experimenten erfolgte nach gleichem Vorgehen die kombinierte Applikation von Y-27632 + BAY 61-3606 bzw. BIM + BAY 61-3606. Die Daten zeigen die n-fache Erhöhung des Atemwegswiderstands ( $Res_{aw}$ ) in Relation zum basalen  $Res_{aw}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von  $n = 4-6$  Tieren. (B) Darstellung der Daten aus (A) ohne die Solvent-Gruppe mit angepasster Y-Achsen-Skalierung. \*\*\*  $P < 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant



**Abbildung 22: Der Einfluss der Inhibition von Syk durch BAY 61-3606 und von p38 MAPK durch SB 203580 auf die Atemwegsreagibilität.**

Zur Untersuchung, ob Syk eine Rolle in der Vermittlung der Kontraktion glatter bronchialer Muskelzellen spielt, erfolgte die Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 (1 µmol/l) in Kombination mit der Inhibition relevanter regulatorischer Enzyme der Calcium-unabhängigen Kontraktion glatter Muskelzellen im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge. Die Applikation von BAY 61-3606 bzw. des p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Inhibitors SB 203580 (10 µmol/l) begann jeweils 12 min vor Applikation einer aufsteigenden Dosisreihe des Bronchokonstriktors Serotonin, damit sich ein konstanter Wirkspiegel in der Lunge einstellen konnte. Die Inhibitoren wurden bis zum Versuchsende verabreicht, in der Kontrollgruppe wurde das Solvent appliziert. In separaten Experimenten erfolgte nach gleichem Vorgehen die kombinierte Applikation von SB 203580 + BAY 61-3606. Die Daten zeigen die n-fache Erhöhung des Atemwegswiderstands ( $Res_{aw}$ ) in Relation zum basalen  $Res_{aw}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von  $n = 5-7$  Tieren. *n.s.* = nicht signifikant

#### 4.4 Die Syk-Deletion in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2- Inflammation

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms ( $Syk^{fllox/fllox}$ ) und die korrespondierenden Wildtyp-Mäuse wurden dreimal im Abstand von 7 Tagen systemisch mit OVA sensibilisiert. Analog dazu wurden mit PBS und Aluminiumhydroxid scheinensensibilisierte Kontrollgruppen mitgeführt. Im Anschluss an die dritte Sensibilisierung erfolgte an fünf aufeinander folgenden Tagen die orale Applikation von jeweils 20 mg/kg Tamoxifen. Kontrollgruppen erhielten das Vehikel. Nach einem 10-tägigen Intervall wurden alle Tiere repetitiven Aerosolexpositionen mit 1 % OVA unterzogen. Die standardisierte Präparation für die funktionellen Analysen in der IPML und zur Probengewinnung erfolgten an Tag 67. Tabelle 6 zeigt die Untersuchungsgruppen.

**Tabelle 6: Untersuchungsgruppen.**

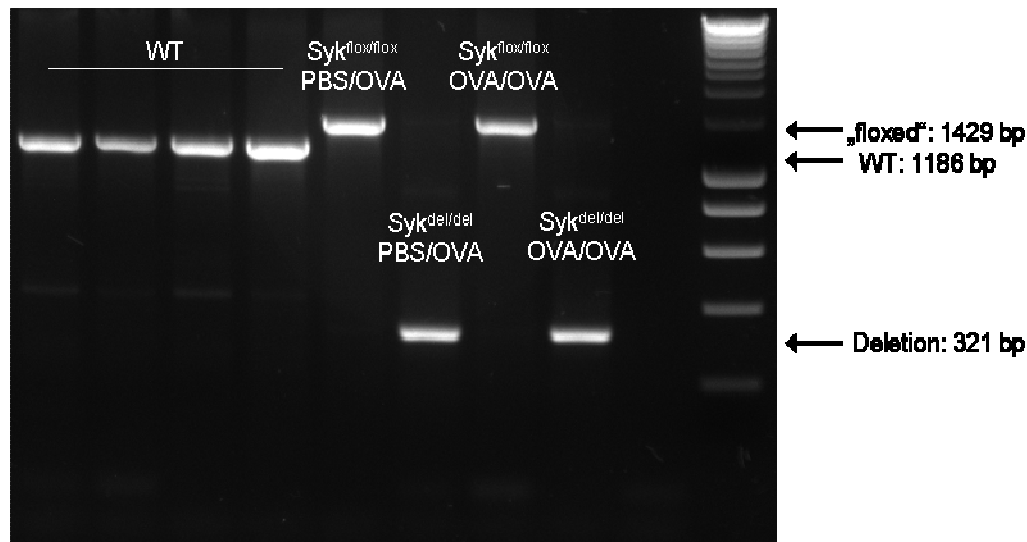
Maus	Syk <sup>flox/flox</sup>		Syk <sup>del/del</sup>		WT		WT	
Behandlung	Vehikel		Tamoxifen		Vehikel		Tamoxifen	
Sensibilisierung/ Aerosolexposition	PBS/ OVA	OVA/ OVA	PBS/ OVA	OVA/ OVA	PBS/ OVA	OVA/ OVA	PBS/ OVA	OVA/ OVA

Die Tamoxifen-Behandlung von Tieren des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) führte zu einer Deletion des Syk-Gens (Syk<sup>del/del</sup>). PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, OVA = Ovalbumin, WT = Wildtyp-Mäuse

#### 4.4.1 Nachweis der Syk-Deletion mittels Polymerase-Kettenreaktion und Western Blot-Analyse

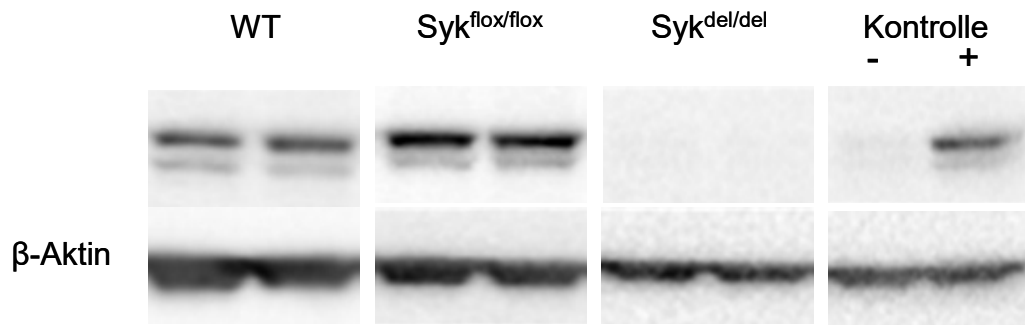
Für den Nachweis der Syk-Deletion wurden am finalen Versuchstag (Tag 67) die Schwanzspitzen und Milzen aller untersuchten Tiere asserviert. Aus den Schwanzspitzen wurde die DNA isoliert und eine PCR mit anschließender Gel-Elektrophorese durchgeführt. Wildtyp-Mäuse zeigten unabhängig von der Tamoxifen-Behandlung stets eine Syk-DNA-Bande bei 1186 Basenpaaren (bp), Vehikel-behandelte Tiere des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) wiesen durch die *LoxP*-Flankierung ihres Syk-Gens eine DNA-Bande im Bereich von 1429 bp auf (Abbildung 23). Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens (Syk<sup>del/del</sup>). Bei den Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen war die 321 bp lange Rest-Sequenz des Syk-Gens nachweisbar (Abbildung 23).

Der Nachweis der Syk-Deletion auf Proteinebene erfolgte in den asservierten Milzen durch Western Blot-Analyse. Es wurde der Syk N-19-Antikörper eingesetzt. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin, ein Protein des Zytoskeletts. Bei Wildtyp-Mäusen wurde unabhängig von der Tamoxifen-Behandlung stets die Syk-Proteinbande nachgewiesen, ebenso bei Vehikel-behandelten Syk<sup>flox/flox</sup>-Mäusen (Abbildung 24). Die Syk-Proteinbande war bei Tamoxifen-behandelten Tieren des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>del/del</sup>) nicht nachweisbar. Die Syk-Deletion bestand demnach auch noch 48 Tage nach der letzten Tamoxifen-Gabe.



**Abbildung 23: Der Nachweis der Tamoxifen-induzierten Syk-Deletion mittels Polymerase-Kettenreaktion und anschließender Gel-Elektrophorese.**

Den Tieren des induzierbaren Mausstamms ( $\text{Syk}^{\text{flox/flox}}$ ) und den korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäusen wurde an den Tagen 15-19 des Versuchsprotokolls einmal täglich 20 mg/kg Tamoxifen per os appliziert, Kontrolltiere erhielten das Vehikel. Am finalen Versuchstag (Tag 67) wurden die Schwanzspitzen aller Tiere asserviert und als Ausgangsmaterial für die DNA-Gewinnung, Polymerase-Kettenreaktion und anschließende Gel-Elektrophorese eingesetzt. Die WT-Mäuse zeigten unabhängig von der Behandlung eine Syk-DNA-Bande bei 1186 Basenpaaren (bp). Vehikel-behandelte  $\text{Syk}^{\text{flox/flox}}$ -Tiere zeigten aufgrund der *LoxP*-Flankierung ihres Syk-Gens eine DNA-Bande bei 1429 bp („floxed“). Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens ( $\text{Syk}^{\text{del/del}}$ ). Bei diesen Tieren erfolgte der Nachweis der 321 bp langen Rest-Sequenz des Syk-Gens. Als Marker (rechts) diente *Smart Ladder* (200 bis 10000 bp). Repräsentative Darstellung einer Probe jeder Versuchsgruppe. OVA = Ovalbumin, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung

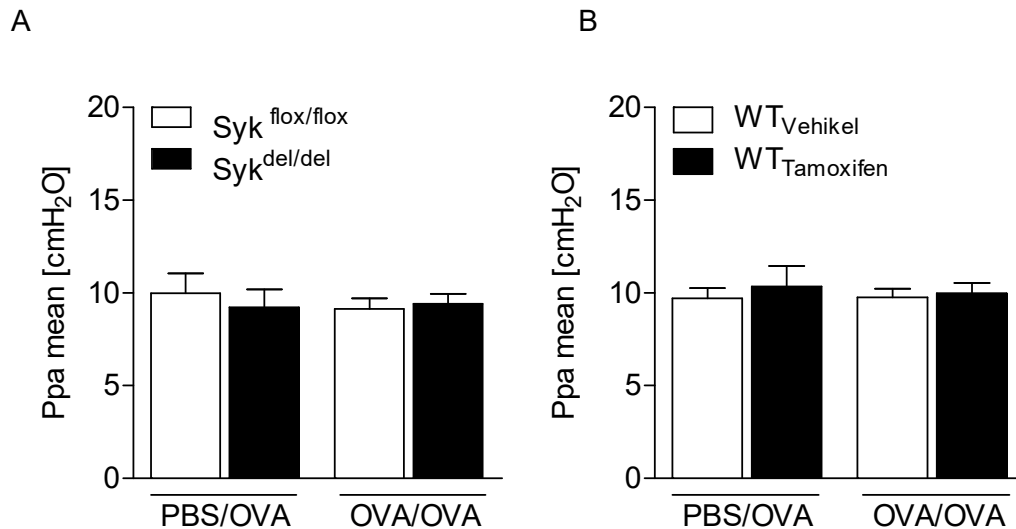


**Abbildung 24: Der Nachweis der Tamoxifen-induzierten Syk-Deletion in Milzen mittels Western Blot-Analyse.**

Den Tieren des induzierbaren Mausstamms ( $\text{Syk}^{\text{flox/flox}}$ ) und den korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäusen wurde an den Tagen 15-19 des Versuchsprotokolls einmal täglich 20 mg/kg Tamoxifen per os appliziert, Kontrolltiere erhielten das Vehikel. Am finalen Versuchstag (Tag 67) wurden die Milzen aller Tiere asserviert und als Ausgangsmaterial für die Western Blot-Analyse eingesetzt. Bei WT-Mäusen konnte unabhängig von der Behandlung stets eine Syk-Proteinbande detektiert werden, ebenso wie bei den Vehikel-behandelten  $\text{Syk}^{\text{flox/flox}}$ -Mäusen. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens ( $\text{Syk}^{\text{del/del}}$ ), infolge dessen bei diesen Tieren keine Syk-Proteinbande nachweisbar war. Der eingesetzte Antikörper war Syk N-19,  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Repräsentative Darstellung von jeweils zwei Proben der  $\text{Syk}^{\text{flox/flox}}$ -,  $\text{Syk}^{\text{del/del}}$ - und WT-Mäuse sowie der Kontrolle.

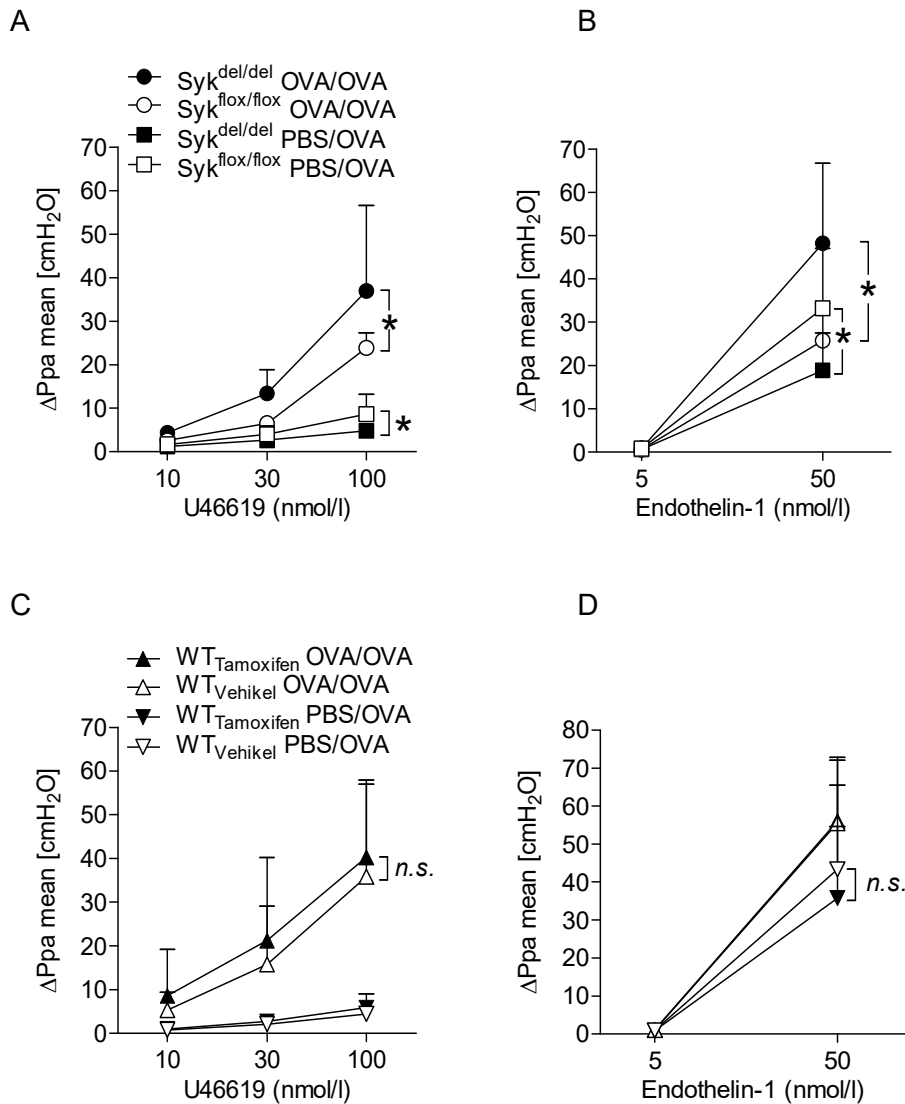
#### 4.4.2 Die Syk-Deletion beeinflusste die Stärke der pulmonalvaskulären Reagibilität in der chronischen pulmonalen $\text{T}_\text{H}2$ -Inflammation

An Tag 67 des Versuchsprotokolls erfolgten die funktionellen Analysen in der IPML und die weitere Probengewinnung. Im IPML-Experiment wurden die Vasokonstriktoren U46619 und Endothelin-1 in aufsteigenden Dosierungen eingesetzt. Der basale Ppa mean war in allen Gruppen vergleichbar (Abbildung 25 A und B). Die Syk-Deletion beeinflusste die Stärke der Gefäßantwort. PBS/OVA-behandelte  $\text{Syk}^{\text{del/del}}$ -Tiere zeigten gegenüber den PBS/OVA-behandelten  $\text{Syk}^{\text{flox/flox}}$ -Tieren eine signifikant geringere pulmonalvaskuläre Reagibilität auf die applizierten vasokonstriktorisches Stimuli (Abbildung 26 A und B). OVA/OVA-behandelte Tiere zeigten aufgrund der chronischen pulmonalen  $\text{T}_\text{H}2$ -Inflammation eine ausgeprägte pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität als Antwort auf die vasokonstriktorisches Stimuli. Dies äußerte sich in einem gegenüber der scheinensensibilisierten Kontrollgruppe erhöhten  $\Delta\text{Ppa}$  mean nach Vasokonstriktor-Applikation. OVA/OVA-behandelte  $\text{Syk}^{\text{del/del}}$ -Mäuse zeigten interessanterweise eine stärkere Hyperreagibilität der pulmonalen Gefäße als OVA/OVA-behandelte  $\text{Syk}^{\text{flox/flox}}$ -Mäuse (Abbildung 26 A und B). Unterschiede zwischen den Tamoxifen- und Vehikel-behandelten WT-Gruppen wurden erwartungsgemäß nicht detektiert (Abbildung 26 C und D).



**Abbildung 25: Der basale pulmonalarterielle Mitteldruck in den Untersuchungsgruppen.**

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) und die korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche systemisch mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert bzw. mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Aluminiumhydroxid scheinensibilisiert. Nach der dritten Sensibilisierung folgte an fünf konsekutiven Tagen die orale Applikation von 20 mg/kg Tamoxifen bzw. Vehikel. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens (Syk<sup>del/del</sup>). Alle Tiere wurden an den Tagen 29, 31, 33, 35 jeweils drei, an den Tagen 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66 jeweils zwei Aerosolexpositionen mit 1 % OVA unterzogen. An Tag 67 erfolgten funktionelle Analysen in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslung. Die Daten zeigen den basalen pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) vor der Applikation aufsteigender Dosisreihen vasokonstriktorischer Stimuli von Syk<sup>flox/flox</sup>- und Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen (A) bzw. Tamoxifen- und Vehikel-behandelten WT-Mäusen (B) mit (OVA/OVA) und ohne (PBS/OVA) pulmonaler T<sub>H</sub>2-Entzündung. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 8-10 (A) bzw. n = 7-9 (B) Tieren.



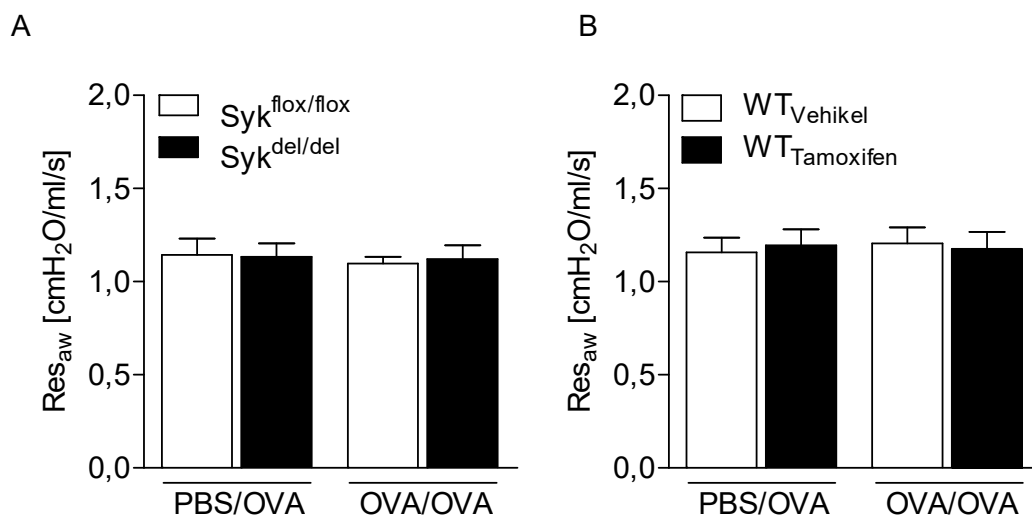
**Abbildung 26: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die pulmoalvaskuläre Reagibilität in der chronischen pulmoalven T<sub>H</sub>2-Inflammation.**

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) und die korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche systemisch mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert bzw. mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Aluminiumhydroxid scheinensibilisiert. Nach der dritten Sensibilisierung folgte an fünf konsekutiven Tagen die orale Applikation von 20 mg/kg Tamoxifen bzw. Vehikel. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens (Syk<sup>del/del</sup>). Alle Tiere wurden an den Tagen 29, 31, 33, 35 jeweils drei, an den Tagen 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66 jeweils zwei Aerosolexpositionen mit 1 % OVA unterzogen. An Tag 67 erfolgten funktionelle Analysen in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge. Die Daten zeigen den pulmoalvaskulären Druckanstieg ( $\Delta$ Ppa mean) von Syk<sup>flox/flox</sup>- und Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen (A, B) bzw. Tamoxifen- und Vehikel-behandelten WT-Mäusen (C, D) mit (OVA/OVA) und ohne (PBS/OVA) pulmoalven T<sub>H</sub>2-Inflammation nach Applikation aufsteigender Dosierungen des Thromboxan-Rezeptor-Agonisten U46619 bzw. Endothelin-1.  $\Delta$ Ppa mean ergab sich aus der Differenz zwischen dem pulmoalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) am Reaktionsmaximum und dem basalen Ppa mean. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 7-10 (A, B) bzw. n = 6-9 (C, D) Tieren. \* P < 0,05; n.s. = nicht signifikant



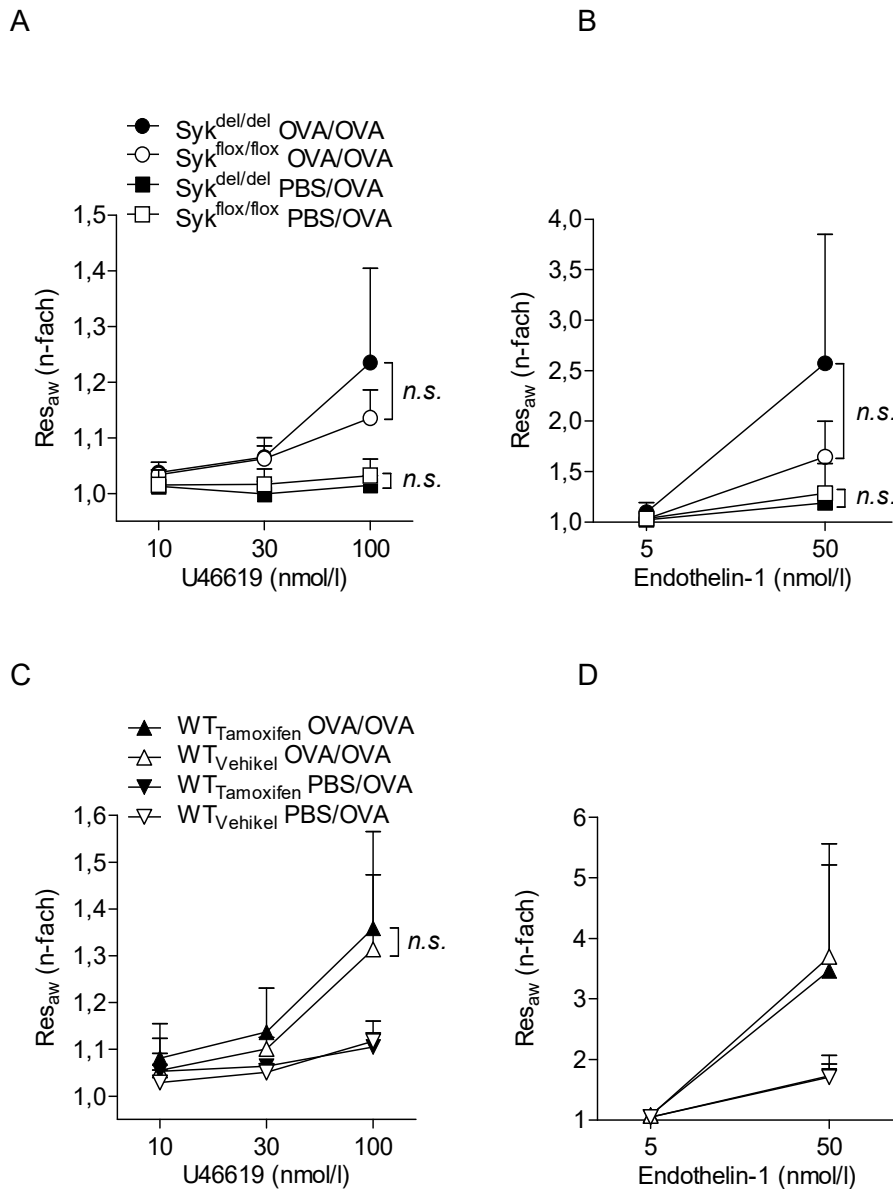
#### 4.4.3 Die Syk-Deletion hatte keinen Einfluss auf die Atemwegsreagibilität in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Entzündung

Zeitgleich mit der Erhebung der vaskulären Daten wurde in der IPML die Reagibilität der Atemwege analysiert. Der basale Atemwegswiderstand war in allen Gruppen vergleichbar (Abbildung 27 A und B). Die n-fache Erhöhung des Atemwegswiderstands  $Res_{aw}$  in Relation zum basalen  $Res_{aw}$  nach Verabreichung eines bronchokonstriktorischen Stimulus diente als Maß für die Atemwegsreagibilität ( $Res_{aw}$  n-fach). OVA/OVA-behandelte Mäuse zeigten eine Atemwegs-Hyperreagibilität (AHR; Abbildung 28 A-D), wobei sich die AHR zwischen den  $Syk^{del/del}$ - und  $Syk^{flox/flox}$ -Tieren nicht signifikant unterschied (Abbildung 28 A und B). Anhand der Wildtyp-Gruppen konnte gezeigt werden, dass die Tamoxifen-Behandlung keinen Einfluss auf die Atemwegsreagibilität hatte (Abbildung 28 C und D).



**Abbildung 27: Der basale Atemwegswiderstand in den Untersuchungsgruppen.**

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms ( $Syk^{flox/flox}$ ) und die korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche systemisch mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert bzw. mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Aluminiumhydroxid scheinensensibilisiert. Nach der dritten Sensibilisierung folgte an fünf konsekutiven Tagen die orale Applikation von 20 mg/kg Tamoxifen bzw. Vehikel. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens ( $Syk^{del/del}$ ). Alle Tiere wurden an den Tagen 29, 31, 33, 35 jeweils drei, an den Tagen 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66 jeweils zwei Aerosolexpositionen mit 1 % OVA unterzogen. An Tag 67 erfolgten funktionelle Analysen in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge. Die Daten zeigen den basalen Atemwegswiderstand ( $Res_{aw}$ ) vor der Applikation aufsteigender Dosisreihen bronchokonstriktorischer Stimuli von  $Syk^{flox/flox}$ - und  $Syk^{del/del}$ -Mäusen (A) bzw. Tamoxifen- und Vehikel-behandelten WT-Mäusen (B) mit (OVA/OVA) und ohne (PBS/OVA) pulmonaler T<sub>H</sub>2-Entzündung. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 8-10 (A) bzw. n = 7-9 (B) Tieren.

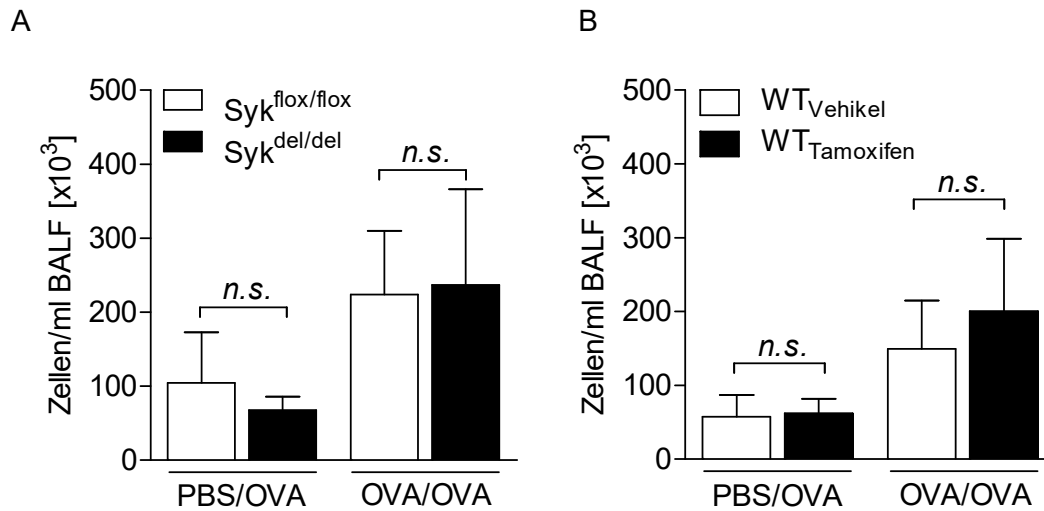


### Abbildung 28: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die Atemwegsreagibilität in der chronischen pulmonalen $T_H2$ -Inflammation.

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms ( $Syk^{flox/flox}$ ) und die korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche systemisch mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert bzw. mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Aluminiumhydroxid scheinensibilisiert. Nach der dritten Sensibilisierung folgte an fünf konsekutiven Tagen die orale Applikation von 20 mg/kg Tamoxifen bzw. Vehikel. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens ( $Syk^{del/del}$ ). Alle Tiere wurden an den Tagen 29, 31, 33, 35 jeweils drei, an den Tagen 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66 jeweils zwei Aerosolexpositionen mit 1 % OVA unterzogen. An Tag 67 erfolgten funktionelle Analysen in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge. Die Daten zeigen die n-fache Erhöhung des Atemwegswiderstands ( $Res_{aw}$ ) in Relation zum basalen  $Res_{aw}$  von  $Syk^{flox/flox}$ - und  $Syk^{del/del}$ -Mäusen (A, B) bzw. Tamoxifen- und Vehikel-behandelten WT-Mäusen (C, D) mit (OVA/OVA) und -ohne (PBS/OVA) pulmonaler  $T_H2$ -Inflammation nach Applikation aufsteigender Dosierungen des Thromboxan-Rezeptor-Agonisten U46619 bzw. Endothelin-1. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von  $n = 7-10$  (A, B) bzw.  $n = 6-9$  (C, D) Tieren. *n.s.* = nicht signifikant

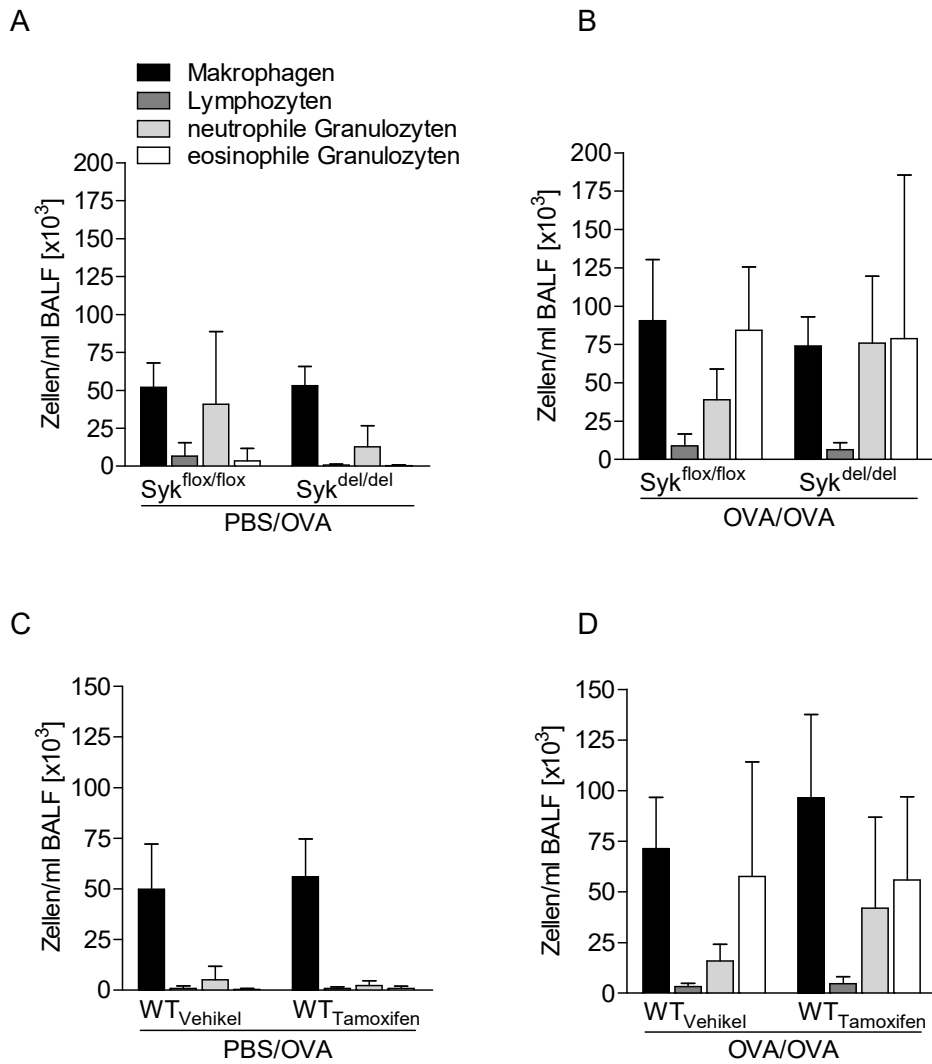
#### **4.4.4 Die Syk-Deletion hatte keinen Einfluss auf die pulmonale Leukozytenrek- rutierung in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation**

An Tag 67 des Versuchsprotokolls erfolgte im Anschluss an das IPML-Experiment die Gewinnung bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) aus der linken Lunge. Es wurde die Gesamtzellzahl pro ml BALF bestimmt und eine histologische Differenzierung der Leukozyten durchgeführt. Die Gesamtzellzahl pro ml BALF war in den OVA/OVA-behandelten Gruppen signifikant höher, als in den PBS/OVA-behandelten Kontrollgruppen. Ein Einfluss der Syk-Deletion auf die Gesamtzellzahl konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 29 A und B). Die Leukozyten-Differenzierung in der BALF zeigte in PBS/OVA-Gruppen Makrophagen als vorherrschenden Zelltyp, wohingegen in den OVA/OVA-Gruppen neben Makrophagen verstärkt eosinophile und neutrophile Granulozyten nachweisbar waren. Ein Einfluss der Syk-Deletion auf die pulmonale Leukozytenrekutierung war nicht nachweisbar (Abbildung 30 A und B). Ein potenzieller Tamoxifen-Effekt wurde durch die Ergebnisse der Analysen der Wildtyp-Gruppen ausgeschlossen (Abbildung 30 C und D).



**Abbildung 29: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die Gesamtzellzahl pro ml BALF in der chronischen pulmonalen T<sub>H2</sub>-Inflammation.**

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) und die korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche systemisch mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert bzw. mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Aluminiumhydroxid scheinensibilisiert. Nach der dritten Sensibilisierung folgte an fünf konsekutiven Tagen die orale Applikation von 20 mg/kg Tamoxifen bzw. Vehikel. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens (Syk<sup>del/del</sup>). Alle Tiere wurden an den Tagen 29, 31, 33, 35 jeweils drei, an den Tagen 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66 jeweils zwei Aerosolexpositionen mit 1 % OVA unterzogen. An Tag 67 erfolgten funktionelle Analysen in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML). Im Anschluss an das IPML-Experiment erfolgte die Gewinnung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) aus der linken Lunge. Die Daten zeigen die Gesamtzellzahl pro ml BALF von Syk<sup>flox/flox</sup>- und Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen (A) bzw. Tamoxifen- und Vehikel-behandelten WT-Mäusen (B) mit (OVA/OVA) und ohne (PBS/OVA) pulmonaler T<sub>H2</sub>-Inflammation. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 9-11 (A) bzw. n = 6-9 (B) Tieren. *n.s.* = nicht signifikant

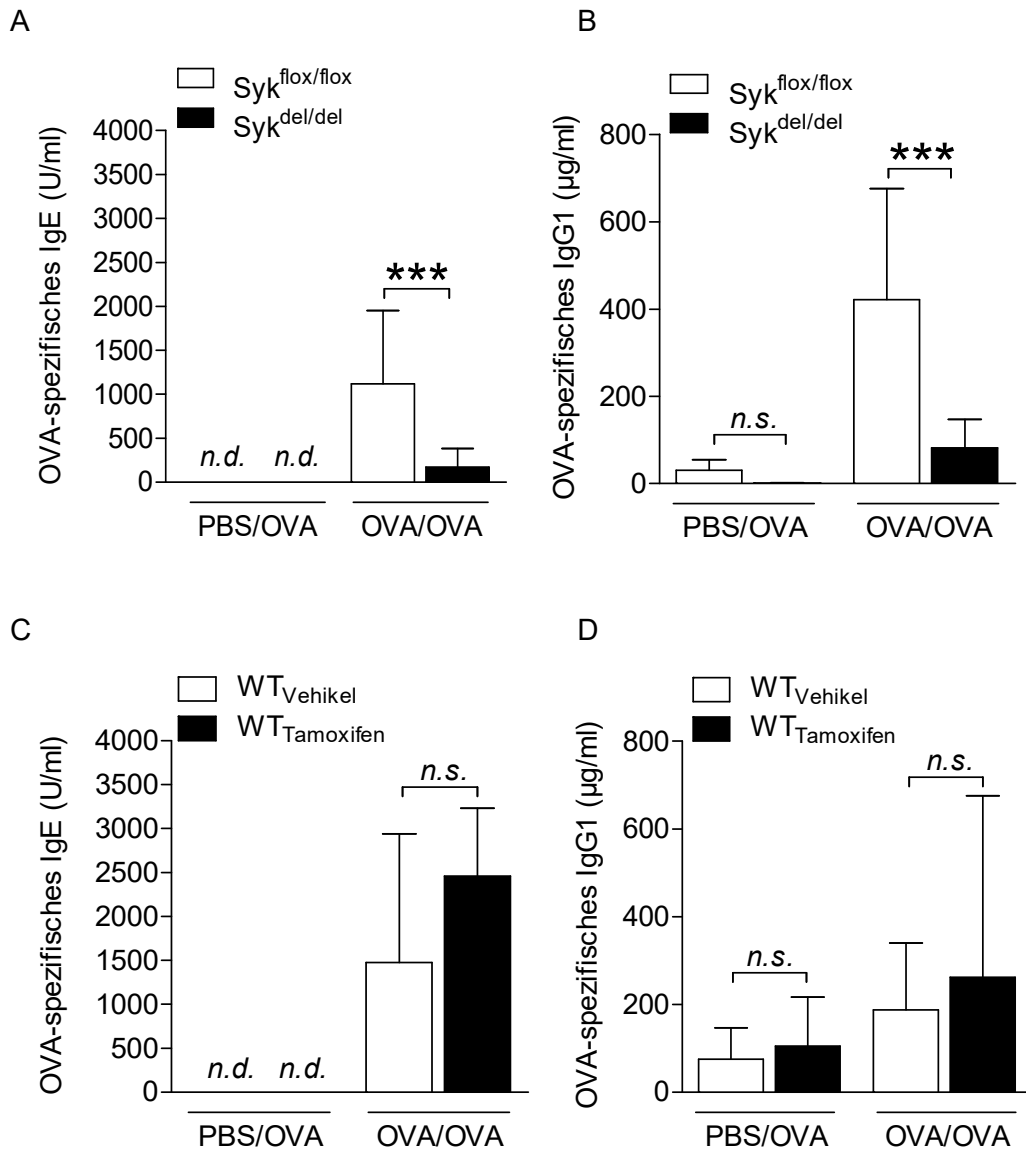


**Abbildung 30: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die Leukozytenrekrutierung in der BALF in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation.**

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) und die korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche systemisch mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert bzw. mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Aluminiumhydroxid scheinensibilisiert. Nach der dritten Sensibilisierung folgte an fünf konsekutiven Tagen die orale Applikation von 20 mg/kg Tamoxifen bzw. Vehikel. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens (Syk<sup>del/del</sup>). Alle Tiere wurden an den Tagen 29, 31, 33, 35 jeweils drei, an den Tagen 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66 jeweils zwei Aerosolexpositionen mit 1 % OVA unterzogen. An Tag 67 erfolgten funktionelle Analysen in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML). Im Anschluss an das IPML-Experiment erfolgte die Gewinnung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) aus der linken Lunge. Die Daten zeigen die Leukozyten-Populationen in der BALF von Syk<sup>flox/flox</sup>- und Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen (A, B) bzw. Tamoxifen- und Vehikel-behandelten WT-Mäusen (C, D) mit (OVA/OVA) und ohne (PBS/OVA) pulmonaler T<sub>H</sub>2-Inflammation. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 9-11 (A, B) bzw. n = 6-9 (C, D) Tieren.

#### 4.4.5 Die Syk-Deletion reduzierte die humorale Immunantwort in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation

Die T<sub>H</sub>2-Inflammation durch repetitive systemische Sensibilisierungen und Atemwegs-Expositionen mit OVA geht einher mit einer humoralen Immunantwort mit Bildung OVA-spezifischer Immunglobuline (Ig) E und IgG1. Aus den am finalen Versuchstag gewonnenen Plasmaproben wurden die OVA-spezifischen IgE- und IgG1-Spiegel mittels ELISA bestimmt. OVA/OVA-behandelte Versuchsgruppen wiesen dabei hohe Plasmaspiegel der beiden untersuchten Immunglobuline auf, PBS/OVA-behandelte Kontrollgruppen zeigten Plasmaspiegel im nicht-detektierbaren bis gering konzentrierten Bereich (Abbildung 31 A-D). Interessanterweise bedingte die Syk-Deletion eine verminderte humorale Immunantwort. Die OVA-spezifischen IgE- und IgG1-Plasmaspiegel der OVA/OVA-behandelten Syk<sup>del/del</sup>-Gruppe waren deutlich geringer als die der OVA/OVA-behandelten Syk<sup>flox/flox</sup>-Gruppe (Abbildung 31 A und B). Ein Tamoxifen-abhängiger Effekt konnte auf Grundlage der Ergebnisse der Analyse der Wildtyp-Gruppen ausgeschlossen werden (Abbildung 31 C und D).



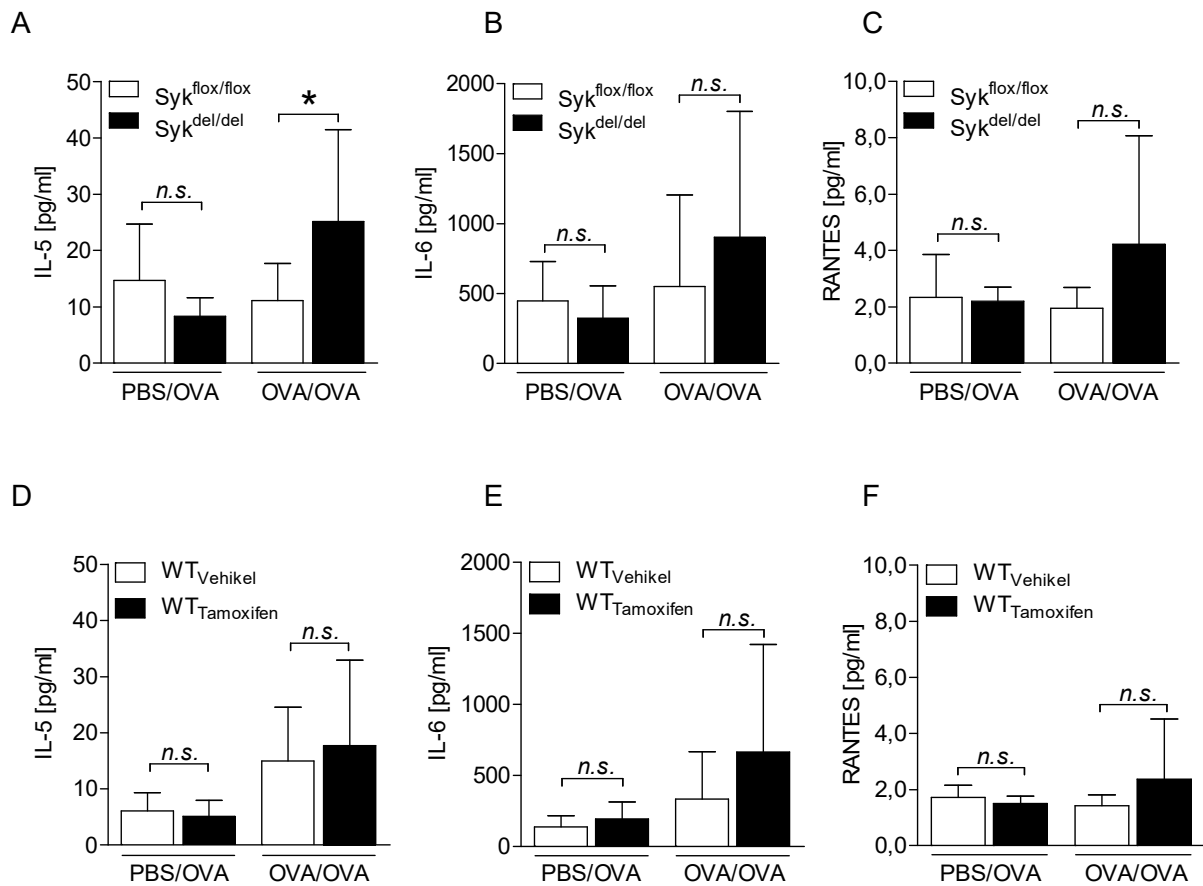
**Abbildung 31: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die Bildung Ovalbumin-spezifischer Immunglobuline in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Infektion.**

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) und die korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche systemisch mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert bzw. mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Aluminiumhydroxid scheinensensibilisiert. Nach der dritten Sensibilisierung folgte an fünf konsekutiven Tagen die orale Applikation von 20 mg/kg Tamoxifen bzw. Vehikel. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens (Syk<sup>del/del</sup>). Alle Tiere wurden an den Tagen 29, 31, 33, 35 jeweils drei, an den Tagen 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66 jeweils zwei Aerosolexpositionen mit 1 % OVA unterzogen. Die Gewinnung der Plasmaproben erfolgte an Tag 67. Die Daten zeigen die OVA-spezifischen Immunglobulin (Ig) E- bzw. IgG1-Spiegel im Plasma von Syk<sup>flox/flox</sup>- und Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen (A, B) bzw. Tamoxifen- und Vehikel-behandelten WT-Mäusen (C, D) mit (OVA/OVA) und ohne (PBS/OVA) pulmonaler T<sub>H</sub>2-Infektion. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 7-9 (A, B) bzw. n = 6-7 (C, D) Tieren. Das Detektionslimit lag bei 1,95 U/ml (A, C) bzw. 0,01 µg/ml (B, D). \*\*\* P < 0,001; n.d. = nicht detektierbar, n.s. = nicht signifikant

#### **4.4.6 Die Syk-Deletion erhöhte die Interleukin-5-Expression in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation**

Im Anschluss an das IPML-Experiment erfolgte am finalen Versuchstag die Gewinnung der BALF aus der linken Lunge. Aus den Überständen der BALF wurden mittels Multiplex-Analyse die Zytokine IL-5 und IL-6 bzw. das Chemokin RANTES bestimmt. OVA/OVA-behandelte Syk<sup>del/del</sup>-Mäuse wiesen im Gegensatz zu OVA/OVA-behandelten Syk<sup>fllox/fllox</sup>-Mäusen deutlich höhere IL-5-Spiegel in der BALF auf (Abbildung 32 A). Die Untersuchungen erbrachten keinen Hinweis auf einen Einfluss der Syk-Deletion auf die Expression von IL-6 bzw. RANTES (Abbildung 32 B und C). Die Analyse der Wildtyp-Gruppen ergab keinen Einfluss der Tamoxifen-Behandlung auf die Zytokin-Spiegel in der BALF (Abbildung 32 D-F).



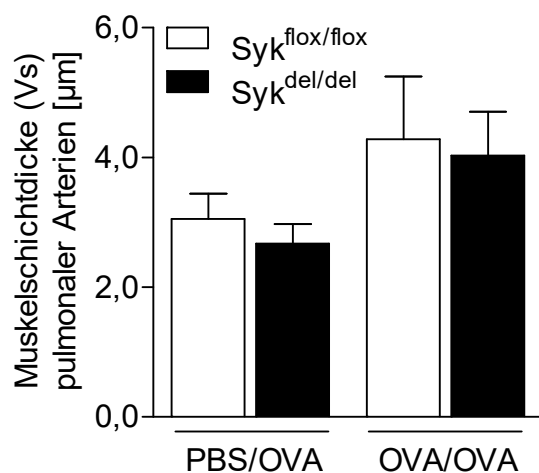


**Abbildung 32: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die IL-5-, IL-6- und RANTES-Spiegel in der BALF in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation.**

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) und die korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche systemisch mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert bzw. mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Aluminiumhydroxid scheinensibilisiert. Nach der dritten Sensibilisierung folgte an fünf konsekutiven Tagen die orale Applikation von 20 mg/kg Tamoxifen bzw. Vehikel. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens (Syk<sup>del/del</sup>). Alle Tiere wurden an den Tagen 29, 31, 33, 35 jeweils drei, an den Tagen 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66 jeweils zwei Aerosolexpositionen mit 1 % OVA unterzogen. An Tag 67 erfolgten funktionelle Analysen in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge. Die BALF wurde im Anschluss an die Untersuchung aus der linken Lungenhälfte gewonnen. Es wurden mittels Multiplex-Analyse Interleukin (IL)-5 (A, D), IL-6 (B, E) sowie *Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES; C, F) in den Überständen der BALF von Syk<sup>flox/flox</sup>- und Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen (A-C) bzw. Tamoxifen- und Vehikel-behandelten WT-Mäusen (D-F) mit (OVA/OVA) und ohne (PBS/OVA) pulmonaler T<sub>H</sub>2-Inflammation bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 6-9 (A-C) bzw. n = 5-7 (D-F) Tieren. Das Detektionslimit lag bei 0,64 pg/ml (A), 0,29 pg/ml (B), 0,68 pg/ml (C), 3,00 pg/ml (D), 1,09 pg/ml (E) bzw. 0,69 pg/ml (F). \* P < 0,05; n.s. = nicht signifikant

#### 4.4.7 Die Syk-Deletion hatte keinen Einfluss auf das pulmonalarterielle *Remodeling* in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation

Durch stereologische Analyse des am 67. Protokolltag asservierten und gefärbten Lungengewebes der Syk<sup>flox/flox</sup>- bzw. Syk<sup>del/del</sup>-Mäuse wurde das T<sub>H</sub>2-assoziierte pulmonalarterielle *Remodeling* quantifiziert. Die repetitiven systemischen OVA-Sensibilisierungen und anschließenden OVA-Atemwegsexpositionen hatten im Gegensatz zu den PBS-Scheinsensibilisierungen eine Zunahme der Muskelschicht pulmonaler Arterien um ca. 40-50 % zur Folge. Die Syk-Deletion hatte auf das pulmonalarterielle *Remodeling* jedoch keinen Einfluss (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die Muskelschichtdicke pulmonaler Arterien in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation.**

Die Tiere des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche systemisch mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert bzw. mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Aluminiumhydroxid scheinensensibilisiert. Nach der dritten Sensibilisierung folgte an fünf konsekutiven Tagen die orale Applikation von 20 mg/kg Tamoxifen bzw. Vehikel. Die Tamoxifen-Behandlung des induzierbaren Mausstamms führte zu einer Deletion des Syk-Gens (Syk<sup>del/del</sup>). Alle Tiere wurden an den Tagen 29, 31, 33, 35 jeweils drei, an den Tagen 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 und 66 jeweils zwei Aerosolexpositionen mit 1 % OVA unterzogen. An Tag 67 erfolgten funktionelle Analysen in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslung. Das Lungengewebe wurde im Anschluss asserviert und das *α-smooth muscle actin* immunhistochemisch zur Darstellung der pulmonalen Gefäße gefärbt. Das gefärbte Lungengewebe wurde dann mittels stereologischer Analysen hinsichtlich des pulmonalarteriellen *Remodeling* untersucht. Die Daten zeigen die Muskelschichtdicke (Vs) pulmonaler Arterien von Syk<sup>flox/flox</sup>- und Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen mit (OVA/OVA) und ohne (PBS/OVA) pulmonaler T<sub>H</sub>2-Inflammation. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von n = 3 Tieren.

## 5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle der Milztyrosinkinase (Syk) in der pulmonalvaskulären und bronchialen Reagibilität sowie in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Syk ein potenzielles Zielmolekül für therapeutische Interventionen bei PAH ebenso wie bei Asthma bronchiale sein könnte.

Durch Immunfluoreszenz-Analysen wurde gezeigt, dass Syk in den glatten Muskelzellen humaner und muriner pulmonaler Blutgefäße und Bronchien exprimiert wird. Die pharmakologische Inhibierung von Syk mit dem Inhibitor BAY 61-3606 führte in isoliert perfundierten und ventilierten Lungen naiver Mäuse zur Reduktion der pulmonalvaskulären und bronchialen Reagibilität nach Einsatz von klinisch relevanten Vaso- und Bronchokonstriktoren. Ebenso wurde gezeigt, dass die Inhibierung von Syk in präkonstringierten Lungengefäßen und Bronchien eine rasche und reversible Vaso- bzw. Bronchodilatation hervorrief.

Gezielte Versuchsreihen zur Charakterisierung der Syk-vermittelten Signaltransduktion lieferten Hinweise darauf, dass Syk die Kontraktion glatter Muskelzellen in den Atemwegen via Rho-Kinase und p38 MAPK und in den pulmonalen Gefäßen via p38 MAPK modulieren könnte.

Die Untersuchungen zur Rolle von Syk in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation wurden mit Mäusen durchgeführt, in denen eine Syk-Deletion induziert wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Syk-Deletion in PBS-scheinsensibilisierten Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen zu einer reduzierten pulmonalvaskulären Reagibilität führte, was mit den Ergebnissen der pharmakologischen Syk-Inhibierung in naiven Mäusen im Einklang war.

OVA-sensibilisierte und OVA-atemwegsexponierte Syk<sup>del/del</sup>-Tiere zeigten eine stärkere pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität als Syk-exprimierende Tiere. Syk beeinflusste zudem die Bildung der OVA-spezifischen Immunglobuline E und G1, deren Plasmalevel in OVA/OVA-behandelten Syk<sup>del/del</sup>-Tieren stark reduziert waren. Einen Einfluss auf die Zytokin-Spiegel in der bronchoalveolären Lavage nahm Syk hinsichtlich Interleukin-5, welches in OVA/OVA-behandelten Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen im Vergleich zu den OVA/OVA-behandelten Syk-exprimierenden Mäusen erhöht war.

Die pulmonale Syk-Expression wurde mittels Immunfluoreszenz-Analysen untersucht. Erstmals wurde in dieser Arbeit auch humanes Lungengewebe hinsichtlich der Syk-Distribution analysiert, wobei sich im Vergleich zu murinem Lungengewebe ein ähnliches Verteilungsmuster zeigte. In den Geweben beider Spezies war Syk mit dem  $\alpha$ -Aktin glatter bronchialer und pulmonalvaskulärer Muskelzellen kolokalisiert. Aufgrund der detektierten Syk-Expression in den glatten Muskelzellen scheint eine Beeinflussung der Muskelkontraktion durch Syk möglich. Darüber hinaus fand sich eine Syk-Expression in den Atemwegs-Epithelzellen, wie bereits zuvor in der murinen Lunge gezeigt werden konnte (Penton et al. 2013, Duta et al. 2006).

Der Syk-Inhibitor BAY 61-3606 wurde in der IPML eingesetzt, um potenzielle protektive Effekte auf die vaskuläre und bronchiale Reagibilität zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Syk-Inhibition mit BAY 61-3606 in den isolierten Lungen naiver Mäuse zu einer verminderten pulmonalvaskulären und bronchialen Reagibilität nach Stimulation mit klinisch relevanten konstriktorischen Substanzen führte.

Eingesetzt wurden Stimuli, die in der Pathogenese der PAH oder des Asthma bronchiale von zentraler Relevanz sind. Vasokonstriktorische und proliferative Effekte auf vaskuläre glatte Muskelzellen wurden für Endothelin-1 (Sakai S et al. 1996, Seo et al. 1994, Giaid et al. 1993), Angiotensin II (Montezano et al. 2014, Yaghini et al. 2007), Sphingosin-1-Phosphat (Chen et al. 2014, Haberberger et al. 2009), Serotonin (Eddahibi et al. 2001, Herve et al. 1995) und Thromboxan-A<sub>2</sub> (Jones et al. 1995, Christman et al. 1992) beschrieben. Endothelin-1 wurde im Serum von Patienten mit PAH vermehrt nachgewiesen (Giaid et al. 1993), zudem haben Lee et al. die Endothelin-1-induzierte Vasokonstriktion mit einem Signalweg verknüpft, der Syk involvierte (Lee HM et al. 2007). Yang et al. und Mugabe et al. beschrieben außerdem, dass sowohl Sphingosin-1-Phosphat als auch Angiotensin II die Phosphorylierung von Syk in vaskulären glatten Muskelzellen induzierten (Mugabe et al. 2010, Yang et al. 1996).

Für die Pathogenese von Asthma bronchiale wurde die Bedeutung der bronchokonstriktorisch wirksamen Mediatoren Serotonin (Lechin et al. 1996), Angiotensin II (Millar et al. 1994) und Sphingosin-1-Phosphat (Rosenfeldt et al. 2003) beschrieben. So wurden bei Patienten mit Asthma bronchiale erhöhte Serotonin- und Angiotensin II-Plasmaspiegel nachgewiesen (Lechin et al. 1996, Millar et al. 1994), daneben detektierten Ammit et al. erhöhte Sphingosin-1-Phosphat-Spiegel in der BALF von Asthma bronchiale-Patienten infolge einer Allergen-Exposition (Ammit et al. 2001). Außerdem zeigten die Autoren, dass Sphingosin-1-Phosphat die Proliferation bronchialer glatter Muskelzellen reguliert (Ammit et al. 2001).

Der Bronchokonstriktor Methacholin ist in der klinischen Asthma bronchiale-Diagnostik etabliert und wird genutzt, um die Atemwegsreagibilität bei Patienten zu evaluieren (Sumino et al. 2012).

Unabhängig von der Applikation konstriktorischer Substanzen wurde in dieser Arbeit auch die Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion durch den Syk-Inhibitor BAY 61-3606 reduziert. Die HPV tritt im Pulmonalkreislauf reflektorisch als Reaktion pulmonaler Gefäße auf eine lokale Hypoxie auf (van Gestel et al. 2014, Littler et al. 2003, Weir et al. 1995) und bedingt bei lokalisierten Ventilationsstörungen eine verminderte Perfusion unzureichend belüfteter Lungenbereiche (van Gestel et al. 2014, Littler et al. 2003, Schmidt et al. 1995, Weir et al. 1995, Euler et al. 1946). Durch diese Umverteilung der Perfusion wird ein optimaler Gasaustausch sichergestellt (van Gestel et al. 2014, Littler et al. 2003, Schmidt et al. 1995, Weir et al. 1995).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass Syk für die pulmonalvaskuläre und bronchiale Kontraktilität von Bedeutung ist. Studien anderer Autoren demonstrierten vergleichbare Resultate. So untersuchten Wang et al. die Effekte einer genomischen Syk-Deletion auf die Atemwegsreagibilität unabhängig von einer zugrunde liegenden Inflammation und zeigten, dass die Methacholin-induzierte Atemwegskonstriktion in Syk-deletierten Mäusen reduziert war (Wang X et al. 2015). Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit zur Atemwegsreagibilität naiver Mäuse nach Syk-Inhibition.

Lee et al. demonstrierten konsistent zu der vorliegenden Arbeit für die systemische Zirkulation in Aorten-Strips von Ratten, dass der Einsatz des Syk-Inhibitors Piceatannol die Endothelin-1-induzierte Vasokonstriktion verminderte (Lee HM et al. 2007). Jedoch wurde für Piceatannol ein unspezifisches Wirkprofil nachgewiesen (Lai et al. 2003, Law et al. 1999), sodass diese Effekte kritisch hinterfragt werden müssen.

Für den häufig verwendeten und als selektiv geltenden Syk-Inhibitor BAY 61-3606 wurde von Nakashima et al. beschrieben, dass BAY 61-3606 neben Syk (Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_i$ ) = 7,5 nmol/l) in höheren Konzentrationen auch PKC $\alpha$  ( $K_i$  = 90 nmol/l) inhibiert (Nakashima et al. 2004). Je niedriger die  $K_i$  eines Inhibitors ist, desto stärker bindet er an sein Substrat (Shaqura 2004). Um die potenzielle Beeinflussung einer PKC $\alpha$ -Inhibition auf die in dieser Arbeit beobachteten BAY 61-3606-vermittelten Effekte auszuschließen, wurde BAY 61-3606 in isoliert perfundierten Lungen naiver PKC $\alpha$ -defizienter Mäuse und korrespondierender Wildtyp-Mäuse reevaluiert. Auch in PKC $\alpha$ -defizienten Mäusen induzierte BAY 61-3606 eine verminderte pulmonalvaskuläre und bronchiale Reagibilität. Die BAY 61-3606-induzierten Effekte scheinen demnach Syk-spezifisch zu sein.

Um die Möglichkeit eines Inhibitor-spezifischen Effektes von BAY 61-3606 auszuschließen, erfolgte die Analyse des Syk-Inhibitors R406 in der U46619-induzierten Vasokonstriktion. Es

zeigte sich, dass R406 ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der pulmonalvaskulären Reagibilität bei naiven Mäusen führte und der vorher beobachtete Effekt mit hoher Wahrscheinlichkeit Syk-spezifisch, aber nicht BAY 61-3606-spezifisch zu sein scheint.

Mittels pharmakologischer Inhibition von Syk war es auch möglich, konstringierte pulmonale Gefäße und Bronchien zu dilatieren. Die durch den Thromboxan-Rezeptor-Agonisten U46619 induzierte Konstriktion pulmonaler Gefäße imitierte hierbei die PAH-assoziierte pulmonale Vasokonstriktion, die durch eine erhöhte Freisetzung vasokonstriktorisch wirksamer Substanzen bedingt wird. Analog hierzu wurde mittels Methacholin die Asthma bronchiale-assoziierte Bronchokonstriktion imitiert. Da für Atemwegs-Epithelzellen bereits eine Verbindung zwischen Syk und dem NO-Synthase/NO-System gezeigt werden konnte (Ulanova et al. 2006), wurde durch Einsatz des NO-Synthase-Hemmers L-NAME untersucht, ob die Syk-Inhibition durch Modulation des NO-Systems zur Dilatation der Gefäße bzw. Bronchien führte. NO wird von dem Enzym NO-Synthase aus L-Arginin gebildet und führt über die Aktivierung der Guanylatzyklase zu einem Anstieg von cGMP, welches zu einem Abfall des intrazellulären  $Ca^{2+}$  und in der Folge zu einer Muskelrelaxation führt (Siegenthaler et al. 2006). Da sich der BAY 61-3606-vermittelte, dilatatorische Effekt auch bei inhibierter NO-Synthase einstellte, konnte eine direkte Verbindung des NO- und Syk-Signalwegs für die pulmonalvaskulären und bronchialen glatten Muskelzellen ausgeschlossen werden.

Die vorliegenden Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, dass Syk eine entscheidende Rolle in der Reagibilität pulmonaler Gefäße und der Atemwege spielt. Die Signalwege, über welche Syk die konstringierenden Effekte vermittelt, sind jedoch unbekannt.

Für einige Zell- und Rezeptortypen ist die intrazelluläre Signaltransduktion unter Beteiligung von Syk bereits untersucht. So wurde beispielsweise für die Immunrezeptoren FcεRI und FcγR eine Syk-Beteiligung nachgewiesen (Yamamoto et al. 2003). Syk kann über zwei SH2-Domänen an phosphorylierte ITAM von Fc-Rezeptoren sowie B- und T-Zell-Rezeptoren binden, wodurch Syk aktiviert wird (Lowell 2011, Futterer et al. 1998). In der Folge phosphoryliert Syk verschiedene Adapterproteine, welche weitere Enzyme bzw. *second messenger* aktivieren (Kaur et al. 2013, Lowell 2011, Zhang et al. 2010, Kytтары et al. 2007, Crowley et al. 1997). Die von Syk phosphorylierten Substrate aktivieren beispielsweise Proteinkinasen wie MAPK, Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinasen) oder Phospholipase Cγ, wodurch die intrazelluläre Signalübertragung fortgesetzt wird (Kaur et al. 2013, Lowell 2011). Auch die Interaktion von Syk mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurde beispielsweise für neutrophile Granulozyten oder B-Zellen beschrieben (Subramanian et al. 2014, Futosi et al. 2013). Auf Grundlage der aktuellen Ergebnisse wurde eine Beteiligung von Syk an der intrazellulären Signalkaskade, die zur Kontraktion glatter Muskelzellen in Bronchien und pulmonalen Gefäßen führt, hypothetisiert. Die  $Ca^{2+}$ -abhängige Kontraktion glatter Muskelzellen kann

nach gegenwärtigem Kenntnisstand über drei Wege erfolgen: Einerseits über die elektromechanische Kopplung, bei der durch Aktionspotenziale oder andauernde Depolarisation der Zellmembran spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geöffnet werden (Vaupel et al. 2007), zum anderen über rezeptorgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die nach Bindung ihres entsprechenden Agonisten öffnen (Vaupel et al. 2007), und schließlich kann eine mechanische Dehnung zur Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führen (Vaupel et al. 2007). Das intrazellulär freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an Calmodulin (Somlyo et al. 1994). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex interagiert mit dem Enzym Myosin-leichte-Kette-Kinase (MLCK), was zu einer Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins führt (Somlyo et al. 1994). Daraufhin wird die Myosin-gebundene ATPase zur Aktivierung durch Aktin frei und es kommt zur Kontraktion (Somlyo et al. 1994). Myosin wird durch die Myosin-leichte-Kette-Phosphatase (MLCP) dephosphoryliert und dadurch inaktiviert, was zur Relaxation führt (Somlyo et al. 1994).

In einer noch unveröffentlichten Studie untersuchte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Kübler (*The Keenan Research Centre for Biomedical Science of St. Michael's Hospital, Departments of Surgery and Physiology, University of Toronto*) die Frage, ob Syk den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen reguliert. Unter Einsatz der vasokonstriktorisches Stimuli Angiotensin II und U46619 zeigte sich, dass der Syk-Inhibitor BAY 61-3606 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) weder den Angiotensin II- noch den U46619-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx beeinflusste.

Neben der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige glatte Muskelzellkontraktionen beschrieben, bei denen die Aktivierung der MLCP eine Rolle spielt (Somlyo et al. 1994, Stull et al. 1991). MLCP wird durch die GTP-abhängige Rho-Kinase und die Proteinkinase C gehemmt (Wright DB et al. 2013). Beide Kinasen können auf diesem Wege Kontraktionen der glatten Muskulatur auslösen (Puetz et al. 2009, Kimura et al. 1996).

Rho-Kinase wird in glatten Muskelzellen nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch die GTPase RhoA aktiviert (Kimura et al. 1996, Matsui et al. 1996) und interagiert unter anderem mit der p38 MAPK (Nwariaku et al. 2003) und *extracellular signal regulated protein kinase* (ERK 1/2 oder p42/p44; Liu Y et al. 2004). Rho-Kinase induziert einerseits durch Aktivierung der *myosin binding subunit* (MBS bzw. MYPT1) die Hemmung der MLCP, wodurch es zur Kontraktion glatter Muskelzellen kommt (Ward et al. 2004, Kimura et al. 1996). Andererseits phosphoryliert Rho-Kinase die Myosin-leichte-Kette (MLC), was *in vitro* die Aktin-Aktivierung der Myosin-gebundenen ATPase ermöglichte (Kureishi et al. 1997, Amano et al. 1996). Es ist zusätzlich bereits beschrieben worden, dass die Kontraktion glatter Muskelzellen der Atemwege ebenfalls durch Rho-Kinase mediiert wird (Schaafsma et al. 2008, Gosens et al. 2004, Rosenfeldt et al. 2003).

Von der PKC existieren verschiedene Isoenzyme, von denen in glatten Muskelzellen hauptsächlich die Isoenzyme  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\delta$  und  $\zeta$  exprimiert sind (Littler et al. 2003, Walsh et al.

1996). An der Aktivierung der Isoenzyme sind, als Antwort auf verschiedene kontraktile Stimuli, Phospholipide,  $\text{Ca}^{2+}$  und/oder 1,2-Diacylglycerin (DAG) beteiligt (Balendran et al. 2000). Die Kontraktion der glatten Muskelzellen wird nach Aktivierung der PKC über eine Inhibition von Kalium-Kanälen, eine PKC-abhängige Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, die Hemmung der MLCP oder eine Phosphorylierung der MLC induziert (Wright DB et al. 2013, Ward et al. 2004, Fulginiti et al. 1993).

Ward et al. postulierten, dass Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen bei der Aktivierung von Rho-Kinase eine Rolle spielen (Ward et al. 2004). Zudem vermuteten Abe et al. für Tyrosinkinasen eine Funktion in der MLCP-Aktivierung. Die Autoren führten Untersuchungen zum dilatativen Potenzial verschiedener Tyrosinkinase-Inhibitoren in isolierten Pulmonalarterien von Ratten durch und zeigten, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib die U46619-induzierte Kontraktion der Pulmonalarterien aufhob (Abe et al. 2011). Abe et al. hypothesierten, dass dies Resultat einer Aktivierung der MLCP war (Abe et al. 2011). Die Autoren zeigten in diesem Zusammenhang mittels Western Blot-Analyse, dass Imatinib die U46619-induzierte gesteigerte Phosphorylierung der MYPT1 und der MLC signifikant reduzierte (Abe et al. 2011). Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Syk könnte demnach als regulatorische Einheit an der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt sein. Die potenzielle Modulation der dafür relevanten Signalwege durch Syk wurde im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* mittels spezifischer Inhibitoren von Rho-Kinase und PKC untersucht. In isoliert perfundierten und ventilierten Mauslungen wurden dabei mittels simultaner Inhibition von Rho-Kinase und Syk bzw. PKC und Syk im Vergleich mit der singulären Hemmung des jeweiligen Enzyms die Effekte auf die Serotonin-induzierte vaskuläre und bronchiale Reagibilität analysiert.

In den Gefäßen führte die alleinige Hemmung von Rho-Kinase, PKC bzw. Syk zu einer reduzierten Reagibilität. Die kombinierte Inhibition von Rho-Kinase und Syk resultierte in einem additiven Effekt, ebenso wie die analog untersuchte simultane Inhibition von PKC und Syk. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Syk die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen nicht bzw. nicht ausschließlich über Rho-Kinase- oder PKC-vermittelte Signalwege modulierte. Für die Bronchokonstriktion ergaben sich interessanterweise Hinweise darauf, dass Syk in die Signalkette der Rho-Kinase eingebunden sein könnte. Die Atemwegsreagibilität nach Applikation von Serotonin war bei simultaner Hemmung von Rho-Kinase und Syk vergleichbar mit der singulären Inhibition der Rho-Kinase. Dieses Ergebnis könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um die potenzielle Verknüpfung beider Enzyme zu analysieren. Für die PKC ergaben sich in den Atemwegen additive Effekte bei der kombinierten Enzymhemmung.

Weitere Kinasen, welche in Verbindung mit Syk eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Kontraktion glatter Muskelzellen spielen könnten, sind MAPK, wie die p38 MAPK und



ERK 1/2. Von verschiedenen Autoren wurde bereits ein enger Zusammenhang zwischen der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion glatter Muskelzellen und MAPK hergestellt (Ward et al. 2004, Kwon et al. 2003, Dessy et al. 1998). Lee et al. zeigten beispielsweise, dass die Stimulation von Aorten-Strips von Ratten mit Endothelin-1 zu einer Zunahme phosphorylierter p38 MAPK führte (Lee HM et al. 2007). Diese Phosphorylierung konnte durch den Syk-Inhibitor Piceatannol reduziert werden (Lee HM et al. 2007). Von den Autoren wurde ebenfalls gezeigt, dass Endothelin-1 zur Phosphorylierung von ERK 1/2 führte. Eine Inhibierung von Syk durch Piceatannol hatte darauf allerdings keinen Einfluss. Für die p38 MAPK wurde außerdem eine relevante Rolle in der Vermittlung der Bronchokonstriktion beschrieben (Kim SR et al. 2012, Nath et al. 2006, Schnyder-Candrian et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Serotonin-induzierte vaskuläre Kontraktilität bei alleiniger Hemmung der p38 MAPK und bei simultaner Inhibition von Syk und p38 MAPK untersucht. Die jeweilige singuläre Inhibition der p38 MAPK bzw. von Syk resultierte in einer reduzierten pulmonalvaskulären Reagibilität. Die kombinierte Inhibition von Syk und p38 MAPK rief im Vergleich mit der singulären Syk-Inhibition ähnliche Effekte auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität hervor. Diese Ergebnisse deuten auf einen in Teilen verknüpften Signalweg von Syk und p38 MAPK hin, was durch weiterführende Untersuchungen bestätigt werden muss. Für die bronchiale Reagibilität zeigte sich, vergleichbar mit den Untersuchungen der Rho-Kinase, dass die Applikation von Serotonin bei simultaner Hemmung von p38 MAPK und Syk gegenüber der singulären Hemmung von p38 MAPK ähnliche Effekte hervorrief. Dies könnte darauf hinweisen, dass Syk die Kontraktion glatter Muskelzellen in den Atemwegen sowohl über eine Interaktion mit Rho-Kinase als auch mit p38 MAPK mediierte. Die Prüfung der Hypothese, ob Syk in die Signalkette beider Enzyme eingebunden ist, bedarf allerdings weiterer Analysen.

Zur weiteren Aufschlüsselung der Syk-vermittelten Signaltransduktion in pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen wäre in weiterführenden Experimenten die Analyse der potenziellen Interaktion zwischen Syk und der Phospholipase C (PLC) sinnvoll. In glatten Muskelzellen hydrolysiert die Phosphatidylinositol-spezifische PLC Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), wodurch IP<sub>3</sub> und DAG entstehen (Noh et al. 1995). DAG kann zusätzlich durch den Abbau von Phosphatidylcholin durch eine Phosphatidylcholin-spezifische PLC gebildet werden (Lee et al. 1994). Durch IP<sub>3</sub> wird der Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert, indem es durch Bindung an einen Rezeptor am sarkoplasmatischen Retikulum zu einer Freisetzung des gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$  führt (Wright DB et al. 2013). DAG wiederum aktiviert relevante Isoformen der Proteinkinase C (Noh et al. 1995). Eine Verknüpfung der Signalwege von PLC und Syk wurde bereits für FcγR-exprimierende Immunzellen beschrieben: Die Phosphorylierung der Isozyme γ1 und γ2 der Phosphatidylinositol-spezifischen PLCγ erfolgte durch Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Syk (Noh et al. 1995). Vergleichbares berichteten Carpenter et

al. (Carpenter et al. 1999). Die Expression von PLC $\gamma$ 1 in humanen vaskulären glatten Muskelzellen bzw. humanen umbilikalen Endothelzellen wurde bereits demonstriert (Mackenzie et al. 2013, Lo Vasco et al. 2011). Ochocka et al. konnten ferner zeigen, dass PLC zusammen mit Rho-Kinase essentiell für die Kontraktion vaskulärer glatter Muskelzellen ist (Ochocka et al. 2008).

Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass Syk die Kontraktilität glatter Muskelzellen via DAG, MLCK, MLCP oder weiterer Signaltransduktoren moduliert. Die experimentellen Untersuchungen der genannten Enzyme könnten weitere Erkenntnisse über die Syk-medierten Signalwege aufdecken.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass Syk eine bedeutende Rolle in der pulmonalen und bronchialen Reagibilität spielt. Allerdings fokussierten die Analysen bisher auf die Situation in der naiven, ungeschädigten Lunge. Daher stellte sich nun die Frage, welchen Einfluss Syk bei chronischer pulmonaler T<sub>H</sub>2-Infektion im Hinblick auf PAH- und Asthma bronchiale-assoziierte Veränderungen ausübt. Die Effekte einer pharmakologischen Syk-Inhibition auf die chronische pulmonale T<sub>H</sub>2-Infektion der Atemwege wurden bereits untersucht, wobei sich ein protektiver Effekt der Syk-Inhibition auf die Atemwegshyperreagibilität zeigte (Penton et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund dessen auf potenzielle Syk-Effekte bei PAH-assoziierten Veränderungen fokussiert.

PAH ist mit einer chronischen Infektion, verstärkter Kontraktion pulmonalvaskulärer glatter Muskelzellen sowie pulmonalvaskulärem *Remodeling* assoziiert (Said et al. 2010). Die chronische pulmonale T<sub>H</sub>2-Infektion induziert diese wesentlichen Charakteristika der PAH, was in verschiedenen Arbeiten bereits beschrieben wurde. So konnten Witzernath et al. 2006 erstmals die T<sub>H</sub>2-induzierte pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität auf klinisch relevante Vasokonstriktoren wie Endothelin-1, Serotonin, den Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619 und Angiotensin II nachweisen (Witzernath et al. 2006). Tormanen et al. zeigten, dass eine chronische allergische Atemwegsinfektion sowohl zum *Remodeling* tracheo-bronchialer Atemwege, als auch großer pulmonaler Gefäße führte (Tormanen et al. 2005). Das *Remodeling* war hierbei durch eine Hyperplasie der glatten Gefäßmuskelzellen, die Proliferation der Endothelzellen sowie durch gesteigerte Synthese der Prokollagene 1 und 3 charakterisiert (Tormanen et al. 2005). Übereinstimmend demonstrierten Daley et al., dass eine T<sub>H</sub>2-Immunantwort pulmonalarterielles *Remodeling* induzieren kann (Daley et al. 2008). Bei Mäusen, die repetitiv mit *Aspergillus fumigatus*-Antigen (Asp Ag) oder OVA sensibilisiert und atemwegsexponiert wurden, konnten die Autoren eine erhöhte pulmonalarterielle Muscularisierung nachweisen, was auf eine Zunahme von  $\alpha$ -Aktin-exprimierenden glatten Muskelzellen, eine erhöhte zelluläre Expression des nukleären Ki67 (ein Mitose-Marker) und die veränderte Anordnung der glatten Muskelzellen in mehreren Schichten zurückgeführt wurde

(Daley et al. 2008). Das *Remodeling* wurde Allergen-unabhängig sowohl bei Asp Ag- als auch OVA-behandelten Mäusen detektiert (Daley et al. 2008). Ferner stellten Daley et al. durch Bestimmung der IgE- und IgG1-Serum-Level und der BALF-Zytokine IL-4 und IL-5 eine Korrelation zwischen dem Ausmaß des pulmonalarteriellen *Remodelings* und der Stärke der T<sub>H</sub>2-Immunantwort her (Daley et al. 2008). Mittels IL-4-defizienter Mäuse (IL-4 KO), die keine T<sub>H</sub>2-Immunantwort nach repetitiver Sensibilisierung und Exposition mit Asp Ag entwickeln (Corry et al. 1998), zeigten die Autoren zudem, dass das *Remodeling* Folge der T<sub>H</sub>2-Immunantwort war (Daley et al. 2008). So war das pulmonalarterielle *Remodeling* in den IL-4 KO-Mäusen signifikant geringer ausgeprägt als in Wildtyp-Mäusen (Daley et al. 2008). Mit dem Ziel, einen Mediator des T<sub>H</sub>2-vermittelten vaskulären *Remodeling* zu detektieren, untersuchten die Autoren den Effekt eines IL-13-Inhibitors parallel zu den ersten Applikationen von Asp Ag, was zu signifikant geringerem pulmonalarteriellen *Remodeling* im Gegensatz zu den Kontrollgruppen führte (Daley et al. 2008).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer genomischen Syk-Deletion in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation experimentell untersucht. Die Mäuse des induzierbaren Mausstamms (Syk<sup>flox/flox</sup>) und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse wurden hierfür wiederholt mit OVA sensibilisiert bzw. mit PBS und Aluminiumhydroxid scheinensensibilisiert und anschließend über einen Zeitraum von rund 5 Wochen repetitiven Atemwegsexpositionen mit OVA ausgesetzt. Im Einklang mit den Ergebnissen der bereits genannten Arbeiten konnten die PAH-assoziierten Charakteristika infolge der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation festgestellt werden. So wiesen die OVA/OVA-behandelten Mäuse im Gegensatz zu den scheinensensibilisierten Kontroll-Tieren (PBS/OVA) eine pulmonale leukozytäre Inflammation, pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität nach Stimulation mit klinisch relevanten Vasokonstriktoren sowie pulmonalarteriell *Remodeling* auf.

Bei dem untersuchten induzierbaren Mausstamm (Syk<sup>flox/flox</sup>) wurde die Syk-Deletion (Syk<sup>del/del</sup>) mittels mehrmaliger oraler Tamoxifen-Gabe erreicht. Dies war notwendig, da Mäuse, die kongenital Syk-defizient sind, bereits *in utero* schwere Hämorrhagien entwickeln und kurz nach der Geburt versterben (Wex et al. 2011, Yanagi et al. 2001, Cheng et al. 1995, Turner et al. 1995). Tamoxifen ist ein nicht-steroidaler selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator, der klinisch beispielsweise bei der Behandlung von endometrialen Tumoren und Brustkrebs eingesetzt wird (Jager et al. 2015, Shang 2006). In den Zellen von Mäusen, welche ein Cre/*LoxP*-System im Genom tragen, interagiert Tamoxifen mit der zytoplasmatischen DNA-Rekombinase Cre (Seibler et al. 2003). Infolge dessen wird die Rekombinase in den Zellkern transloziert und katalysiert hier die Spaltung und Neuverknüpfung der DNA zwischen den *LoxP*-flankierten Genabschnitten (*floxed = flanked by loxP*), wodurch das Ziel-Gen entfernt wird (Sauer 1998, Feil et al. 1997). Das Ziel-Gen war bei dem in dieser Arbeit eingesetzten induzierbaren Mausstamm das Exon 2 des Syk-Gens (Wex et al. 2011, Saijo et

al. 2003, Seibler et al. 2003). Der Nachweis der erfolgreich induzierten Syk-Deletion erfolgte durch PCR bzw. Western Blot-Analyse. Wex et al. nutzten für ihre Studien ebenfalls Mäuse des in dieser Arbeit eingesetzten induzierbaren Mausstamms und zeigten die erfolgreiche Tamoxifen-induzierte Syk-Deletion durch PCR und Western Blot-Analyse in verschiedenen Organen, insbesondere der Lunge (Wex et al. 2011).

Zum Ausschluss von Tamoxifen-Effekten auf die chronische pulmonale  $T_H2$ -Inflammation der behandelten Mäuse wurden korrespondierende WT-Gruppen mitgeführt, die analog zu den  $Syk^{flox/flox}$ -Tieren mit Tamoxifen behandelt wurden. Die Untersuchung dieser Gruppen ergab für keinen der analysierten Parameter Tamoxifen-abhängige Effekte.

Im Hinblick auf PAH-assoziierte Veränderungen wurde die pulmonalvaskuläre Reagibilität der  $Syk^{flox/flox}$ -,  $Syk^{del/del}$ - bzw. WT-Mäuse in IPML-Experimenten untersucht. PBS/OVA-behandelte  $Syk^{del/del}$ -Mäuse zeigten gegenüber der Syk-exprimierenden Kontrollgruppe eine reduzierte pulmonalvaskuläre Reagibilität, was im Einklang mit den Ergebnissen der pharmakologischen Syk-Inhibition in naiven Mäusen war. Überraschenderweise zeigte sich jedoch in der Gruppe der OVA/OVA-behandelten  $Syk^{del/del}$ -Mäuse eine verstärkte pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität auf die applizierten konstriktorischen Stimuli, verglichen mit den OVA/OVA-behandelten  $Syk^{flox/flox}$ -Mäusen. Diese verstärkte pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität steht in deutlichem Gegensatz zu den bisherigen Effekten der Syk-Inhibition bzw. Syk-Deletion auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität in naiven bzw. PBS-scheinsensibilisierten Mäusen. Dies könnte darauf hinweisen, dass Syk in der chronischen pulmonalen  $T_H2$ -Inflammation ein negativer Regulator für die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität ist. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch unbekannt und sollten in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

Die stereologischen Analysen des Lungengewebes erbrachten keinen Hinweis darauf, dass die stärkere Hyperreagibilität auf ein ausgeprägteres vaskuläres *Remodeling* zurückzuführen war. Auch die Untersuchung der BALF lieferte keinen Anhaltspunkt für potenzielle Initiatoren einer stärkeren  $T_H2$ -Immunantwort und daraus resultierend einer verstärkten pulmonalvaskulären Reagibilität. So war die BALF-Gesamtzellzahl der OVA/OVA-behandelten  $Syk^{flox/flox}$ - und  $Syk^{del/del}$ -Mäuse vergleichbar, ebenso wie die Anzahl eosinophiler und neutrophiler Granulozyten. Im Einklang mit der vorliegenden Arbeit untersuchten Penton et al. den potenziellen Einfluss einer Syk-Inhibition auf die pulmonale Leukozytenrekrutierung in der chronischen pulmonalen  $T_H2$ -Inflammation und konnten ebenfalls keine Effekte beobachten (Penton et al. 2013). Wex et al. zeigten interessanterweise für die akute pulmonale  $T_H2$ -Inflammation, dass eine Syk-Deletion zu einer signifikanten Reduktion eosinophiler Granulozyten in der BALF von  $Syk^{del/del}$ -Mäusen nach OVA-induzierter eosinophiler Lungeninflammation führte (Wex et al. 2011). Ebenso demonstrierten Moy et al. für die akute OVA-

induzierte Atemwegsinfektion protektive Effekte einer pharmakologischen Syk-Inhibition auf die pulmonale Leukozytenrekrutierung, denn bei OVA-sensibilisierten und OVA-atemwegsexponierten Ratten war die Anzahl eosinophiler und neutrophiler Granulozyten in der BALF nach Behandlung mit einem Syk-Inhibitor gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe reduziert (Moy et al. 2013). Demnach scheinen sich die Syk-vermittelten Effekte in akuter und chronischer pulmonaler  $T_H2$ -Inflammation zu unterscheiden.

Weitere Arbeiten demonstrierten ebenfalls einen protektiven Effekt einer Syk-Deletion bzw. einer pharmakologischen Syk-Inhibition auf die Funktion von Immunzellen bzw. Immunrezeptor-exprimierenden Zellen. Yamamoto et al. führten *in vitro* Untersuchungen mit verschiedenen humanen Immunzellen durch und zeigten, dass der Syk-Inhibitor BAY 61-3606 die Fc $\gamma$ R-induzierte Aktivierung von Monozyten, die Degranulation basophiler Granulozyten sowie die B-Zell-Rezeptor-medierte Signaltransduktion hemmte (Yamamoto et al. 2003). Für Mastzellen von Syk<sup>del/del</sup>-Mäusen demonstrierten Wex et al., dass die Fc $\epsilon$ RI-medierte Degranulation *in vitro* nach Antigen-induzierter Kreuzvernetzung nicht mehr funktionierte (Wex et al. 2011). Vergleichbare Ergebnisse erzielten Costello et al., die zusätzlich zeigten, dass in Syk-defizienten Mastzellen die Leukotrien-Synthese sowie die Zytokin-Sekretion nicht mehr funktionierten (Costello et al. 1996). Redhu et al. beschrieben zudem eine Verknüpfung zwischen Syk, dem Fc $\epsilon$ RI-Rezeptor und glatten Muskelzellen in humanen Luftwegen (Redhu et al. 2009). Die glatten Muskelzellen exprimierten den Fc $\epsilon$ RI-Rezeptor, dessen Aktivierung zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sowie zur Freisetzung von  $T_H2$ -Zytokinen und Eotaxin-1 führte (Redhu et al. 2009). Eine IgE-Sensibilisierung der glatten Bronchialmuskulatur führte zu einer erhöhten Transkription von Eotaxin-1, RANTES bzw. IL-8, was durch eine Inhibition von Syk zum Teil aufgehoben wurde (Redhu et al. 2009).

Zusammenfassend deuten die Daten der vorliegenden Arbeit vor dem Hintergrund bereits publizierter Ergebnisse anderer Studien darauf hin, dass es bei den Syk-vermittelten Effekten einen Unterschied zwischen der akuten und der chronischen  $T_H2$ -Inflammation gibt.

Penton et al. untersuchten die Atemwegsreagibilität in der OVA-induzierten chronischen pulmonalen  $T_H2$ -Inflammation. Die Autoren zeigten, dass eine pharmakologische Syk-Inhibition die Atemwegshyperreagibilität abschwächte (Penton et al. 2013). Hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied in der Atemwegsreagibilität zwischen OVA/OVA-behandelten Syk<sup>del/del</sup>- bzw. Syk<sup>flox/flox</sup>-Tieren detektiert werden. Grund hierfür könnte der Einsatz unterschiedlicher konstriktorisch wirksamer Stimuli sein. Das von Penton et al. zur Untersuchung der Atemwegsreagibilität in der chronischen pulmonalen  $T_H2$ -Inflammation eingesetzte Methacholin ist ein Bronchokonstriktor, der in der klinischen Asthma bronchiale-Diagnostik Anwendung findet (Sumino et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit fokussierte die Untersuchung der chronischen pulmonalen  $T_H2$ -Inflammation auf potenzielle

Syk-Effekte für PAH-assoziierte Veränderungen, weshalb die vordergründig vasokonstriktorisch wirksamen Stimuli U46619 (Jones et al. 1995, Christman et al. 1992) und Endothelin-1 (Sakai S et al. 1996, Seo et al. 1994, Giaid et al. 1993) zum Einsatz kamen.

Einen weiteren Effekt der Syk-Deletion in der chronischen pulmonalen  $T_H2$ -Inflammation zeigten Analysen der Plasma-Immunglobulin-Level der untersuchten OVA/OVA-behandelten Syk<sup>flox/flox</sup>- und Syk<sup>del/del</sup>-Mäuse. Die Plasmaspiegel der OVA-spezifischen IgE und IgG1 der Syk<sup>del/del</sup>-Tieren waren deutlich niedriger, als die der Syk-exprimierenden Mäuse. Dies deutet darauf hin, dass die Syk-Deletion die B-Zellen und die Immunglobulin-Produktion beeinflusste, was durch Studien anderer Autoren bereits hypothetisiert wurde. So berichteten Takata et al., dass in Syk-defizienten B-Zellen die Signaltransduktion über die PLC $\gamma$ -abhängige IP $_3$ -Bildung aufgehoben und somit die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung aus dem endoplasmatischen Retikulum reduziert war (Takata et al. 1994). Neben der Signaltransduktion ist aber auch die Reifung der B-Zellen maßgeblich von Syk abhängig (Cornall et al. 2000). In ihrer Funktionsfähigkeit eingeschränkte B-Zellen könnten demnach Ursache für die niedrigen Ig-Level sein.

Auch dendritische Zellen (DZ) könnten für die erniedrigten Ig-Level der Syk-deletierten Mäuse maßgeblich sein. Als zentrale Antigen-präsentierende Zellen modulieren sie durch die Expression ko-stimulatorischer Moleküle und Zytokine die Differenzierung von  $T_H$ -Zellen (Trevor et al. 2014, Vroman et al. 2014). Infolge einer DZ-abhängigen, beeinträchtigten  $T_H2$ -Zell-Differenzierung wäre die Freisetzung des B-Zell-stimulierenden IL-4 (Trevor et al. 2014) ebenfalls gestört, was eine reduzierte IgE-Produktion nach sich ziehen würde. Daneben finden sich Studien über die Beziehung zwischen DZ und Syk. Sedlik et al. zeigten, dass Syk für die Reifung von DZ relevant war und in der Signalkette der Fc $\gamma$ R-medierten Antigeninternalisation und -präsentation von DZ eine zentrale Rolle spielte (Sedlik et al. 2003). Auch Nakashima et al. beobachteten unter Einsatz eines Syk-Inhibitors, dass die Syk-Aktivität eine kritische Komponente im Prozess der Fc $\gamma$ R-medierten Internalisierung von Immunkomplexen in DZ darstellte (Nakashima et al. 2004). Die Fähigkeit der DZ zur Präsentation von Immunkomplex-Antigenen gegenüber  $T_H2$ -Zellen war unter Syk-Inhibierung eingeschränkt (Nakashima et al. 2004). Die beschriebenen Effekte einer beeinträchtigten DZ-Funktion scheinen in der vorliegenden Arbeit jedoch keine relevante Rolle gespielt zu haben, da in diesem Fall die Beeinträchtigung zahlreicher weiterer Prozesse der  $T_H2$ -Immunantwort zu erwarten gewesen wäre. Dies hätte eine abgeschwächte  $T_H2$ -Inflammation und einen eher protektiven Effekt der Syk-Deletion auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität und das *Remodeling* zur Folge gehabt, was in dieser Arbeit nicht beobachtet wurde.

OVA/OVA-behandelte Syk<sup>del/del</sup>-Tiere wiesen außerdem gegenüber den OVA/OVA-behandelten Syk<sup>flox/flox</sup>-Tieren erhöhte IL-5-Level in der BALF auf. Unterschiede in der Expression des klinisch relevanten IL-6 bzw. von RANTES wurden nicht detektiert.

IL-5 wird insbesondere bei Allergen-assoziierten Immunantworten von  $T_H2$ -Lymphozyten produziert (Kay AB 1996) und spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Proliferation, Differenzierung, Rekrutierung, Aktivierung und des Überlebens von eosinophilen Granulozyten (Adachi et al. 1998, Dubucquoi et al. 1994). Zudem wurde IL-5 bei Mäusen mit der B-Zell-Differenzierung und der Produktion von Immunglobulinen assoziiert (Takatsu et al. 1994). IL-5 agiert über den IL-5-Rezeptor, der unter anderem von eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie B-Zellen exprimiert wird (Garcia et al. 2013, Takatsu 2011). Eosinophile Granulozyten sind zudem in der Lage, IL-5 insbesondere an Orten allergischer Inflammation selbst zu produzieren (Dubucquoi et al. 1994, Broide et al. 1992), was für die Aufrechterhaltung der Inflammation von großer Bedeutung ist und für die Ergebnisse dieser Arbeit möglicherweise von Relevanz sein könnte. Zwar waren bei Vergleich der OVA/OVA-behandelten Syk<sup>flox/flox</sup> bzw. Syk<sup>del/del</sup>-Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Eosinophilie feststellbar, die erhöhte IL-5-Konzentration in der BALF der OVA/OVA-behandelten Syk<sup>del/del</sup>-Tiere könnte aber auf eine gesteigerte Produktion von IL-5 durch die eosinophilen Granulozyten vor Ort hindeuten. Die Rolle von IL-5 in der Allergen-induzierten pulmonalen  $T_H2$ -Inflammation untersuchten Foster et al. (Foster et al. 1996). Die Autoren demonstrierten, dass in repetitiv OVA-sensibilisierten und OVA-atemwegsexponierten IL-5-defizienten Mäusen die zu erwartende Eosinophilie in den Atemwegen und im Blut, die Atemwegshyperreagibilität nach Methacholin-Applikation sowie charakteristische  $T_H2$ -induzierte morphologische Veränderungen der Atemwege aufgehoben waren (Foster et al. 1996). Besonders die von Foster et al. demonstrierten Effekte auf die AHR bei IL-5-Defizienz im Asthma-Modell könnten für das PAH-Modell der vorliegenden Arbeit relevant sein. So könnten die detektierten erhöhten IL-5-Level der OVA/OVA-behandelten Syk<sup>del/del</sup>-Mäuse zu der festgestellten gesteigerten pulmonalvaskulären Hyperreagibilität dieser Untersuchungsgruppe geführt haben. Die Ursache für die gesteigerte IL-5-Expression ist jedoch gegenwärtig noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse der verstärkten pulmonalvaskulären Hyperreagibilität und der BALF-Analysen erscheinen gegenüber den Ergebnissen der reduzierten IgE- und IgG1-Plasmalevel Syk-deletierter Mäuse zunächst kontrovers. Studien zur Atemwegshyperreagibilität in der chronischen  $T_H2$ -Inflammation muriner Atemwege zeigten allerdings, dass der Plasma-IgE-Spiegel nicht zwingend mit dem Auftreten einer AHR assoziiert ist. So untersuchten Takeda et al. Mastzell-defiziente Mäuse, die repetitiven OVA-Sensibilisierungen und OVA-Atemwegsexpositionen unterzogen wurden und zeigten, dass eine IgE-induzierte Mastzell-Aktivierung nicht für die Entstehung einer eosinophilen Inflammation bzw. die Methacholin-induzierte Atemwegshyperreagibilität notwendig war (Takeda et al. 1997). Ähnliches beschrieben auch Fuchs et al. (Fuchs et al. 2012). Weiterführende Untersuchungen

könnten eruieren, ob vergleichbare Vorgänge für die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität eine Rolle spielen könnten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Syk ein vielversprechendes potenzielles Zielmolekül therapeutischer Interventionen bei PAH bzw. Asthma sein könnte, insbesondere hinsichtlich der detektierten protektiven Effekte einer Syk-Inhibition auf die pulmonalvaskuläre und bronchiale Reagibilität. Auch die dokumentierten dilatatorischen Effekte der Syk-Inhibition in präkonstringierten pulmonalen Gefäßen und Bronchien untermauern die Relevanz von Syk für diese Erkrankungen, ebenso wie die Effekte der Syk-Deletion auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität in scheinsensibilisierten Mäusen, die mit den Ergebnissen der pharmakologischen Syk-Inhibition im Einklang waren.

Hinsichtlich der Bedeutung von Syk in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation bedarf es weiterführender Untersuchungen zur Klärung der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen offenen Fragen. Denkbar wäre die Analyse eines pharmakologischen Syk-Inhibitors in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation, beispielsweise durch Applikation des Inhibitors während des finalen IPML-Experiments. Dieser Ansatz könnte zu Erkenntnissen über einen möglichen direkten, protektiven Effekt der Syk-Inhibition in der PAH-assoziierten pulmonalvaskulären Hyperreagibilität führen. Außerdem erscheint die Untersuchung einer dauerhaften Syk-Inhibitor-Applikation parallel zu OVA-Atemwegsexpositionen sinnvoll, um mögliche positive Effekte auf die Entwicklung PAH-assoziiierter Veränderungen zu eruieren.

Die Untersuchung der Syk-Deletion bzw. der pharmakologischen Syk-Inhibition in einem Krankheitsmodell der chronischen Hypoxie könnte zudem weiteren Aufschluss geben über die Rolle von Syk in PAH-assoziiertem pulmonalvaskulären *Remodeling* und der Rechtsherzhypertrophie sowie in der Hypoxie-induzierten pulmonalen Inflammation.

Die Aufdeckung des Syk-Signalwegs in glatten Muskelzellen könnte für die Entwicklung spezifischer Therapeutika von großer Relevanz sein. Die Untersuchung einer Syk-Deletion durch liganden-abhängige, ortsgebundene Rekombinasen (Wendling et al. 2009, Kuhbandner et al. 2000) erscheint in diesem Zusammenhang interessant. Nach Tamoxifen-Applikation würde hierbei eine Syk-Deletion ausschließlich in der glatten Muskulatur induziert werden. Folglich wäre die spezifische Untersuchung der Rolle von Syk in der muskulären Signaltransduktion möglich. Darüber hinaus könnte sich die Analyse weiterer relevanter Enzyme der Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen Muskelkontraktion, wie PLC, DAG, MLCK und MLCP als sinnvoll erweisen.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Julia Herbert

### „Die Rolle der Milztyrosinkinase in der pulmonalvaskulären und bronchialen Reagibilität und in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Inflammation“

Pulmonalarterielle Hypertonie und Asthma bronchiale sind progressiv verlaufende chronische pulmonale Erkrankungen von globaler Relevanz, die unbehandelt zum Tod führen können. Trotz ihrer Unterschiede sind bestimmte pathophysiologische Merkmale beiden Erkrankungskomplexen gemein. Dazu gehören Inflammation sowie pathophysiologische Veränderungen glatter Muskulatur, die zu verstärkter Konstriktion und *Remodeling* der pulmonalarteriellen Gefäße (pulmonalarterielle Hypertonie) bzw. der Bronchien (Asthma bronchiale) führen. Verfügbare Therapieoptionen für pulmonalarterielle Hypertonie können zu einer Verbesserung von Symptomen und zu positiven Auswirkungen auf das Überleben der Patienten beitragen, jedoch führt keine der gegenwärtigen therapeutischen Interventionen zu einer Heilung. Zugelassene Standardmedikationen sind für einen relevanten Anteil der Patienten nicht ausreichend effektiv und Behandlungsmöglichkeiten für fortgeschrittene Erkrankungsstadien sind limitiert.

Das gegenwärtige therapeutische Management von Asthma bronchiale umfasst effektive Maßnahmen und Medikamente zur Kontrolle von Symptomen und Exazerbationen. Jedoch ist die Erkrankung nicht heilbar und für Patienten mit unzureichender Resonanz auf das Behandlungsregime gibt es nur wenige Therapieoptionen.

Die Identifikation neuer Zielmoleküle für die Entwicklung innovativer therapeutischer Substanzen ist sowohl für pulmonalarterielle Hypertonie als auch Asthma bronchiale notwendig. Verschiedene Studien zeigten eine potenzielle Rolle der Milztyrosinkinase (*spleen tyrosine kinase*, Syk) in proinflammatorischen Prozessen, Vaso- und Bronchokonstriktion sowie *Remodeling*. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das therapeutische Potenzial der Syk-Inhibition und -Deletion experimentell eruiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt, dass Syk in den bronchialen und pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen humaner und muriner Lungen exprimiert ist. In Untersuchungen isoliert perfundierter und ventilierter Mauslungen führte die Applikation des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 zu einer reduzierten pulmonalvaskulären und bronchialen Reagibilität nach Einsatz klinisch relevanter Vaso- bzw. Bronchokonstriktoren. In präkonstringierten pulmonalen Gefäßen und Bronchien führte die Syk-Inhibition zur Dilatation. Zur Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen der Syk-vermittelten Vaso- und

Bronchokonstriktion wurden relevante Signalwege der Calcium-unabhängigen Muskelkontraktion analysiert. Es ergaben sich dabei Hinweise, dass Syk in den Atemwegen in die Signalkaskaden der Rho-Kinase sowie p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase eingebunden sein könnte. Für die pulmonalen Gefäße zeigten sich in dieser Arbeit Hinweise auf eine Verknüpfung der Signalwege von Syk und p38 Mitogen-aktivierter Proteinkinase.

Der Einfluss von Syk in der chronischen pulmonalen T<sub>H</sub>2-Infiammation wurde mit Mäusen untersucht, in denen durch Tamoxifen-Applikation eine Syk-Deletion induziert wurde und die repetitiven Sensibilisierungen und Atemwegsexpositionen mit Ovalbumin unterzogen wurden. Anschließende Untersuchungen der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslungen zeigten, dass die Syk-Deletion bei Ovalbumin-sensibilisierten und -atemwegsexponierten Mäusen zu einer verstärkten pulmonalvaskulären Hyperreagibilität nach Einsatz klinisch relevanter Vasokonstriktoren führte. In scheinensensibilisierten Mäusen mit Syk-Deletion wurde im Vergleich zu Syk-exprimierenden Mäusen eine reduzierte pulmonalvaskuläre Reagibilität auf relevante konstriktorische Stimuli detektiert, was im Einklang mit den Ergebnissen der pharmakologischen Syk-Inhibition war. In der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit Ovalbumin-sensibilisierter sowie -atemwegsexponierter Mäuse mit Syk-Deletion wurde ein erhöhter Interleukin-5-Gehalt detektiert. Die Plasmaspiegel der Ovalbumin-spezifischen Immunglobuline E und G1 dieser Tiere waren hingegen gegenüber der Kontrollgruppe reduziert. Ein direkter Effekt der Syk-Deletion auf pulmonalvaskuläres *Remodeling* konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit Syk als attraktives therapeutisches Zielmolekül für die Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie und von Asthma bronchiale. Fortführende Untersuchungen könnten zur weiteren Aufschlüsselung des Syk-Signalweges sowie zur Eruierung potenzieller protektiver Effekte der pharmakologischen Syk-Inhibition in einem chronischen Krankheitsmodell beitragen.

## 7 SUMMARY

**Julia Herbert**

### **“The role of spleen tyrosine kinase in pulmonary vascular and airway responsiveness and chronic pulmonary Th2 inflammation”**

Pulmonary arterial hypertension and bronchial asthma are chronic pulmonary diseases of global relevance that are predominantly progressive and, if left untreated, lethal. Despite their dissimilarities, pulmonary arterial hypertension and asthma share common pathological features such as inflammation, increased smooth muscle cell contraction and remodeling.

Therapeutic options for pulmonary arterial hypertension aim at improving symptoms and survival, but to date, the disease remains without cure. Additionally, therapeutic options for patients with severe disease manifestations or inadequate treatment response remain limited.

Available therapeutic schemes and medications for treatment of bronchial asthma present sufficient disease control and reduce exacerbations for many patients. However, therapeutic options are limited for patients with severe and to some extent steroid-resistant bronchial asthma.

There is high medical need for novel, innovative therapeutic approaches for pulmonary arterial hypertension as well as bronchial asthma. Several *in vitro* and *in vivo* studies showed a potential role of spleen tyrosine kinase (Syk) in pathophysiological processes such as inflammation, pulmonary vascular and airway responsiveness and remodeling. Therefore, this study aimed at analysing the therapeutic potential of Syk-inhibition and Syk-deletion in the context of pulmonary vascular and airway responsiveness and chronic pulmonary Th2 inflammation.

In this study, immunofluorescent staining of human and murine lung tissue revealed Syk-expression in airway and pulmonary vascular smooth muscle cells. Pharmacological Syk-inhibition with BAY 61-3606 in isolated perfused and ventilated murine lungs led to reduced pulmonary vascular and airway responsiveness. Additionally, dilatative effects due to Syk-inhibition were detected in precontracted pulmonary vessels and airways. To elicit underlying mechanisms of Syk-induced vaso- and bronchoconstriction, relevant signaling pathways of Calcium-independent smooth muscle cell contraction were investigated. The results demonstrated a possible link between signaling pathways of Syk, Rho-kinase and p38 mitogen activated protein kinase in airways. In pulmonary vessels, Syk signaling could be linked to the p38 mitogen activated kinase pathway.

In Ovalbumin-induced chronic pulmonary Th2 inflammation, Syk-deficient mice showed an increased pulmonary vascular hyperresponsiveness to relevant clinical vasoconstrictors, as compared to the Syk-sufficient control group. Besides, Syk-deletion led to reduced levels of Ovalbumin-specific immunoglobulin E and G1 in the plasma of Ovalbumin-treated mice. Further, analysis of relevant cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid revealed increased interleukin-5-levels in the respective mice. Remodeling of pulmonary vessels was detected in Ovalbumin-treated mice, but was independent of Syk-deletion. Syk-deletion in sham-sensitised mice led to reduced pulmonary vascular responsiveness, which was in accordance with the results obtained from analysis of naïve mice after Syk-inhibition.

In conclusion, this study demonstrates that Syk might be an attractive therapeutic target for treatment of pulmonary arterial hypertension and bronchial asthma. Additional studies are warranted to further characterise Syk-signaling in pulmonary smooth muscle cells and evaluate a potential protective effect of pharmacological Syk-inhibition in a chronic model of disease.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe K et al. (2011) Tyrosine kinase inhibitors are potent acute pulmonary vasodilators in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 45:804-808
- Adachi T, Alam R (1998) The mechanism of IL-5 signal transduction. *Am J Physiol.* 275:C623-633
- Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M (2010) Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respir Med.* 104:1131-1137
- Aït-Khaled N, Enarson D, Bousquet J (2001) Chronic respiratory diseases in developing countries: the burden and strategies for prevention and management. *Bulletin of the World Health Organization.* 79:971-979
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 271:20246-20249
- Ammit AJ et al. (2001) Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma. *Faseb J.* 15:1212-1214
- Archer SL, Weir EK, Wilkins MR (2010) Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation.* 121:2045-2066
- Aujla SJ, Alcorn JF (2011) T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1810:1066-1079
- Aversa M, Porter S, Granton J (2015) Comparative safety and tolerability of endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *Drug Saf.* 38:419-435
- Badesch DB et al. (2000) Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 132:425-434
- Baker KE et al. (2014) Novel drug targets for asthma and COPD: Lessons learned from in vitro and in vivo models. *Pulm Pharmacol Ther.*
- Balendran A, Hare GR, Kieloch A, Williams MR, Alessi DR (2000) Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Lett.* 484:217-223
- Barnes NC, Miller CJ (2000) Effect of leukotriene receptor antagonist therapy on the risk of asthma exacerbations in patients with mild to moderate asthma: an integrated analysis of zafirlukast trials. *Thorax.* 55:478-483
- Barnes PJ (2014) Glucocorticoids. *Chem Immunol Allergy.* 100:311-316
- Barnes PJ (1993) Muscarinic receptor subtypes in airways. *Eur Respir J.* 6:328-331

- Barst RJ et al. (1996) A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 334:296-301
- Bateman ED et al. (2008) Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J.* 31:143-178
- Ben Driss A, Devaux C, Henrion D, Duriez M, Thuillez C, Levy BI, Michel JB (2000) Hemodynamic stresses induce endothelial dysfunction and remodeling of pulmonary artery in experimental compensated heart failure. *Circulation.* 101:2764-2770
- Benisty JI (2002) Cardiology patient page. Pulmonary hypertension. *Circulation.* 106:e192-194
- Benza RL, Miller DP, Barst RJ, Badesch DB, Frost AE, McGoon MD (2012) An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest.* 142:448-456
- Berlin AA, Lukacs NW (2005) Treatment of cockroach allergen asthma model with imatinib attenuates airway responses. *Am J Respir Crit Care Med.* 171:35-39
- Bisgaard H, Bonnelykke K (2010) Long-term studies of the natural history of asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 126:187-197; quiz 198-189
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 342:1350-1358
- Bousquet J, Dahl R, Khaltsev N (2007) Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases. *Eur Respir J.* 29:233-239
- Broide DH, Paine MM, Firestein GS (1992) Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest.* 90:1414-1424
- Brown PH, Greening AP, Crompton GK (1993) Large volume spacer devices and the influence of high dose beclomethasone dipropionate on hypothalamo-pituitary-adrenal axis function. *Thorax.* 48:233-238
- Brusselle GG et al. (2013) Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. *Thorax.* 68:322-329
- Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, Ceuppens JL (2006) IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res.* 7:135
- Canning BJ (2006) Reflex regulation of airway smooth muscle tone. *J Appl Physiol* (1985). 101:971-985
- Carpenter G, Ji Q (1999) Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element. *Exp Cell Res.* 253:15-24

- Champion HC, Bivalacqua TJ, Greenberg SS, Giles TD, Hyman AL, Kadowitz PJ (2002) Adenoviral gene transfer of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) partially restores normal pulmonary arterial pressure in eNOS-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:13248-13253
- Channick RN et al. (2001) Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet*. 358:1119-1123
- Chen J et al. (2014) The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 190:1032-1043
- Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T (1995) Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature*. 378:303-306
- Chester AH, Yacoub MH (2014) The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2014:62-78
- Chetta A, Foresi A, Del Donno M, Bertorelli G, Pesci A, Olivieri D (1997) Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest*. 111:852-857
- Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE (1992) An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 327:70-75
- Chung KF et al. (2014) International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 43:343-373
- Chung KF, Adcock IM (2013) How variability in clinical phenotypes should guide research into disease mechanisms in asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 10 Suppl:S109-117
- Cirillo P, Golino P, Ragni M, Battaglia C, Pacifico F, Formisano S, Buono C, Condorelli M, Chiariello M (1999) Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors. *Cardiovasc Res*. 43:210-218
- Corbin JD, Francis SH (1999) Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J Biol Chem*. 274:13729-13732
- Cornall RJ, Cheng AM, Pawson T, Goodnow CC (2000) Role of Syk in B-cell development and antigen-receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1713-1718
- Corry DB, Grunig G, Hadeiba H, Kurup VP, Warnock ML, Sheppard D, Rennick DM, Locksley RM (1998) Requirements for allergen-induced airway hyperreactivity in T and B cell-deficient mice. *Mol Med*. 4:344-355
- Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F (2011) Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 66:989-998

- Costello PS, Turner M, Walters AE, Cunningham CN, Bauer PH, Downward J, Tybulewicz VL (1996) Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene*. 13:2595-2605
- Cowan DC, Cowan JO, Palmay R, Williamson A, Taylor DR (2010) Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma. *Thorax*. 65:384-390
- Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, DeFranco AL (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc $\gamma$  receptors on macrophages. *J Exp Med*. 186:1027-1039
- Daar AS et al. (2007) Grand challenges in chronic non-communicable diseases. *Nature*. 450:494-496
- Daley E et al. (2008) Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response. *J Exp Med*. 205:361-372
- de Nijs SB, Venekamp LN, Bel EH (2013) Adult-onset asthma: is it really different? *Eur Respir Rev*. 22:44-52
- Dessy C, Kim I, Sougnez CL, Laporte R, Morgan KG (1998) A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoceptor stimulation. *Am J Physiol*. 275:C1081-1086
- Dorfmüller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M (2003) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 22:358-363
- Dorfmüller P et al. (2002) Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 165:534-539
- Drazen JM (2012) Asthma: the paradox of heterogeneity. *J Allergy Clin Immunol*. 129:1200-1201
- Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, Capron A, Capron M (1994) Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med*. 179:703-708
- Dupuis J, Goresky CA, Fournier A (1996) Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* (1985). 81:1510-1515
- Duta F, Ulanova M, Seidel D, Puttagunta L, Musat-Marcu S, Harrod KS, Schreiber AD, Steinhoff U, Befus AD (2006) Differential expression of spleen tyrosine kinase Syk isoforms in tissues: Effects of the microbial flora. *Histochem Cell Biol*. 126:495-505
- Eddahibi S, Adnot S (2002) Anorexigen-induced pulmonary hypertension and the serotonin (5-HT) hypothesis: lessons for the future in pathogenesis. *Respir Res*. 3:9
- Eddahibi S et al. (2001) Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 108:1141-1150
- Erle DJ, Sheppard D (2014) The cell biology of asthma. *J Cell Biol*. 205:621-631



- Euler USv, Liljestrand G (1946) Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat. *Acta Physiologica Scandinavica*. 12:301-320
- Fagan KA, Tyler RC, Sato K, Fouty BW, Morris KG, Jr., Huang PL, McMurtry IF, Rodman DM (1999) Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *Am J Physiol*. 277:L472-478
- Fandrey J (2004) *Wie reagiert unser Körper auf Sauerstoffmangel?* Nordrhein-Westfälische Akademie der Wissenschaften. Schöningh Paderborn, 2004. ISBN: 9783506728838.
- Fartoukh M, Emilie D, Le Gall C, Monti G, Simonneau G, Humbert M (1998) Chemokine macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  mRNA expression in lung biopsy specimens of primary pulmonary hypertension. *Chest*. 114:50S-51S
- Fedullo PF, Auger WR, Kerr KM, Rubin LJ (2001) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 345:1465-1472
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 237:752-757
- Fixman ED, Stewart A, Martin JG (2007) Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. *Eur Respir J*. 29:379-389
- Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG (1996) Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*. 183:195-201
- Frey H-H, Löscher W (2010) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke Verlag Stuttgart, 3. Auflage, 2010. ISBN: 9783830410799.
- Frost AE et al. (2011) The changing picture of patients with pulmonary arterial hypertension in the United States: how REVEAL differs from historic and non-US Contemporary Registries. *Chest*. 139:128-137
- Fuchs B, Sjöberg L, Moller Westerberg C, Ekoff M, Swedin L, Dahlen SE, Adner M, Nilsson GP (2012) Mast cell engraftment of the peripheral lung enhances airway hyperresponsiveness in a mouse asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 303:L1027-1036
- Fulginiti J, 3rd, Singer HA, Moreland RS (1993) Phorbol ester-induced contractions of swine carotid artery are supported by slowly cycling crossbridges which are not dependent on calcium or myosin light chain phosphorylation. *J Vasc Res*. 30:315-322
- Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL (1984) Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation*. 70:580-587
- Futosi K, Fodor S, Mocsai A (2013) Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 17:638-650

- Futterer K, Wong J, Grucza RA, Chan AC, Waksman G (1998) Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J Mol Biol.* 281:523-537
- Galie N et al. (2013) Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 62:D60-72
- Galie N et al. (2009) Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 30:2493-2537
- Galie N et al. (2008) Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation.* 117:3010-3019
- Galie N et al. (2005) Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 353:2148-2157
- Galie N, Manes A, Branzi A (2004) The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res.* 61:227-237
- Galie N, Manes A, Branzi A (2003) Prostanoids for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Med.* 2:123-137
- Gao Z, Cao L, Luo Q, Wang X, Yu L, Wang T, Liu H (2011) Spleen tyrosine kinase modulates the proliferation and phenotypes of vascular smooth muscle cells induced by platelet-derived growth factor. *DNA Cell Biol.* 30:149-155
- Garbe E, LeLorier J, Boivin JF, Suissa S (1997) Inhaled and nasal glucocorticoids and the risks of ocular hypertension or open-angle glaucoma. *Jama.* 277:722-727
- Garcia G, Taille C, Laveneziana P, Bourdin A, Chanez P, Humbert M (2013) Anti-interleukin-5 therapy in severe asthma. *Eur Respir Rev.* 22:251-257
- Gekle M, Wischmeyer E (2010) Taschenlehrbuch Physiologie. Georg Thieme Verlag, 1. Auflage, 2010. ISBN: 9783131449818.
- George MG, Schieb LJ, Ayala C, Talwalkar A, Levant S (2014) Pulmonary hypertension surveillance: United States, 2001 to 2010. *Chest.* 146:476-495
- Germain M et al. (2013) Genome-wide association analysis identifies a susceptibility locus for pulmonary arterial hypertension. *Nat Genet.* 45:518-521
- Ghofrani HA, Simonneau G, Rubin LJ (2013) Riociguat for pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 369:2268

- Ghofrani HA et al. (2013) Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 369:330-340
- Giaid A et al. (1993) Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 328:1732-1739
- Gibbs JSR (2007) Making a diagnosis in PAH. *European Respiratory Review.* 16:8-12
- Global Initiative for Asthma (GINA) (2015) Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2015 [online].* Letzte Aktualisierung: August 2015, erhältlich im Internet unter [http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Report\\_2015\\_Aug11.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2015_Aug11.pdf) [Stand: 23.09.2015].
- Global Initiative for Asthma (GINA) (2015) Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2015, Online Appendix [online].* Letzte Aktualisierung April 2015, erhältlich im Internet unter [http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Appendix\\_2015\\_May19.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Appendix_2015_May19.pdf) [Stand: 23.09.2015].
- Gomberg-Maitland M et al. (2013) New trial designs and potential therapies for pulmonary artery hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 62:D82-91
- Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ (2006) Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res.* 7:73
- Gosens R, Schaafsma D, Meurs H, Zaagsma J, Nelemans SA (2004) Role of Rho-kinase in maintaining airway smooth muscle contractile phenotype. *European journal of pharmacology.* 483:71-78
- Guilbert TW et al. (2006) Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. *N Engl J Med.* 354:1985-1997
- Haberberger RV et al. (2009) Role of sphingosine kinase 1 in allergen-induced pulmonary vascular remodeling and hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 124:933-941 e931-939
- Hassoun PM et al. (2009) Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 54:S10-19
- Henderson WR, Jr. et al. (2002) A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med.* 165:108-116
- Herve P et al. (1995) Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med.* 99:249-254
- Herz U, Ruckert R, Wollenhaupt K, Tschernig T, Neuhaus-Steinmetz U, Pabst R, Renz H (1999) Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increased airway responsiveness--a model for non-allergic asthma. *Eur J Immunol.* 29:1021-1031

- Higenbottam T, Butt AY, McMahon A, Westerbeck R, Sharples L (1998) Long-term intravenous prostaglandin (epoprostenol or iloprost) for treatment of severe pulmonary hypertension. *Heart*. 80:151-155
- Higenbottam T (1994) Pathophysiology of pulmonary hypertension. A role for endothelial dysfunction. *Chest*. 105:7S-12S
- Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F (1993) Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest*. 91:1367-1373
- Hirota N, Martin JG (2013) Mechanisms of airway remodeling. *Chest*. 144:1026-1032
- Hirschberg K et al. (2013) Cinaciguat prevents neointima formation after arterial injury by decreasing vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Int J Cardiol*. 167:470-477
- Hoepfer MM, Ghofrani HA, Gorenflo M, Grunig E, Schranz D, Rosenkranz S (2010) [Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: European guidelines 2009]. *Pneumologie*. 64:401-414
- Hoepfer MM et al. (2009) Diagnosis, assessment, and treatment of non-pulmonary arterial hypertension pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 54:S85-96
- Howard V, Reed M (2005) Unbiased Stereology. Three-Dimensional Measurement in Microscopy. Garland Science/Bios Scientific Publishers, 2nd Edition, 2005. ISBN: 1859960898 (Print Edition).
- Humbert M, Gerry Coghlan J, Khanna D (2012) Early detection and management of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev*. 21:306-312
- Humbert M (2010) Pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: pathophysiology. *Eur Respir Rev*. 19:59-63
- Humbert M et al. (2009) Masitinib, a c-kit/PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor, improves disease control in severe corticosteroid-dependent asthmatics. *Allergy*. 64:1194-1201
- Humbert M et al. (2006) Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 173:1023-1030
- Humbert M et al. (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 43:13S-24S
- Humbert M et al. (1998) Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J*. 11:554-559
- Humbert M et al. (1995) Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 151:1628-1631
- Hung JY, Chiang SR, Tsai MJ, Tsai YM, Chong IW, Shieh JM, Hsu YL (2014) LIGHT is a crucial mediator of airway remodeling. *J Cell Physiol*.

- Hyduk A, Croft JB, Ayala C, Zheng K, Zheng ZJ, Mensah GA (2005) Pulmonary hypertension surveillance--United States, 1980-2002. *MMWR Surveill Summ.* 54:1-28
- Iversen K, Jensen AS, Jensen TV, Vejstrup NG, Sondergaard L (2010) Combination therapy with bosentan and sildenafil in Eisenmenger syndrome: a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial. *Eur Heart J.* 31:1124-1131
- Jager NG, Linn SC, Schellens JH, Beijnen JH (2015) Tailored Tamoxifen Treatment for Breast Cancer Patients: A Perspective. *Clin Breast Cancer.*
- James A, Mauad T, Abramson M, Green F (2012) Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 186:568; author reply 569
- Jasmin JF, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J (2001) Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 103:314-318
- Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ (1999) Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 160:1532-1539
- Jeffery PK (2001) Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 164:S28-38
- Jenkins DP, Madani M, Mayer E, Kerr K, Kim N, Klepetko W, Morsolini M, Darteville P (2013) Surgical treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 41:735-742
- Jones DA, Benjamin CW, Linseman DA (1995) Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Pharmacol.* 48:890-896
- Joshi CN, Martin DN, Fox JC, Mendeleev NN, Brown TA, Tulis DA (2011) The soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 inhibits vascular smooth muscle growth through the cAMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 339:394-402
- Kaur M, Singh M, Silakari O (2013) Inhibitors of switch kinase 'spleen tyrosine kinase' in inflammation and immune-mediated disorders: a review. *Eur J Med Chem.* 67:434-446
- Kay AB (1996) TH2-type cytokines in asthma. *Ann N Y Acad Sci.* 796:1-8
- Kay JM, Smith P, Heath D (1971) Aminorex and the pulmonary circulation. *Thorax.* 26:262-270
- Kepley CL, Wilson BS, Oliver JM (1998) Identification of the Fc epsilonRI-activated tyrosine kinases Lyn, Syk, and Zap-70 in human basophils. *J Allergy Clin Immunol.* 102:304-315
- Kim SR, Lee KS, Park SJ, Jeon MS, Lee YC (2012) Inhibition of p38 MAPK reduces expression of vascular endothelial growth factor in allergic airway disease. *J Clin Immunol.* 32:574-586

- Kim TH (2014) Respiratory reviews in asthma 2013. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 76:105-113
- Kimura K et al. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 273:245-248
- Kips JC, O'Connor BJ, Langley SJ, Woodcock A, Kerstjens HA, Postma DS, Danzig M, Cuss F, Pauwels RA (2003) Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med*. 167:1655-1659
- König HE, Liebich HG (2008) *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Schattauer, 4. Auflage, 2008. ISBN: 9783794526505.
- Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H (2009) Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J*. 34:888-894
- Kranenburg AR, Willems-Widyastuti A, Moori WJ, Sterk PJ, Alagappan VK, de Boer WI, Sharma HS (2006) Enhanced bronchial expression of extracellular matrix proteins in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Pathol*. 126:725-735
- Krause DS, Van Etten RA (2005) Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*. 353:172-187
- Krowka MJ, Frantz RP, McGoon MD, Severson C, Plevak DJ, Wiesner RH (1999) Improvement in pulmonary hemodynamics during intravenous epoprostenol (prostacyclin): A study of 15 patients with moderate to severe portopulmonary hypertension. *Hepatology*. 30:641-648
- Kuebler WM, Kuppe H (2002) Zelluläre Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie. *Z Herz-, Thorax-, Gefäßchir*. 16:100-113
- Kuhbandner S, Brummer S, Metzger D, Chambon P, Hofmann F, Feil R (2000) Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis*. 28:15-22
- Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M (1997) Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*. 272:12257-12260
- Kwon S, Lee WJ, Fang LH, Kim B, Ahn HY (2003) Mitogen-activated protein kinases partially regulate endothelin-1-induced contractions through a myosin light chain phosphorylation-independent pathway. *J Vet Med Sci*. 65:225-230
- Kyttaris VC, Tsokos GC (2007) Syk kinase as a treatment target for therapy in autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 124:235-237
- Lach-Trifilieff E, Menear K, Schweighoffer E, Tybulewicz VL, Walker C (2000) Syk-deficient eosinophils show normal interleukin-5-mediated differentiation, maturation, and survival but no longer respond to FcγR activation. *Blood*. 96:2506-2510
- Lai JY et al. (2003) Potent small molecule inhibitors of spleen tyrosine kinase (Syk). *Bioorg Med Chem Lett*. 13:3111-3114

- Lambers C, Roth M, Zhong J, Campregher C, Binder P, Burian B, Petkov V, Block LH (2013) The interaction of endothelin-1 and TGF-beta1 mediates vascular cell remodeling. *PLoS One*. 8:e73399
- Lambrecht BN, Hammad H (2012) The airway epithelium in asthma. *Nat Med*. 18:684-692
- Lannan KL, Phipps RP, White RJ (2014) Thrombosis, platelets, microparticles and PAH: more than a clot. *Drug Discov Today*. 19:1230-1235
- Larsen R, Ziegenfuß T (2013) *Beatmung: Indikationen - Techniken - Krankheitsbilder*. Springer-Verlag, 5. Auflage, 2013. ISBN: 978-3642296611.
- Law DA et al. (1999) Genetic and pharmacological analyses of Syk function in alphaIIb beta3 signaling in platelets. *Blood*. 93:2645-2652
- Lechin F, van der Dijks B, Orozco B, Lechin M, Lechin AE (1996) Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 77:245-253
- Leckie MJ et al. (2000) Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. 356:2144-2148
- Lee CK et al. (2007) Syk contributes to PDGF-BB-mediated migration of rat aortic smooth muscle cells via MAPK pathways. *Cardiovasc Res*. 74:159-168
- Lee HM, Won KJ, Kim J, Park HJ, Kim HJ, Roh HY, Lee SH, Lee CK, Kim B (2007) Endothelin-1 induces contraction via a Syk-mediated p38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat aortic smooth muscle. *J Pharmacol Sci*. 103:427-433
- Lee HM et al. (2007) Spleen tyrosine kinase participates in Src-mediated migration and proliferation by PDGF-BB in rat aortic smooth muscle cells. *Arch Pharm Res*. 30:761-769
- Lee MW, Severson DL (1994) Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. *Am J Physiol*. 267:C659-678
- Lipworth BJ (1999) Systemic adverse effects of inhaled corticosteroid therapy: A systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 159:941-955
- Littler CM, Morris KG, Jr., Fagan KA, McMurtry IF, Messing RO, Dempsey EC (2003) Protein kinase C-epsilon-null mice have decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284:H1321-1331
- Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, Fanburg BL (2004) Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ Res*. 95:579-586
- Liu YJ (2007) Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 120:238-244; quiz 245-236

- Lo Vasco VR, Pacini L, Di Raimo T, D'Arcangelo D, Businaro R (2011) Expression of phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms in human umbilical vein endothelial cells. *J Clin Pathol.* 64:911-915
- Locksley RM (2010) Asthma and allergic inflammation. *Cell.* 140:777-783
- Loscalzo J (1992) Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 327:117-119
- Lotvall J et al. (2011) Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 127:355-360
- Lowell CA (2011) Src-family and Syk kinases in activating and inhibitory pathways in innate immune cells: signaling cross talk. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:
- Maarman G, Lecour S, Butrous G, Thienemann F, Sliwa K (2013) A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulm Circ.* 3:739-756
- Mackenzie LS, Lymn JS, Hughes AD (2013) Linking phospholipase C isoforms with differentiation function in human vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 1833:3006-3012
- MacLean MR, Herve P, Eddahibi S, Adnot S (2000) 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol.* 131:161-168
- Mak VH, Melchor R, Spiro SG (1992) Easy bruising as a side-effect of inhaled corticosteroids. *Eur Respir J.* 5:1068-1074
- Mandras SA, Gilkin RJ, Jr., Pruett JA, Raspa S (2014) Pulmonary arterial hypertension: progress and challenges in the modern treatment era. *Am J Manag Care.* 20:S191-199
- Mano Y, Usui T, Kamimura H (2007) Effects of bosentan, an endothelin receptor antagonist, on bile salt export pump and multidrug resistance-associated protein 2. *Biopharm Drug Dispos.* 28:13-18
- Maron BA, Goldstein RH, Rounds SI, Shapiro S, Jankowich M, Garshick E, Moy ML, Gagnon D, Choudhary G (2013) Study design and rationale for investigating phosphodiesterase type 5 inhibition for the treatment of pulmonary hypertension due to chronic obstructive lung disease: the TADA-PHiLD (TADAlafil for Pulmonary Hypertension associated with chronic obstructive Lung Disease) trial. *Pulm Circ.* 3:889-897
- Martinez FD (2011) New insights into the natural history of asthma: primary prevention on the horizon. *J Allergy Clin Immunol.* 128:939-945
- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R (2004) The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 59:469-478
- Masuda ES, Schmitz J (2008) Syk inhibitors as treatment for allergic rhinitis. *Pulm Pharmacol Ther.* 21:461-467



- Matsubara S et al. (2006) Inhibition of spleen tyrosine kinase prevents mast cell activation and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 173:56-63
- Matsubara S, Koya T, Takeda K, Joetham A, Miyahara N, Pine P, Masuda ES, Swasey CH, Gelfand EW (2006) Syk activation in dendritic cells is essential for airway hyperresponsiveness and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 34:426-433
- Matsui T et al. (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *Embo J.* 15:2208-2216
- McGavin M, Zachary J (2009) *Pathologie der Haustiere.* Elsevier Urban & Fischer, 1. Auflage, 2009. ISBN: 9783437582509.
- McGoon MD et al. (2013) Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J Am Coll Cardiol.* 62:D51-59
- McLaughlin VV et al. (2006) Randomized study of adding inhaled iloprost to existing bosentan in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 174:1257-1263
- Meltzer EO, Berkowitz RB, Grossbard EB (2005) An intranasal Syk-kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment. *J Allergy Clin Immunol.* 115:791-796
- Meoli DF, White RJ (2009) Thrombin induces fibronectin-specific migration of pulmonary microvascular endothelial cells: requirement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 297:L706-714
- Milger K et al. (2015) Sildenafil versus nitric oxide for acute vasodilator testing in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 5:305-312
- Millar EA, Angus RM, Hulks G, Morton JJ, Connell JM, Thomson NC (1994) Activity of the renin-angiotensin system in acute severe asthma and the effect of angiotensin II on lung function. *Thorax.* 49:492-495
- Mocsai A et al. (2004) The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:6158-6163
- Mocsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA (2002) Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity.* 16:547-558
- Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329:2002-2012
- Montezano AC, Nguyen Dinh Cat A, Rios FJ, Touyz RM (2014) Angiotensin II and vascular injury. *Curr Hypertens Rep.* 16:431
- Moore WC et al. (2010) Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 181:315-323

- Morishima Y, Ano S, Ishii Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, Hizawa N (2013) Th17-associated cytokines as a therapeutic target for steroid-insensitive asthma. *Clin Dev Immunol.* 2013:609395
- Moulton BC, Fryer AD (2011) Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. *Br J Pharmacol.* 163:44-52
- Moy LY et al. (2013) Inhibition of spleen tyrosine kinase attenuates allergen-mediated airway constriction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 49:1085-1092
- Mugabe BE, Yaghini FA, Song CY, Buharalioglu CK, Waters CM, Malik KU (2010) Angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *J Pharmacol Exp Ther.* 332:116-124
- Müller SA (2008) Prüfung und Etablierung stereologischer Methoden zur Quantifizierung histomorphologischer Strukturen in experimentellen Tumoren. Berlin, Freie Univ., Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation, ISBN: 9783866645592.
- Müller W, Frings S (2009) Tier- und Humanphysiologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 4. Auflage, 2009. ISBN: 9783642004612.
- Murphy DM, O'Byrne PM (2010) Recent advances in the pathophysiology of asthma. *Chest.* 137:1417-1426
- Murray CJ, Lopez AD (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 349:1498-1504
- Naeije R, Brimiouille S, Dewachter L (2014) Biomechanics of the right ventricle in health and disease (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ.* 4:395-406
- Nair P (2014) Anti-interleukin-5 monoclonal antibody to treat severe eosinophilic asthma. *N Engl J Med.* 371:1249-1251
- Nakagome K, Matsushita S, Nagata M (2012) Neutrophilic inflammation in severe asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 158 Suppl 1:96-102
- Nakashima K, Kokubo T, Shichijo M, Li YF, Yura T, Yamamoto N (2004) A novel Syk kinase-selective inhibitor blocks antigen presentation of immune complexes in dendritic cells. *Eur J Pharmacol.* 505:223-228
- Nath P et al. (2006) Importance of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in allergic airway remodelling and bronchial hyperresponsiveness. *European journal of pharmacology.* 544:160-167

- Nationale Versorgungsleitlinie Asthma (2013) Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) Nationale Versorgungsleitlinie Asthma Kurzfassung, 2. Auflage, Version 5. 2009 [online]. Letzte Aktualisierung: August 2013, erhältlich im Internet unter: <http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/asthma> [Stand: 03.10.2015]; DOI: 10.6101/AZQ/000163.
- Nicolls MR, Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, Badesch DB, Voelkel NF (2005) Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur Respir J.* 26:1110-1118
- Noh DY, Shin SH, Rhee SG (1995) Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1242:99-113
- Nwariaku FE, Rothenbach P, Liu Z, Zhu X, Turnage RH, Terada LS (2003) Rho inhibition decreases TNF-induced endothelial MAPK activation and monolayer permeability. *J Appl Physiol* (1985). 95:1889-1895
- Ochocka AM, Grden M, Sakowicz-Burkiewicz M, Szutowicz A, Pawelczyk T (2008) Regulation of phospholipase C-delta1 by ARGHAP6, a GTPase-activating protein for RhoA: possible role for enhanced activity of phospholipase C in hypertension. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:2264-2273
- Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, Elliott JD, Sung CP (1992) The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *European journal of pharmacology.* 225:347-350
- Olin JT, Wechsler ME (2014) Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. *Bmj.* 349:g5517
- Oliver JM, Burg DL, Wilson BS, McLaughlin JL, Geahlen RL (1994) Inhibition of mast cell Fc epsilon R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J Biol Chem.* 269:29697-29703
- Olivieri D, Chetta A (2014) Therapeutic perspectives in vascular remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Chem Immunol Allergy.* 99:216-225
- Olsson KM, Meyer B, Hinrichs J, Vogel-Claussen J, Hoepfer MM, Cebotari S (2014) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Dtsch Arztebl Int.* 111:856-862
- Ortega HG et al. (2014) Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. *N Engl J Med.* 371:1198-1207
- Partovian C, Adnot S, Raffestin B, Louzier V, Levame M, Mavier IM, Lemarchand P, Eddahibi S (2000) Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23:762-771
- Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L, Stewart S (2007) An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 30:104-109

- Peacock AJ (1999) Primary pulmonary hypertension. *Thorax*. 54:1107-1118
- Penton PC, Wang X, Amatullah H, Cooper J, Godri K, North ML, Khanna N, Scott JA, Chow CW (2013) Spleen tyrosine kinase inhibition attenuates airway hyperresponsiveness and pollution-induced enhanced airway response in a chronic mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 131:512-520 e511-510
- Pfeifer M (2013) Der kritisch chronisch kranke Patient aus pneumologischer Sicht. *Med Klin Intensivmed Notfmed*. 108:279-284
- Pietra GG et al. (1989) Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation*. 80:1198-1206
- Pousada G, Balaira A, Valverde D (2015) Molecular and clinical analysis of TRPC6 and AGTR1 genes in patients with pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis*. 10:1
- Preston IR, Sagliani KD, Roberts KE, Shah AM, Desouza SA, Howard W, Brennan J, Hill NS (2013) Comparison of acute hemodynamic effects of inhaled nitric oxide and inhaled epoprostenol in patients with pulmonary hypertension. *Pulm Circ*. 3:68-73
- Pritzkeleit R, Beske F, Katalinic A (2010) [Disease numbers in pneumology - a projection to 2060]. *Pneumologie*. 64:535-540
- Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G (2009) Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology (Bethesda)*. 24:342-356
- Pulido T et al. (2013) Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 369:809-818
- Pullamsetti SS et al. (2012) Role of Src tyrosine kinases in experimental pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32:1354-1365
- Rabe KF, Tenor H, Dent G, Schudt C, Nakashima M, Magnussen H (1994) Identification of PDE isozymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE inhibitors. *Am J Physiol*. 266:L536-543
- Reber L, Da Silva CA, Frossard N (2006) Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *European journal of pharmacology*. 533:327-340
- Redhu NS, Saleh A, Shan L, Gerthoffer WT, Kung SK, Halayko AJ, Lamkhioued B, Gounni AS (2009) Proinflammatory and Th2 cytokines regulate the high affinity IgE receptor (FcεRI) and IgE-dependant activation of human airway smooth muscle cells. *PLoS One*. 4:e6153
- Reiter J, Demirel N, Mendy A, Gasana J, Vieira ER, Colin AA, Quizon A, Forno E (2013) Macrolides for the long-term management of asthma--a meta-analysis of randomized clinical trials. *Allergy*. 68:1040-1049

- Rhee CK, Kang JY, Park CK, Lee SY, Kwon SS, Kim YK, Yoon HK (2014) Effect of nilotinib on airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *Exp Lung Res.* 40:199-210
- Rhee CK et al. (2011) Effect of imatinib on airway smooth muscle thickening in a murine model of chronic asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 155:243-251
- Rogers DF (2002) Pharmacological regulation of the neuronal control of airway mucus secretion. *Curr Opin Pharmacol.* 2:249-255
- Rohen JW, Lütjen-Decroll E (2005) Funktionelle Anatomie des Menschen: Lehrbuch der makroskopischen Anatomie nach funktionellen Gesichtspunkten. 11. Auflage. Schattauer 2005. ISBN: 9783794524402.
- Rosenfeldt HM, Amrani Y, Watterson KR, Murthy KS, Panettieri RA, Jr., Spiegel S (2003) Sphingosine-1-phosphate stimulates contraction of human airway smooth muscle cells. *Faseb J.* 17:1789-1799
- Roussel L et al. (2010) IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J Immunol.* 184:4531-4537
- Rubin LJ et al. (2015) Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a long-term extension study (PATENT-2). *Eur Respir J.*
- Rubin LJ et al. (2002) Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 346:896-903
- Rubin LJ, Mendoza J, Hood M, McGoon M, Barst R, Williams WB, Diehl JH, Crow J, Long W (1990) Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Ann Intern Med.* 112:485-491
- Ryan JJ, Thenappan T, Luo N, Ha T, Patel AR, Rich S, Archer SL (2012) The WHO classification of pulmonary hypertension: A case-based imaging compendium. *Pulm Circ.* 2:107-121
- Saetta M, Di Stefano A, Rosina C, Thiene G, Fabbri LM (1991) Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 143:138-143
- Sahara M, Sata M, Morita T, Nakamura K, Hirata Y, Nagai R (2007) Diverse contribution of bone marrow-derived cells to vascular remodeling associated with pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation. *Circulation.* 115:509-517
- Said SI, Hamidi SA, Gonzalez Bosc L (2010) Asthma and pulmonary arterial hypertension: do they share a key mechanism of pathogenesis? *Eur Respir J.* 35:730-734
- Saijo K et al. (2003) Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat Immunol.* 4:274-279

- Sakai H, Watanabe Y, Honda M, Tsuiki R, Ueda Y, Nagai Y, Narita M, Misawa M, Chiba Y (2013) Involvement of the Tyr Kinase/JNK Pathway in Carbachol-induced Bronchial Smooth Muscle Contraction in the Rat. *Anesthesiology*. 118:1076-1085
- Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Yamaguchi I, Kobayashi M, Goto K, Sugishita Y (1996) Pulmonary hypertension caused by congestive heart failure is ameliorated by long-term application of an endothelin receptor antagonist. Increased expression of endothelin-1 messenger ribonucleic acid and endothelin-1-like immunoreactivity in the lung in congestive heart failure in rats. *J Am Coll Cardiol*. 28:1580-1588
- Sakao S et al. (2007) VEGF-R blockade causes endothelial cell apoptosis, expansion of surviving CD34+ precursor cells and transdifferentiation to smooth muscle-like and neuronal-like cells. *Faseb J*. 21:3640-3652
- Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Lee JD, Wood K, Cool CD, Voelkel NF (2005) Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *Faseb J*. 19:1178-1180
- Sastry BK, Narasimhan C, Reddy NK, Raju BS (2004) Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *J Am Coll Cardiol*. 43:1149-1153
- Sauer B (1998) Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*. 14:381-392
- Savai R et al. (2012) Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 186:897-908
- Schaafsma D, Bos IS, Zuidhof AB, Zaagsma J, Meurs H (2008) The inhaled Rho kinase inhibitor Y-27632 protects against allergen-induced acute bronchoconstriction, airway hyperresponsiveness, and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295:L214-219
- Schäfers H-J (2001) Pulmonale Hypertonie, Blackwell Wissenschaft. Schäfers, Hans-Joachim (Hrsg.). Georg-Thieme-Verlag, 2001. ISBN: 3894124830, 9783894124830.
- Schmidt R, Lang F, Heckmann M (2007) Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. Springer-Verlag, 30. Auflage, 2007. ISBN: 978-3642016509.
- Schmidt R, Thews G. (1995) Physiologie des Menschen. Springer Verlag, 26. Auflage, 1995. ISBN: 9783662093351.
- Schnyder-Candrian S et al. (2005) Dual effects of p38 MAPK on TNF-dependent bronchoconstriction and TNF-independent neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome. *J Immunol*. 175:262-269
- Sedlik C et al. (2003) A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. *J Immunol*. 170:846-852

- Seferian A, Chaumais MC, Savale L, Gunther S, Tubert-Bitter P, Humbert M, Montani D (2013) Drugs induced pulmonary arterial hypertension. *Presse Med.* 42:e303-310
- Seferian A, Simonneau G (2013) Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow? *Eur Respir Rev.* 22:217-226
- Seibler J et al. (2003) Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res.* 31:e12
- Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Luscher TF (1994) Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation.* 89:1203-1208
- Seow CJ, Chue SC, Wong WS (2002) Piceatannol, a Syk-selective tyrosine kinase inhibitor, attenuated antigen challenge of guinea pig airways in vitro. *European journal of pharmacology.* 443:189-196
- Sestini P, Cappiello V, Aliani M, Martucci P, Sena A, Vaghi A, Canessa PA, Neri M, Melani AS (2006) Prescription bias and factors associated with improper use of inhalers. *J Aerosol Med.* 19:127-136
- Shang Y (2006) Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 6:360-368
- Shaqura M (2004) Molekulare Mechanismen der Opioidrezeptor-vermittelten Signaltransduktion unter Entzündungsbedingungen. Berlin, Freie Univ., Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Dissertation. Erhältlich im Internet unter [http://edocs.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS\\_thesis\\_000000001446](http://edocs.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000001446) [Stand: 03.10.2015].
- Shaw DE, Berry MA, Hargadon B, McKenna S, Shelley MJ, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID (2007) Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma. *Chest.* 132:1871-1875
- Siegenthaler W, Blum HE (2006) *Klinische Pathophysiologie.* Georg Thieme Verlag, 9. Auflage, 2006. ISBN: 9783134496093
- Siekmeier R, Schiller-Scotland CF, Stahlhofen W, Kronenberger H (1994) [Long-term effect of the beta 2-sympathomimetic formoterol in young smokers--study of duration and site of effect of bronchodilatation using conventional methods of lung function and monodispersed aerosols]. *Pneumologie.* 48:225-230
- Simonneau G et al. (2013) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 62:D34-41
- Simonneau G et al. (2008) Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 149:521-530
- Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG (2006) Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology.* 11:54-61

- Singh B, Shinagawa K, Taube C, Gelfand EW, Pabst R (2005) Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol.* 141:223-229
- Singh TP, Rohit M, Grover A, Malhotra S, Vijayvergiya R (2006) A randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study to evaluate the efficacy of oral sildenafil therapy in severe pulmonary artery hypertension. *Am Heart J.* 151:851 e851-855
- Siroux V et al. (2011) Identifying adult asthma phenotypes using a clustering approach. *Eur Respir J.* 38:310-317
- Sitbon O et al. (2005) Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 111:3105-3111
- Soler X, Ramsdell J (2014) Anticholinergics/antimuscarinic drugs in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 14:484
- Somlyo AP, Somlyo AV (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 372:231-236
- Sompradeekul S, Wattanasiriphakdee S (2015) Hemodynamic effect of iloprost inhalation and oral sildenafil during acute vasoreactivity test in pulmonary arterial hypertension. *J Med Assoc Thai.* 98:144-149
- Soon E et al. (2010) Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 122:920-927
- Soubrier F et al. (2013) Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 62:D13-21
- Stacher E et al. (2012) Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 186:261-272
- Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D (1991) Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med.* 114:464-469
- Strange G, Playford D, Stewart S, Deague JA, Nelson H, Kent A, Gabbay E (2012) Pulmonary hypertension: prevalence and mortality in the Armadale echocardiography cohort. *Heart.* 98:1805-1811
- Stull JT, Gallagher PJ, Herring BP, Kamm KE (1991) Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. *Hypertension.* 17:723-732
- Subramanian H, Gupta K, Parameswaran N, Ali H (2014) Regulation of Fc $\epsilon$ RI signaling in mast cells by G protein-coupled receptor kinase 2 and its RH domain. *J Biol Chem.* 289:20917-20927
- Sumino K, Sugar EA, Irvin CG, Kaminsky DA, Shade D, Wei CY, Holbrook JT, Wise RA, Castro M (2012) Methacholine challenge test: diagnostic characteristics in asthmatic patients receiving controller medications. *J Allergy Clin Immunol.* 130:69-75 e66



- Sutendra G, Michelakis ED (2014) The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. *Cell Metab.* 19:558-573
- Takata M, Sabe H, Hata A, Inazu T, Homma Y, Nukada T, Yamamura H, Kurosaki T (1994) Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca<sup>2+</sup> mobilization through distinct pathways. *Embo J.* 13:1341-1349
- Takatsu K (2011) Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 87:463-485
- Takatsu K, Takaki S, Hitoshi Y (1994) Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. *Adv Immunol.* 57:145-190
- Takeda K, Hamelmann E, Joetham A, Shultz LD, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW (1997) Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. *J Exp Med.* 186:449-454
- Tantini B, Manes A, Fiumana E, Pignatti C, Guarnieri C, Zannoli R, Branzi A, Galie N (2005) Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* 100:131-138
- Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF, Tuder RM (2001) Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *Faseb J.* 15:427-438
- Tormanen KR, Uller L, Persson CG, Erjefalt JS (2005) Allergen exposure of mouse airways evokes remodeling of both bronchi and large pulmonary vessels. *Am J Respir Crit Care Med.* 171:19-25
- Tournier A, Wahl D, Chaouat A, Max JP, Regnault V, Lecompte T, Chabot F (2010) Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Thromb Res.* 126:e418-422
- Townsley MI (2012) Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Compr Physiol.* 2:675-709
- Trevor JL, Deshane JS (2014) Refractory asthma: mechanisms, targets, and therapy. *Allergy.* 69:817-827
- Tuder RM et al. (2013) Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 62:D4-12
- Tuder RM et al. (2001) Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol.* 195:367-374
- Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF (1999) Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:1925-1932

- Tuder RM, Voelkel NF (1998) Pulmonary hypertension and inflammation. *J Lab Clin Med.* 132:16-24
- Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF (1994) Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol.* 144:275-285
- Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL (2000) Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today.* 21:148-154
- Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL (1995) Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature.* 378:298-302
- Ulanova M, Marcet-Palacios M, Munoz S, Asfaha S, Kim MK, Schreiber AD, Befus AD (2006) Involvement of Syk kinase in TNF-induced nitric oxide production by airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:431-437
- van Gestel AJR, Teschler H. (2014) *Physiotherapie bei chronischen Atemwegs- und Lungenerkrankungen: Evidenzbasierte Praxis.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2. Auflage, 2014. ISBN: 9783662436776.
- van Oosterhout AJ, Motta AC (2005) Th1/Th2 paradigm: not seeing the forest for the trees? *Eur Respir J.* 25:591-593
- van Schayck CP, Folgering H, Harbers H, Maas KL, van Weel C (1991) Effects of allergy and age on responses to salbutamol and ipratropium bromide in moderate asthma and chronic bronchitis. *Thorax.* 46:355-359
- Vaupel P, Schaible H-G, Mutschler E (2007) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 6. Auflage, 2007. ISBN: 9783804723429.
- Voelkel NF, Cool C, Lee SD, Wright L, Geraci MW, Tuder RM (1998) Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest.* 114:225S-230S
- Voelkel NF, Tuder RM (1995) Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 8:2129-2138
- von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, Vogt K, Volk HD, Muller KM, Wendel A, Uhlig S (1998) Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:263-272
- Vroman H, van den Blink B, Kool M (2014) Mode of dendritic cell activation: The decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity? *Immunobiology.*
- Wagenvoort CA (1960) Vasoconstriction and medial hypertrophy in pulmonary hypertension. *Circulation.* 22:535-546

- Walsh MP, Horowitz A, Clement-Chomienne O, Andrea JE, Allen BG, Morgan KG (1996) Protein kinase C mediation of Ca<sup>2+</sup>-independent contractions of vascular smooth muscle. *Biochem Cell Biol.* 74:485-502
- Wang JJ, Rochtchina E, Tan AG, Cumming RG, Leeder SR, Mitchell P (2009) Use of inhaled and oral corticosteroids and the long-term risk of cataract. *Ophthalmology.* 116:652-657
- Wang X, Khanna N, Wu J, Godri Pollitt K, Evans GJ, Chow CW, Scott JA (2015) Syk mediates airway contractility independent of leukocyte function. *Allergy.* 70:429-435
- Ward JP, Knock GA, Snetkov VA, Aaronson PI (2004) Protein kinases in vascular smooth muscle tone--role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pharmacol Ther.* 104:207-231
- Warner SM, Knight DA (2008) Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 8:44-48
- Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB (2010) An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 363:1303-1312
- Weinblatt ME et al. (2008) Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 58:3309-3318
- Weir EK, Archer SL (1995) The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *Faseb J.* 9:183-189
- Wendling O, Bornert JM, Chambon P, Metzger D (2009) Efficient temporally-controlled targeted mutagenesis in smooth muscle cells of the adult mouse. *Genesis.* 47:14-18
- Wenzel SE (2012) Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med.* 18:716-725
- Wex E, Thaler E, Blum S, Lamb D (2014) A novel model of IgE-mediated passive pulmonary anaphylaxis in rats. *PLoS One.* 9:e116166
- Wex E, Bouyssou T, Duechs MJ, Erb KJ, Gantner F, Sanderson MP, Schnapp A, Stierstorfer BE, Wollin L (2011) Induced Syk deletion leads to suppressed allergic responses but has no effect on neutrophil or monocyte migration in vivo. *Eur J Immunol.* 41:3208-3218
- Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, Phillips SC, Wilkins MR (2005) Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 172:105-113
- White RJ et al. (2007) Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293:L583-590

- Wilkins MR, Gibbs JS, Shovlin CL (2000) A gene for primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 356:1207-1208
- Witzenrath M, Ahrens B, Kube SM, Hocke AC, Rosseau S, Hamelmann E, Suttorp N, Schutte H (2006) Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness. *Eur Respir J*. 28:370-377
- World Health Organisation* (WHO) (2014) Global Action Plan for the Prevention and Control of NCDs 2013-2020 [online]. Letzte Aktualisierung: 2014, erhältlich im Internet unter [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/94384/1/9789241506236\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/94384/1/9789241506236_eng.pdf) [Stand: 03.10.2015].
- World Health Organisation* (WHO) (2007) Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: A comprehensive approach [online, pdf]. Letzte Aktualisierung: 2007, erhältlich im Internet unter [http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241563468\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241563468_eng.pdf?ua=1) [Stand: 03.10.2015].
- Wright DB, Tripathi S, Sikarwar A, Santosh KT, Perez-Zoghbi J, Ojo OO, Irechukwu N, Ward JP, Schaafsma D (2013) Regulation of GPCR-mediated smooth muscle contraction: implications for asthma and pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther*. 26:121-131
- Wright L, Tuder RM, Wang J, Cool CD, Lepley RA, Voelkel NF (1998) 5-Lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) immunoreactivity in lungs from patients with primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 157:219-229
- Yaghini FA, Li F, Malik KU (2007) Expression and mechanism of spleen tyrosine kinase activation by angiotensin II and its implication in protein synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 282:16878-16890
- Yamamoto N et al. (2003) The orally available spleen tyrosine kinase inhibitor 2-[7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylamino]nicotinamide dihydrochloride (BAY 61-3606) blocks antigen-induced airway inflammation in rodents. *J Pharmacol Exp Ther*. 306:1174-1181
- Yanagi S, Inatome R, Ding J, Kitaguchi H, Tybulewicz VL, Yamamura H (2001) Syk expression in endothelial cells and their morphologic defects in embryonic Syk-deficient mice. *Blood*. 98:2869-2871
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 332:411-415

- Yang L, Yatomi Y, Hisano N, Qi R, Asazuma N, Satoh K, Igarashi Y, Ozaki Y, Kume S (1996) Activation of protein-tyrosine kinase Syk in human platelets stimulated with lysophosphatidic acid or sphingosine 1-phosphate. *Biochem Biophys Res Commun.* 229:440-444
- Zaiman A, Fijalkowska I, Hassoun PM, Tudor RM (2005) One hundred years of research in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33:425-431
- Zamora MA, Dempsey EC, Walchak SJ, Stelzner TJ (1993) BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 9:429-433
- Zhang J, Mendoza M, Guiraldelli MF, Barbu EA, Siraganian RP (2010) Small interfering RNA screen for phosphatases involved in IgE-mediated mast cell degranulation. *J Immunol.* 184:7178-7185
- Zhao YY et al. (2009) Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. *J Clin Invest.* 119:2009-2018

## 9 ANHANG

### 9.1 Materialien

#### 9.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und andere Substanzen

2-Propanol, zur Analyse	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Acetyl- $\beta$ -methylcholin chloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agar-Agar	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Albumin, from chicken egg white, Grade V	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Alu-Gel-S, 1,3 %	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Angiotensin II, Human	Merck/Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad injectabilia (10 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bio-Plex Pro™ Assay	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Bisindolylmaleimide Hydrochloride I (Protein-kinase C-Inhibitor)	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin Fraction V, pH 7,0	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Braunol®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Clarion Permanent mounting Media	Biomedica Corporation, Foster City, Kalifornien, USA
Complete™ Mini	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's PBS without Ca & Mg (1X)	Gibco® Life Technologies GmbH, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Elektrolytlösung II N	SERAG Wiessner KG, Naila, Deutschland
Endothelin-1, human and porcine	Merck/ Calbiochem, Darmstadt, Deutschland

**Chemikalien, Reagenzien, Puffer und andere Substanzen (fortgeführt)**

Entellan®	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 5 %	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, absolut reinst	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 1 %, 10 mg/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 IE, 5 ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Indomethacin, >99 % (TLC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol molecular biology grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ketavet Injektionslösung 100 mg/ml	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
May-Grünwald-Eosin-Methylenblau-Lösung	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Methanol >99,5 %, reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methylviolett	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, blotting grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (Pulver)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natrium-Citrat Dihydrogenat	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Dodecylsulfat	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

**Chemikalien, Reagenzien, Puffer und andere Substanzen (fortgeführt)**

N <sub>ω</sub> -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
OVA-Biotin, 0,5 g/ml	Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin, Deutschland
p38 MAPK-Inhibitor SB 203580	Merck/ Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PCR Core Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Phosphatpuffer pH 7,2	Waldeck GmbH, Münster, Deutschland
Proteinase K, lyophilized	Novagen, Darmstadt, Deutschland
Rho-Kinase Inhibitor Y-27632	Merck/ Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Rompun 2 % Injektionslösung (Xylazinhydrochlorid)	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Roticlear	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Serotonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln, Deutschland
Sphingosin-1-phosphate, > 95 %, powder	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Sunflower Seed Oil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Syk-Inhibitor BAY 61-3606	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Syk-Inhibitor R406	Rigel Pharmaceuticals, San Francisco, USA
Tamoxifen Free base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TMB Soluble	Merck/ Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Tris Pufferan® ≥ 99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
U46619	Merck/ Calbiochem, Darmstadt, Deutschland



**Chemikalien, Reagenzien, Puffer und andere Substanzen (fortgeführt)**

Ultra-Pure™ Agarose	Invitrogen® Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vector Mouse on Mouse Immunodetection Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Wasserstoffperoxid	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland

**9.1.2 Verbrauchsmaterialien**

BD Falcon™ 50 ml und 15 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Falcon™ 5 ml Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Microlance™ 3 (27 G Kanülen)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Deckgläschen, versch. Größen	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einbettkassetten Rotilabo	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Feather Trimming Blade No. 260, Type (L)	pfm medical AG, Köln, Deutschland
Handschuhe DermaClean	Ansell Healthcare Europe, Brüssel, Belgien
Mikrotest-Platte 96-Well F	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Reaktionsgefäß safe seal (0,5/ 1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (2/ 5/ 10/ 25 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Shandon Filter Cards	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Spritzen BD Discardit™ II (2 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Spritzen BD Plastipak™ (1 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Stainless steel feeding needles	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande
Superfrost Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland

### 9.1.3 Arbeitsplatz der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge

Aufsatz nach Drechsel (mit Filterplatte, zur CO <sub>2</sub> -Begasung)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bad-/Umwälzthermostat Ecoline E103	Lauda Dr. R. Wobster GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Beatmungsgas (5 % CO <sub>2</sub> , 20 % O <sub>2</sub> , 75 % N <sub>2</sub> )	Abteilung Technische Gase, Charité - Universitätsmedizin Berlin
Differentialdruckaufnehmer MPX Typ 399/2 und Validyne DP 45-14	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Druckaufnehmer P75 Typ 379	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Peristaltikpumpe Ismatec® Reglo-Analog	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
Plexiglaskammer (Größe 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Plugsys®-Grundgerät mit Messmodulen (CFBA, TAM-A, VCM, TCM)	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tracheal cannula for mouse, OD 1,3 mm, L 15 mm	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland

### 9.1.4 Geräte

Aerosol-Expositions-System AES-0702	FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland
Axioskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Bio-Plex™ Array Reader	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Bio-Plex™ Millipore	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Bio-Plex™ Workstation	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

**Geräte (fortgeführt)**

Coverplate Slide Racks & Immunfärbecenter	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Dampfgarer Multi Gourmet	Braun GmbH, Kronberg/ Taunus, Deutschland
ELISA-Reader HT-2	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Gel Jet Imager Version 2004	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Gel-Laufkammer SUB-CELL GT	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
IKA R- Schüttler MTS 2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Konfokal-Mikroskop	Olympus Corporation, Hamburg, Deutschland
Lungen-Slicer	Sonderanfertigung von Jesper Damm, Dänemark
Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Microm HM 355 S Cool Cut	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Mikrowelle	BOSCH Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toledo FiveEasy pH, Gießen, Deutschland
Photometer HT-2	anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Power Pac 300 Stromquelle für Gel-Laufkammer	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Shandon Cytospin 3 Zentrifuge	Harlow Scientific, Arlington, Massachusetts, USA
Spektral-Konfokalmikroskop (LSM 780)	Zeiss, Jena, Deutschland
T1 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

**Geräte (fortgeführt)**

Tissue-Tek® Xpress®	Sakura Finetek, Breisgau, Deutschland
Ultraschall-Aerosolgenerator	FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim/ Ober-Beerbach, Deutschland
Waage (Model CS200)	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Wärmeplatte	Medax GmbH, Neumünster, Deutschland

**9.1.5 Antikörper**

Alexa Fluor 488 F(ab)2 goat anti rabbit IgG (H+L)	Invitrogen® Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Anti-murin IgE unlabeled (purified Rat anti Mouse IgE)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Biotin rat anti mouse IgG1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Monoclonal Anti-Actin, $\alpha$ -smooth muscle antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
OVA-14 IgG1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Syk (N-19) Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Syk (N-19) P, blocking peptide	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA

**9.1.6 Software**

Bio-Plex™ Manager Version 4.1.1	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA
NewCAST™	Visiopharm, Hoersholm, Dänemark
Pulmodyn®	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die in der IPML eingesetzten Vaso- und Bronchokonstriktoren.....	37
Tabelle 2:	Übersicht über die in der IPML eingesetzten Inhibitoren.....	38
Tabelle 3:	Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion. ....	44
Tabelle 4:	Anzahl der Basenpaare des Syk-Gens in Syk <sup>flox/flox</sup> -, Syk <sup>del/del</sup> - und Wildtyp-Mäusen.....	44
Tabelle 5:	Relevante Zählereignisse bei der Auswertung der $\alpha$ -sma-gefärbten Lungenschnitte und Formel zur Berechnung der arteriellen Muskelzellschichtdicke. ....	50
Tabelle 6:	Untersuchungsgruppen. ....	70

### 9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Arbeitsplatzes der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge.....	35
Abbildung 2: Schematischer Ablauf eines IPML-Experiments mit Inhibitor-Applikation.....	39
Abbildung 3: Schematischer Verlauf der Perfusionsfluss (Q)-Druck-Kurve.....	40
Abbildung 4: Versuchsprotokoll für das Modell der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Inflammation.....	43
Abbildung 5: <i>Orientalor-Clock</i> mit 20 Teilstrichen gleichen Abstands (Howard et al. 2005). .....	49
Abbildung 6: Die Expression der Milztyrosinkinase (Syk) in humanen Atemwegen. ....	51
Abbildung 7: Die Expression der Milztyrosinkinase (Syk) in humanen Pulmonalarterien. ...	52
Abbildung 8: Die Expression der Milztyrosinkinase (Syk) in Atemwegen (AW) und Pulmonalarterien (P) der murinen Lunge. ....	53
Abbildung 9: Der Einfluss des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 auf den basalen pulmonalarteriellen Mitteldruck. ....	54
Abbildung 10: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität. ....	55
Abbildung 11: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion.....	56
Abbildung 12: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die Perfusionsfluss-induzierte Druckänderung unter Normoxie und Hypoxie. ....	57
Abbildung 13: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch R406 auf den basalen pulmonalarteriellen Mitteldruck und die pulmonalvaskuläre Reagibilität. ....	58
Abbildung 14: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität bei Proteinkinase C $\alpha$ -Defizienz. ....	59
Abbildung 15: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf präkonstringierte pulmonale Gefäße. ....	60

Abbildung 16: Der Einfluss der Inhibition von Syk durch BAY 61-3606, von Rho-Kinase durch Y-27632, von PKC durch BIM und von p38 MAPK durch SB 203580 auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität.....	62
Abbildung 17: Der Einfluss des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 auf den basalen Atemwegswiderstand.....	63
Abbildung 18: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die Atemwegsreagibilität.....	64
Abbildung 19: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf die Atemwegsreagibilität bei Proteinkinase C $\alpha$ -Defizienz. ....	65
Abbildung 20: Der Einfluss der Syk-Inhibition durch BAY 61-3606 auf präkonstringierte Bronchien. ....	67
Abbildung 21: Der Einfluss der Inhibition von Syk durch BAY 61-3606, von Rho-Kinase durch Y-27632 und von PKC durch BIM auf die Atemwegsreagibilität. ....	68
Abbildung 22: Der Einfluss der Inhibition von Syk durch BAY 61-3606 und von p38 MAPK durch SB 203580 auf die Atemwegsreagibilität.....	69
Abbildung 23: Der Nachweis der Tamoxifen-induzierten Syk-Deletion mittels Polymerase-Kettenreaktion und anschließender Gel-Elektrophorese. ....	71
Abbildung 24: Der Nachweis der Tamoxifen-induzierten Syk-Deletion in Milzen mittels Western Blot-Analyse. ....	72
Abbildung 25: Der basale pulmonalarterielle Mitteldruck in den Untersuchungsgruppen. ....	73
Abbildung 26: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität in der chronischen pulmonalen T $_H$ 2-Inflammation.....	74
Abbildung 27: Der basale Atemwegswiderstand in den Untersuchungsgruppen. ....	75
Abbildung 28: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die Atemwegsreagibilität in der chronischen pulmonalen T $_H$ 2-Inflammation.....	76
Abbildung 29: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die Gesamtzellzahl pro ml BALF in der chronischen pulmonalen T $_H$ 2-Inflammation.....	78
Abbildung 30: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die Leukozytenrekrutierung in der BALF in der chronischen pulmonalen T $_H$ 2-Inflammation. ....	79

---

Abbildung 31: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die Bildung Ovalbumin-spezifischer Immunglobuline in der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Inflammation. ....	81
Abbildung 32: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die IL-5-, IL-6- und RANTES-Spiegel in der BALF in der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Inflammation. ....	83
Abbildung 33: Der Einfluss der Syk-Deletion auf die Muskelschichtdicke pulmonaler Arterien in der chronischen pulmonalen T <sub>H</sub> 2-Inflammation.....	84



## **10 FÖRDERUNG**

Diese Arbeit wurde unterstützt durch Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, Deutschland.

Die Finanzierung der Doktorandenposition erfolgte durch ein Promotionsstipendium der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

## 11 PUBLIKATIONSLISTE

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Vorträge/Abstrakte:

- 1) Tabeling C, Herbert J, Hocke AC, Doehn JM, Hippenstiel S, Kübler WM, Suttorp N, Witzenrath M.  
„Die Inhibition der Milztyrosinkinase induziert Bronchodilatation in der isolierten Mauslunge.“  
Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, 14. - 15.11.2014 in Lübeck.  
Pneumologie 2015; 69 - A30; DOI: 10.1055/s-0035-1548660
  
- 2) Tabeling C, Herbert J, Hocke AC, Doehn JM, Hippenstiel S, Kübler WM, Suttorp N, Witzenrath M.  
„Der Milztyrosinkinase-Inhibitor BAY 61-3606 ist ein effektiver Bronchodilatator in der isolierten Mauslunge.“  
56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, 18. - 21.3.2015 in Berlin.  
Pneumologie 2015; 69 - V461; DOI: 10.1055/s-0035-1544603

Eigenbeitrag bei beiden Vorabveröffentlichungen:

Vorbereitung und Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbungen zur Determinierung des Syk-Expressionsprofils in humanem und murinem Lungengewebe, Gewinnung des murinen Lungengewebes für die Analysen, Anfertigung und Auswertung der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des murinen Lungengewebes. Vorbereitung und Durchführung aller experimentellen Untersuchungen zum Wirkpotenzial des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (Untersuchung des basalen Atemwegwiderstandes sowie der bronchialen Reagibilität nach Einsatz relevanter Bronchokonstriktoren nach Syk-Inhibition durch BAY-61-3606, Untersuchung des BAY-61-3606-Effektes in präkonstringierten Bronchien), einschließlich Versuchsdatenauswertung und statistischer Datenanalyse. Vorbereitung und Durchführung aller Untersuchungen zu potenziellen Syk-Inhibitor-Effekten auf die intrazelluläre Signaltransduktion bei alleiniger bzw. simultaner Hemmung von Syk durch BAY-61-3606, Rho-Kinase durch Y-27632, Proteinkinase C durch *Bisindolylmaleimide I, Hydrochloride* sowie p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase durch SB 203580, einschließlich Versuchsdatenauswertung und statistischer Datenanalyse.

## 12 DANKSAGUNG

Der erfolgreiche Abschluss dieser umfangreichen Arbeit wäre ohne die tatkräftige Unterstützung vieler besonderer Menschen nicht möglich gewesen, bei denen ich mich im Folgenden gern bedanken möchte.

In erster Linie möchte ich mich bedanken bei **Herrn Univ.-Prof. Dr. Martin Witzenrath**, Arbeitsgruppenleiter im Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, für die Möglichkeit, als Teil seiner Arbeitsgruppe dieses spannende Projekt zu bearbeiten, für die unbegrenzte Bereitstellung der notwendigen Ressourcen sowie für seine Unterstützung und konstruktiven fachlichen Ratschläge und Ideen.

Besonders danken möchte ich auch **Herrn Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D. (Cornell University)**, geschäftsführender Direktor des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, für seine Bereitschaft, meine Dissertation unter veterinärmedizinischen Gesichtspunkten zu betreuen und für die Möglichkeit, die Arbeit über das Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin einreichen zu können. Ebenso danken möchte ich für die Bereitstellung seiner Ressourcen und Mitarbeiter für die Anfertigung der murinen und humanen Lungengewebeschnitte.

Bei **Herrn Prof. Dr. Heinz Fehrenbach**, Leiter der Forschungsgruppe Experimentelle Pneumologie im Programmbereich Asthma und Allergie des Leibniz-Zentrums für Medizin und Biowissenschaften Borstel, möchte ich mich für die Einladung in seine Arbeitsgruppe, die uneingeschränkte Bereitstellung seiner Ressourcen und Mitarbeiter sowie für seinen fachlichen Rat und seine Hilfe bei der Auswertung der stereologischen Daten bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch **Herrn Dr. Andreas Hocke** und **Frau Johanna Berg**, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, für die Bereitstellung des humanen Lungengewebes, die fundierte Einarbeitung in das Gebiet der Immunfluoreszenz sowie für die immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen des humanen Lungengewebes und das stets offene Ohr bei Fragen und Problemen.

**Herrn Dr. Christoph Tabeling** möchte ich danken für seine engagierte Betreuung und fundierte Einarbeitung, seinen konstruktiven fachlichen Rat sowie seine stete Bereitschaft, Fragen zu klären.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem **Frau Birgitt Gutbier** sowie **Frau Dr. Katrin Reppe** für die eingehende und engagierte Einarbeitung, ihre uneingeschränkte Hilfe und ihre Rolle als Ansprechpartner bei Sorgen und Nöten, und **Frau Dr. Jasmin Lienau**, für ihre äußerst nützlichen Tipps und Anmerkungen bei der Korrektur dieser Arbeit.

**Herrn Dr. David Lamb** und **Frau Dr. Eva Wex**, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, möchte ich für die Bereitstellung der induzierbaren Syk-Mäuse sowie für die Durchführung der Western Blot-Analyse danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei **Frau Kristina Dietert, Ph.D**, Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, für ihren Beitrag bei der Arbeit mit den Lungengewebeschnitten sowie für ihre Motivation und stetig gute Laune.

Ohne die Unterstützung und den Ansporn des **gesamten Laborteams** wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen, deshalb möchte ich mich ganz besonders bedanken bei Frau Dr. Sandra-Maria Wienhold, Frau Elena Noe, Frau Katharina Hellwig, Frau Carolin Ehrler, Frau Denise Barthel, Frau Katja Fischer, Frau Anne-Kathrin Neuhauß sowie Frau Carla Rosa González Calera, für die aufmunternden und motivierenden Gespräche, die offenen Ohren bei Sorgen und Problemen und für die allseits gute Stimmung, die es zu so einer Freude gemacht hat, mit euch zusammen zu arbeiten.

Mein ganz besonderer und lieber Dank gilt **Frau Dr. Sandra-Maria Wienhold**, für ihren Beistand und ihre Freundschaft, für die tolle gemeinsam erlebte Zeit mit ihren Höhen und Tiefen und dafür, dass sie immer für mich da ist.

Auch **meinen Eltern** möchte ich von ganzem Herzen danken für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Liebe. Ohne eure Motivation und euren Glauben an mich hätte ich es mir nicht zugetraut, diesen Weg zu gehen.

Schließlich gilt mein Dank meiner gesamten Familie und meinen Freunden, für den Beistand in allen Lebenslagen.

## **13 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 31.08.2016

Julia Herbert