

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und der
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Die Rolle des Endothelin-B-Rezeptors in der pulmonalen T_H2-Inflammation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Carla Rosa González Calera
Tierärztin aus Bochum

Berlin 2022
Journal-Nr.: 4354

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und der
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Charité - Universitätsmedizin Berlin**

**Die Rolle des Endothelin-B-Rezeptors
in der pulmonalen T_H2-Inflammation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Carla Rosa González Calera
Tierärztin
aus Bochum**

**Berlin 2022
Journal Nr.: 4354**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Martin Witzernath
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, animal models, lungs, inflammation, Th2 mediated response, respiration, lung function, pleura, arteries, hypertension, blood pressure, collagen, cytokines, thromboxanes, bronchoalveolar lavage fluid, (MeSH)

Tag der Promotion: 25.05.2022

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-96729-166-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2022

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

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 2022 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Ich widme diese Arbeit denen, die während der Zeit meiner Promotion von mir gegangen sind

Prof. Dr. Karin Bruns (KB), danke für die Flügel und die Wurzeln

Anna-Clara Carlstedt, danke für deine wunderbare Freundschaft, sie wird mir mein Leben lang fehlen

Uli Benninghoven, danke, dass du mein ganzes Leben für mich da warst

Hannelore Bruns, danke, dass ich deine Enkelin sein durfte

Meinem Sternenkind

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	10
Abkürzungsverzeichnis.....	11
1. Einleitung	15
2. Literatur.....	17
2.1. Pulmonalarterielle Hypertonie	17
2.1.1. PAH und Inflammation.....	19
2.1.2. Endotheliale Dysfunktion	20
2.1.3. Pulmonale Vasokonstriktion und pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität.....	21
2.1.4. Pulmonalarterielles <i>Remodeling</i>	22
2.1.5. Therapeutische Möglichkeiten	24
2.1.6. Besonderheiten der murinen und humanen Lunge	26
2.1.7. Pulmonale T _H 2-Inflammation als Modell der PAH	27
2.2. Das Endothelin-System.....	29
2.2.1. Endothelin-Rezeptoren.....	31
2.2.2. Endothelin-Signalkaskaden	33
3. Material und Methoden.....	37
3.1. Tiere	37
3.2. Tierhaltung	38
3.3. Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge (IPML).....	38
3.3.1. Isolierung von Lunge und Organen.....	38
3.3.2. Analyse der pulmonalvaskulären Reagibilität.....	39
3.3.3. Geräte und Software	40
3.4. Materialentnahme	42
3.4.1. Blutentnahme	42
3.4.2. Bronchoalveoläre Lavage	43
3.4.3. Lungenentnahme.....	43
3.4.4. Rechtsherzanalyse	44
3.5. Zelldifferenzierung	44
3.6. Modell der pulmonalen T _H 2-Inflammation.....	45
3.7. Quantifizierung von Ovalbumin-spezifischem Immunglobulin E	46
3.8. Quantifizierung von Ovalbumin-spezifischem Immunglobulin G1	47
3.9. Thromboxan-B ₂ -Quantifizierung	48
3.10. Quantifizierung des vasoaktiven intestinalen Peptids.....	49

3.11. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	49
3.12. Zytokinbestimmung aus der BALF	50
3.13. Chemikalien, Puffer, <i>Kits</i> , Reagenzien und Geräte.....	52
3.14. Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien	56
3.15. Statistische Datenanalyse	59
4. Ergebnisse	61
4.1. Effekte der ETB-Defizienz auf das pulmonale Gefäßsystem	61
4.1.1. Funktionelle Analysen in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge, basaler pulmonalarterieller Mitteldruck und dynamische <i>Compliance</i>	61
4.1.2. ETB-Defizienz ist mit rechtsventrikulärer Hypertrophie assoziiert	62
4.1.3. Splenomegalie in ETB-defizienten Mäusen	64
4.1.4. Lymphozyten in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von jungen ETB-defizienten Mäusen erhöht	65
4.2. Die Effekte der ETB-Defizienz auf PAH-assoziierte (Gefäß-) Veränderungen in der pulmonalen T _H 2-Inflammation	67
4.2.1. Pulmonalarterieller Mitteldruck und dynamische <i>Compliance</i> in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge	67
4.2.2. Einfluss der ETB-Defizienz auf die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität.....	68
4.2.3. Pulmonale T _H 2-Inflammation aggraviert die Rechtsherzhypertrophie bei Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz	70
4.2.4. T _H 2-induzierte Splenomegalie ist in ETB-defizienten Mäusen ausgeprägter	71
4.2.5. Verstärkte T _H 2-induzierte perivaskuläre Inflammation infolge von ETB-Defizienz	72
4.2.6. ETB-Defizienz hat eine verstärkte pulmonale T _H 2-Inflammation zur Folge	73
4.2.7. Die pulmonale Induktion der T _H 2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 erfolgt unabhängig von ETB.....	75
4.2.8. ETB-Defizienz hat eine verstärkte humorale Immunantwort auf Ovalbumin zur Folge.....	76
4.2.9. ETB-Defizienz führt zu einer verstärkten pulmonalen Endothelin-1-Expression infolge von T _H 2-Inflammation.....	77
4.2.10. Kein Einfluss der ETB-Defizienz auf den Plasmaspiegel des vasoaktiven intestinalen Peptids	78
4.2.11. Thromboxan-Freisetzung infolge ET-1-Applikation	79
4.3. Altersabhängige Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression.....	81
4.3.1. Die Überexpression von Prepro-Endothelin-1 (ET ^{tg}) führt zu einem Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks	81

4.3.2. Altersabhängige Effekte der Prepro-ET-1-Überexpression auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität.....	82
4.3.3. Chronische Prepro-ET-1-Überexpression induziert Rechtsherzhypertrophie	83
4.3.4. Erhöhte Lymphozytenzahl in der bronchoalveoläre Lavage-Füssigkeit der gealterten ET ^{tg} -Mäuse	84
4.3.5. Altersabhängige Splenomegalie infolge der Prepro-ET-1-Überexpression.....	85
5. Diskussion.....	87
6. Zusammenfassung	95
7. Summary.....	97
8. Literaturverzeichnis	99
9. Publikationsverzeichnis	121
9.1. Originalarbeiten.....	121
9.2. Vorträge und Poster.....	121
10. Danksagung	123
11. Finanzierungsquellen – <i>Funding Sources</i>	124
12. Interessenskonflikte – <i>Conflict of Interest</i>	124
13. Selbstständigkeitserklärung	124

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Schematischer Aufbau der Untersuchungseinheit der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML)
- Abbildung 2 Schematischer Versuchsaufbau zum Modell der pulmonalen T_H2-Inflammation
- Abbildung 3 Altersabhängige Effekte der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz auf pulmonalarteriellen Mitteldruck und dynamische *Compliance*
- Abbildung 4 Effekte der Endothelin-Rezeptoren A und B auf die pulmonale Vasokonstriktion
- Abbildung 5 Effekte der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz (ETB^{-/-}) auf das rechte Herz
- Abbildung 6 Milz- (A) und Lebergewicht (B) in Relation zum Körpergewicht (KG) von 8-12 Wochen (Wo) und 6 Monate (Mo) alten Endothelin-B-Rezeptor-defizienten (ETB^{-/-})-Tieren und Wildtyp (WT)-Tieren
- Abbildung 7 Der altersabhängige Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz (ETB^{-/-}) auf die Leukozytenzahl in der bronchoalveolären Lavage (BAL)
- Abbildung 8 Effekte der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz und der pulmonalen T_H2-Inflammation auf pulmonalarteriellen Mitteldruck und dynamische *Compliance*
- Abbildung 9 Der Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz auf die T_H2-induzierte pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität
- Abbildung 10 Einfluss der pulmonalen T_H2-Inflammation auf die Rechtsherzhypertrophie bei Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz
- Abbildung 11 Einfluss von Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz und pulmonaler T_H2-Inflammation auf Milz- (A) und Lebergewicht (B) in Relation zum Körpergewicht (KG)
- Abbildung 12 Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz (ETB^{-/-}) auf T_H2-induzierte perivaskuläre Inflammation (A) und Kollagen-Deposition (B) in der Lunge

-
- Abbildung 13 Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz (ETB^{-/-}) auf die Gesamtzellzahl (A) und Leukozytendifferenzierung (B) in der bronchoalveolären Lavage (BAL)
- Abbildung 14 Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz (ETB^{-/-}) auf die Plasmaspiegel von Ovalbumin (OVA)-spezifischem Immunglobulin (Ig)E (A) und IgG1 (B)
- Abbildung 15 Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz (ETB^{-/-}) und der T_H2-Inflammation auf die pulmonale *messenger* Ribonukleinsäure (mRNS)-Expression
- Abbildung 16 Quantifizierung der Plasmaspiegel des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP)
- Abbildung 17 Der Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz auf die pulmonalvaskuläre Thromboxan-B₂-Freisetzung
- Abbildung 18 Altersabhängige Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf den basalen pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) und die dynamische *Compliance* (C_{dyn})
- Abbildung 19 Altersabhängige Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität
- Abbildung 20 Altersabhängige Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf den Fulton-Index
- Abbildung 21 Altersabhängige Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf die Leukozyten-Subpopulationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)
- Abbildung 22 Foto repräsentativer Milzen von 12 Monate alten Mäusen (A) und Körpergewicht in Gramm (g) von 12 Monate (Mo) alten Prepro-Endothelin-1-überexprimierenden Mäusen (ET^{tg}) im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäusen (B)
- Abbildung 23 Altersabhängiger Einfluss der Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf Milz- (A) und Lebergewicht (B) in Relation zum Körpergewicht (KG)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Primer der ET ^{tg} -Polymerase-Kettenreaktion
Tabelle 2	Applikationsdauer der Substanzen und Intervalle
Tabelle 3	Verwendete Geräte und Software für die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge
Tabelle 4	Gruppen im Modell der pulmonalen T _H 2-Inflammation
Tabelle 5	Eingesetzte Substanzen im IPML-Modell/ Bronchoalveoläre Lavage
Tabelle 6	Verwendete Substanzen für die Induktion der pulmonalen T _H 2-Inflammation
Tabelle 7	Eingesetzte Substanzen, Geräte und Software für ELISA/ EIA
Tabelle 8	Eingesetzte Substanzen und Geräte für qPCR
Tabelle 9	Eingesetzte Substanzen und Geräte für Bio-Plex
Tabelle 10	Eingesetzte Substanzen für die Zytologie und Histologie
Tabelle 11	Verwendete allgemeine Geräte
Tabelle 12	Verwendete Verbrauchsmaterialien
Tabelle 13	Zytokin- und Chemokin-Quantifizierung in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin/ Serotonin
α -SMA	α -glattes Muskelaktin
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APAH	Assoziierte pulmonalarterielle Hypertonie
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BMPR	<i>Bone morphogenetic protein receptor</i>
CaM	Calmodulin
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCN-2	Bindegewebswachstumsfaktor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cdyn	dynamische <i>Compliance</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm H ₂ O	Zentimeter Wassersäule
COX	Cyclooxygenase
CX3CR1	Fraktalkin-Rezeptor
CXCL10	Interferon- γ -induziertes Protein 10
DAG	1,2-Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC	<i>Endothelial cell</i>
ECE	Endothelin-konvertierendes Enzym
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERA	Endothelin-Rezeptor-Antagonist
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase
ET	Endothelin
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
ETA	Endothelin-A-Rezeptor

Abkürzungsverzeichnis

ETB	Endothelin-B-Rezeptor
ETB ^{-/-}	Endothelin-B-Rezeptor-defizient
ET ^{tg}	Humanes Prepro-Endothelin-1-überexprimierend
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEF	Guanosintriphosphat-Austausch-Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
GZZ	Gesamtzellzahl
HDM	<i>House dust mite</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP3	Inositoltrisphosphat
IPAH	Idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
IPML	Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslung
IVC	Individuell ventiliertes Käfig
KC	<i>Keratinocyte chemoattractant</i>
KG	Körpergewicht
LU	<i>Lab Unit</i>
LV	Linker Ventrikel
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Min	Minuten
Mo	Monate
MIP	Makrophagen-inflammatorisches Protein
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
OVA	Ovalbumin
PA	Pulmonalarterie
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PASMC	<i>Pulmonary artery smooth muscle cells</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCH	Pulmonale kapilläre Hämangiomatose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCWP	<i>Pulmonary capillary wedge pressure</i>

PDGF	<i>Platet-derived growth factor</i>
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PGI ₂	Prostazyklin
PH	Pulmonale Hypertonie
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Ppa	Pulmonalarterieller Druck
Ppa mean	Mittlerer pulmonalarterieller Druck
ΔPpa mean	Mittlerer pulmonalarterieller Druckunterschied
PPHN	Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
PVOD	Pulmonale venookklusive Erkrankung
PVR	Pulmonalvaskuläre <i>Resistance</i>
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed, and presumably secreted</i>
RNS	Ribonukleinsäure
ROCC	<i>Receptor-operated Ca²⁺ channel</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RQ	Relativ quantitativ
RT-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RV	Rechter Ventrikel
RVSD	Rechtsventrikulärer systolischer Druck
S	Septum
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SM-like	<i>smooth muscle cell like</i>
SOCC	<i>Store-operated Ca²⁺ channel</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSc	Systemische Sklerose
Tab.	Tabelle
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
T _H 2	T-Helferzelle vom Typ 2
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TXB ₂	Thromboxan B ₂

Abkürzungsverzeichnis

VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
Wo	Wochen
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) ist eine seltene, unheilbare und beim Menschen zum Tode führende Krankheit (LE RIBEUZ *et al.* 2020, PERROS *et al.* 2021). Sie ist gekennzeichnet durch eine endotheliale Dysfunktion in den Pulmonalarterien (PA), pulmonale Vasokonstriktion, pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität und einen pulmonalarteriellen Gefäßumbau (*Remodeling*) (GILLESPIE *et al.* 1986, HUMBERT *et al.* 2004, HABERBERGER *et al.* 2009). Die endotheliale Dysfunktion führt zu einer vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren und zu einem Ungleichgewicht zwischen der Produktion vasodilatatorischer und vasokonstriktorischer Substanzen (CHRISTMAN *et al.* 1992, HUMBERT *et al.* 2004). Der daraus resultierenden pulmonalen Vasokonstriktion wird eine wichtige Rolle in der frühen Phase der PAH zugesprochen (HUMBERT *et al.* 2004, WITZENRATH *et al.* 2006). Zudem kommt es zur pulmonalvaskulären Hyperreagibilität, einer verstärkten Reaktion auf vasokonstriktorisches Stimuli (BRINK *et al.* 1988, HUMBERT *et al.* 2004, HABERBERGER *et al.* 2009). Der konsekutive Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (Ppa) scheint wiederum zur Induktion des pulmonalarteriellen *Remodeling* beizutragen (HISHIKAWA *et al.* 1994). Mit dem Fortschreiten der Krankheit tritt eine rechtsventrikuläre Hypertrophie und schließlich ein Rechtsherzversagen ein (HUMBERT *et al.* 2004, RYAN und ARCHER 2014). Immunologische Prozesse scheinen wesentlich für die Entstehung der PAH verantwortlich zu sein (DALEY *et al.* 2008, HASSOUN *et al.* 2009, PERROS *et al.* 2021). Hierfür sprechen der Anstieg bestimmter Leukozyten-Populationen und Zytokine bei PAH-Patienten, der auch in experimentellen Modellen widerspiegelt wird (PABST und TSCHERNIG 2002, DORFMÜLLER *et al.* 2003, DALEY *et al.* 2008, HABERBERGER *et al.* 2009, HASSOUN *et al.* 2009, EL CHAMI und HASSOUN 2012). Daley *et al.* konnten nachweisen, dass eine Verbindung zwischen der Antigen-induzierten T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2)-Immunantwort und dem pulmonalarteriellen *Remodeling* besteht (DALEY *et al.* 2008). Das Modell der pulmonalen T_H2-Inflammation stellt ein anerkanntes PAH-Modell dar, da es relevante Pathologien der PAH-Patienten widerspiegelt und mit einer ausgeprägten pulmonalvaskulären Hyperreagibilität und einer Proliferation glatter Muskelzellen einhergeht (PABST und TSCHERNIG 2002, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2005, WITZENRATH *et al.* 2006, DALEY *et al.* 2008, HABERBERGER *et al.* 2009, GOMEZ-ARROYO *et al.* 2012).

Das Endothelin-System scheint für die Pathogenese der PAH von wesentlicher Bedeutung zu sein (RUBIN *et al.* 2002, GALIÉ *et al.* 2004). Dies konnte in diversen Forschungsarbeiten und klinischen Untersuchungen gezeigt werden (STELZNER *et al.* 1992, GIAID *et al.* 1993, NOOTENS *et al.* 1995, FRASCH *et al.* 1999, NAKANISHI *et al.* 1999, BLACK *et al.* 2003, GALIÉ *et al.* 2004, JACOBS *et al.* 2006, OPITZ und EWERT 2006, WITZENRATH *et al.* 2006). Es existieren drei Endothelin-Isopeptide, Endothelin-1 (ET-1), ET-2 und ET-3, von

1. Einleitung

denen insbesondere ET-1 als potentester endogener Vasokonstriktor im pulmonalen Gefäßsystem relevant ist (YANAGISAWA *et al.* 1988, INOUE *et al.* 1989, SAIDA *et al.* 1989). ET-1 wirkt über die Bindung an zwei Rezeptoren, den Endothelin-A-Rezeptor (ETA) und den Endothelin-B-Rezeptor (ETB) (ARAI *et al.* 1990, SAKURAI *et al.* 1990, HENRY 1999). Je nach Rezeptortyp und Lokalisation entfaltet ET-1 unterschiedliche, teils gegensätzliche Effekte: Die Aktivierung des ETA-Rezeptors, der vor allem in den pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscel cells*, PASMC) exprimiert wird, induziert Vasokonstriktion, Proliferation und Migration. Der ETB-Rezeptor wird sowohl in den PASMC als auch in den Endothelzellen der Lungengefäße exprimiert (SEFERIAN und SIMONNEAU 2013). Die Aktivierung des in den PASMC exprimierten ETB-Rezeptors hat Vasokonstriktion, Proliferation und Migration zur Folge, wohingegen die Aktivierung des in den Endothelzellen exprimierten ETB-Rezeptors über Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂) Vasodilatation induziert und zur ET-1-Eliminierung (*Clearance*) aus dem Blut beiträgt (DUPUIS *et al.* 1996, HENRY 1999, SEFERIAN und SIMONNEAU 2013).

Experimentelle Untersuchungen zur Rolle des ETB-Rezeptors in den T_H2-induzierten Gefäßpathologien unter Einsatz ETB-defizienter Mäuse (ETB^{-/-}) sowie die Untersuchung der Effekte einer ET-1-Überexpression unter Einsatz Prepro-ET-1-transgener Mäuse könnten zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der PAH beitragen.

Ausgehend von der Hypothese einer protektiven Rolle des ETB-Rezeptors im Rahmen dauerhaft erhöhter ET-1 Spiegel, sollte in dieser Arbeit eruiert werden, wie sich ETB-Defizienz und ET-1-Überexpression auf pulmonalarteriellen Mitteldruck, pulmonale Vasokonstriktion, pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität und Rechtsherzhypertrophie auswirken.

2. Literatur

2.1. Pulmonalarterielle Hypertonie

Der deutsche Arzt Prof. Dr. Ernst von Romberg beschrieb im Jahre 1891 bei einer Autopsie: „Die Sklerose der Lungenarterie bildete durch Herabsetzung der Wandungselasticität in allen, durch Verengung des Lumens in den kleinen Aesten ein bedeutendes Stromhinderniss, dem durch die enorme Hypertrophie des rechten Herzens entgegengearbeitet wurde“ (ROMBERG 1891). Dies gilt als erste Beschreibung der Veränderungen der Pulmonalarterien bei PAH (ROMBERG 1891, FISHMAN 2004, BARST 2008). Bei der PAH handelt es sich um eine Erkrankung der Lungenzirkulation, genauer gesagt um eine präkapilläre pulmonale Hypertonie. Nach der aktuellen Klassifikation bildet die PAH die erste Subgruppe der pulmonalen Hypertonie (PH) (SIMONNEAU *et al.* 2019). Die Diagnose PAH wird anhand wichtiger hämodynamischer Beurteilungskriterien gestellt (MCLAUGHLIN *et al.* 2009, WAXMAN und ZAMANIAN 2013). Sie zeichnet sich durch einen erhöhten pulmonalarteriellen Mitteldruck (*mean pulmonary arterial pressure*, Ppa mean) von ≥ 25 mmHg im Ruhezustand sowie einen pulmonal-kapillären Verschlussdruck (*pulmonary capillary wedge pressure*, PCWP) von ≤ 15 mmHg aus (EL CHAMI und HASSOUN 2012). Das Herzzeitvolumen kann hierbei normal oder erniedrigt sein (MCLAUGHLIN *et al.* 2009). Ein weiteres Kriterium ist ein pulmonalvaskulärer Widerstand (*pulmonary vascular resistance*, PVR) von >3 Wood Einheiten (WAXMAN und ZAMANIAN 2013). Seit dem 6. Weltsymposium für pulmonale Hypertonie gilt nun auch ein Ppa mean von > 20 mmHg in Verbindung mit einer PVR von >3 Wood Einheiten als PH (SIMONNEAU *et al.* 2019). Die endotheliale Dysfunktion, die pulmonale Vasokonstriktion, die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität und das pulmonalarterielle *Remodeling* zeichnen die PAH aus (GILLESPIE *et al.* 1986, HUMBERT *et al.* 2004, HABERBERGER *et al.* 2009). Die neue Klassifizierung, festgelegt auf dem sechsten Weltsymposium zur PH in Nizza (Frankreich) im Jahr 2018, lautet wie folgt (SIMONNEAU *et al.* 2019):

Modifizierte Gliederung der PAH nach der Nizza-Klassifikation

- **Gruppe 1.1: Idiopathische PAH (IPAH)**
- **Gruppe 1.2: Hereditäre PAH**
- **Gruppe 1.3: Arzneimittel- oder Toxin-induzierte PAH**
- **Gruppe 1.4: Assoziierte PAH (APAH), bei**
 - 1.4.1 Bindegewebserkrankungen (Kollagenosen)
 - 1.4.2 Humaner Immundefizienz Virus (HIV)-Infektion
 - 1.4.3 Portaler Hypertension

- 1.4.4 Angeborenen Herzfehlern
- 1.4.5 Schistosomiasis
- **Gruppe 1.5: PAH mit gutem Langzeit-Ansprechen auf Calcium-Kanal-Blocker**
- **Gruppe 1.6: PAH mit offensichtlichen Hinweisen auf eine pulmonalvenöse/kapilläre Beteiligung (PVOD= *pulmonary venoocclusive disease*, Pulmonale venookklusive Erkrankung und/ oder PCH= *pulmonary capillary hemangiomatosis*, pulmonale kapilläre Hämangiomatose)**
- **Gruppe 1.7: Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)**

Ein kausaler Zusammenhang zwischen Arzneimittel- oder Toxin-induzierter PAH konnte für Fenfluramin, Dexfenfluramin, Aminorex, Methamphetaminen, Benfluorex, Dasatinib (einem Tyrosinkinase-Inhibitor) und toxischem Rapsöl hergestellt werden (FISHMAN 2001, SIMONNEAU *et al.* 2004, MONTANI *et al.* 2013, SIMONNEAU *et al.* 2019). Ferner wird das Auftreten der PAH infolge des Konsums von Amphetaminen und Kokain diskutiert (SIMONNEAU *et al.* 2009). Diese Möglichkeit besteht auch bei Einnahme von Serotoninwiederaufnahmehemmern (CHAMBERS *et al.* 2006). Fenfluramin greift in das Serotonin-System ein. Bei Serotonin handelt es sich, wie bei Endothelin um einen pulmonalen Vasokonstriktor, der bei PAH-Patienten erhöht vorliegt (HERVÉ *et al.* 1995). Die kardiovaskulären Nebenwirkungen von Fenfluramin könnten auf die agonistische Wirkung am Serotonin-(5-HT) 2B-Rezeptor zurückzuführen sein (FITZGERALD *et al.* 2000, SETOLA *et al.* 2005). Kokain führt über erhöhten oxidativen Stress zu einer Auflösung der *Tight-junctions* und einer erhöhten Permeabilität an humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen (DALVI *et al.* 2014). Auch bei toxischem Rapsöl führt eine initiale Endothelschädigung zu Intimaproliferation und *in-situ*-Thrombosen (GÓMEZ-SÁNCHEZ *et al.* 1989). Bei der systemischen Sklerose spielen eine chronische Inflammation, eine autoimmune Dysregulation und eine EC-Dysfunktion eine essentielle Rolle (SHI-WEN *et al.* 2006, LE PAVEC *et al.* 2010). Die assoziierte PAH ist die Haupttodesursache bei Patienten mit systemischer Sklerose (*systemic sclerosis*, SSc) und tritt in 6,4-12% der Fälle ein (MUKERJEE *et al.* 2003, HACHULLA *et al.* 2005, RUBIO-RIVAS *et al.* 2021). Bei HIV-infizierten Patienten kann ebenfalls eine assoziierte PAH auftreten. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte weder virale Desoxyribonukleinsäure (DNS) noch das HI-Virus selbst in den Endothelzellen der Lungengefäße von HIV-infizierten Patienten nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass der Pathomechanismus über eine indirekte Wirkung des Virus, vermittelt über *Second Messenger* Systeme, sowie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Endothelin oder virales Protein agiert (SIMONNEAU *et al.* 2009). Die Vergesellschaftung der PAH mit Schistosomiasis tritt infolge multifaktorieller Mechanismen ein. Die Eier der Trematoden scheinen wesentlich zur Entstehung der PAH beizutragen, indem sie eine Embolie der

Lungengefäße und eine konsekutive Inflammation herbeiführen (SHAW und GHAREEB 1938, GAVILANES *et al.* 2016).

2.1.1. PAH und Inflammation

Nach neusten Erkenntnissen spielen Entzündungsreaktionen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der PAH (DALEY *et al.* 2008, HASSOUN *et al.* 2009, LIANG *et al.* 2021). So tritt die PAH als Komplikation einer Reihe von systemischen Autoimmun- und inflammatorischen Erkrankungen, wie Systemischer Sklerose, *Lupus erythematosus* oder bei HIV-Patienten auf (DORFMÜLLER *et al.* 2003). Die Inflammation wird in der PAH als ein wesentlicher Faktor für die Pathogenese angesehen (TUDER und VOELKEL 1998). Bereits im frühen Stadium kann eine persistierende Entzündung nachgewiesen werden, welche zu der vaskulären Erkrankung beiträgt (TUDER *et al.* 2013). So konnte gezeigt werden, dass die Menge an entzündlichen perivaskulären Infiltraten mit dem Grad an *Remodeling* und erhöhte Zytokinwerte mit der Überlebensrate bei PAH Patienten korrelieren (SOON *et al.* 2010, PRICE *et al.* 2012, STACHER *et al.* 2012, TUDER *et al.* 2013). Bei schwer erkrankten PAH-Patienten konnte in den pulmonalen Läsionen eine erhöhte Anzahl von Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Mastzellen festgestellt werden (TUDER *et al.* 1994, HUMBERT *et al.* 2004, GERASIMOVSKAYA *et al.* 2012, PRICE *et al.* 2012). Die Aktivierung von Makrophagen induziert eine Freisetzung von Interleukin (IL)-1 β , IL-6, TNF- α und IL-10 (STOW *et al.* 2009, GROTH *et al.* 2014). Aktivierte Makrophagen sind in der Lage, T-Zellen Antigene zu präsentieren, woraufhin eine T-Zell-Antwort induziert wird. T-Zellen sind ebenfalls erhöht in Lungen von PAH Patienten, eine hohe Anzahl von *Cluster of Differentiation* (CD)8⁺ Zellen findet sich in den plexiformen Läsionen (GROTH *et al.* 2014). CD4⁺ T-Helfer-Zellen stimulieren die Differenzierung von B-Zellen, welche bei PAH-Patienten antinukleäre Autoantikörper produzieren (RICH *et al.* 1986, GROTH *et al.* 2014). Ferner zeigen B-Zellen bei IPAH-Patienten ein verändertes Ribonukleinsäure (RNS)-Expressionsprofil, was darauf schließen lässt, dass B-Zellen bei PAH aktiviert sind (ULRICH *et al.* 2008).

Für die wesentliche Bedeutung immunologischer Prozesse in der Entstehung und im Fortschreiten der PAH sprechen die veränderten Zytokinprofile von PAH-Patienten (RABINOVITCH *et al.* 2014). Bei humanen PAH-Patienten konnten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöhte Serumspiegel von IL-1 β , IL-6 und C-reaktivem Protein nachgewiesen werden (HUMBERT *et al.* 1995, QUARCK *et al.* 2009). Für TNF- α ist die Datenlage inkonsistent. *Humbert et al.* stellten fest, dass die TNF- α Werte sich im Normalbereich befinden, während *Itoh et al.* erhöhte TNF- α Werte bei ihren Patienten dokumentierten (HUMBERT *et al.* 1995, ITOH *et al.* 2006).

Zudem wurden bei PAH-Erkrankten im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Plasmakonzentrationen von IL-18 und dem Chemokin CXCL10 (Interferon- γ -induziertem Protein 10) gemessen (ROSS *et al.* 2012). Andere entzündliche Parameter, die im Plasma von PAH-Patienten erhöht waren, waren IL-8, IL-10 und das Chemokin Fraktalkin (BALABANIAN *et al.* 2002, SOON *et al.* 2010). Fraktalkin wird von Endothelzellen produziert und fördert die Rekrutierung von Fraktalkin-Rezeptor (CX3CR1)-exprimierenden Leukozyten (FONG *et al.* 1998, FENG *et al.* 1999, HASKELL *et al.* 1999, BALABANIAN *et al.* 2002). Es konnte gezeigt werden, dass CX3CR1 in zirkulierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten bei PAH-Patienten hochreguliert ist. Fraktalkin-mRNS wird in pulmonalarteriellen Endothelzellen von PAH-Patienten vermehrt exprimiert, zudem ist die Plasmakonzentration von löslichem Fraktalkin bei PAH-Patienten erhöht, verglichen mit gesunden Kontrollen. Fraktalkin ist daher wahrscheinlich bei PAH an der Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge beteiligt (BALABANIAN *et al.* 2002). Das Chemokin RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted*), ein Attraktor für T-Lymphozyten und Monozyten, war in Lungenbiopsien von PAH-Patienten im Vergleich zu Kontrollbiopsien (Lungenareale von Pneumothorax-Patienten) erhöht nachweisbar; es wird hier ebenfalls vor allem von pulmonalarteriellen Endothelzellen produziert. Die Bereiche mit erhöhter RANTES-Expression zeigten eine vermehrte Infiltration mit CD45⁺ Entzündungszellen. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch RANTES bei PAH an der Entzündungszellenrekrutierung in die Lunge beteiligt ist (DORFMÜLLER *et al.* 2002). Das Makrophagen-inflammatorische-Protein-1 (MIP-1) ist ein Zytokin, das die Migration von T- und B-Lymphozyten sowie von Monozyten induziert (SCHALL *et al.* 1993, FARTOUKH *et al.* 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von MIP-1 in Lungenbiopsien von PAH-Patienten signifikant erhöht ist, was ebenfalls für die Hypothese spricht, dass Chemokine und Entzündungszellen eine Rolle in der Pathogenese der PAH spielen (FARTOUKH *et al.* 1998).

2.1.2. Endotheliale Dysfunktion

Endothelzellen sind wesentlich an der vaskulären Homöostase beteiligt. Die endotheliale Dysfunktion scheint sowohl in der Entstehung als auch im Progress der PAH eine Rolle zu spielen (LOSCALZO 1992, BUDHIRAJA *et al.* 2004, ELINOFF *et al.* 2013). Eine endotheliale Dysfunktion führt zu einem Missverhältnis der proliferativ und antiproliferativ wirkenden Substanzen, was zu einer Proliferation der glatten Muskelzellen führt. Darüber hinaus kommt es zu einem Missverhältnis zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen, sowie antiinflammatorischen und proinflammatorischen Faktoren (MORRELL *et al.* 2009). Bei humanen PAH-Patienten kommt es im Rahmen der endothelialen Dysfunktion zu einer Senkung der Produktion der Vasodilatoren und Wachstumsinhibitoren PGI₂ und NO, sowie

zu einem Anstieg der Produktion von Vasokonstriktoren und co-Mitogenen, wie zum Beispiel ET-1, Thromboxan A₂ und Serotonin (HERVÉ *et al.* 1995, MORRELL *et al.* 2009). Endothelin-1 bewirkt eine Freisetzung von Thromboxan A₂ in der Lunge (DE NUCCI *et al.* 1988). Thromboxan A₂ weist auch einen starken Stimulus zur Thrombozytenaggregation auf und kann so die Wirkung von Prostazyklin antagonisieren, das durch die vaskulären Endothelzellen freigesetzt wird (CHRISTMAN *et al.* 1992, BUDHIRAJA *et al.* 2004). Ein weiteres Merkmal der endothelialen Dysfunktion ist ein Anstieg der Produktion prothrombotischer Faktoren wie P-Selektin und von-Willebrand-Faktor (BUDHIRAJA *et al.* 2004). Infolge der endothelialen Dysfunktion kommt es daher zu Vasokonstriktion, Entzündungsreaktionen, *in-situ*-Thrombosen, pulmonalarteriellem *Remodeling* sowie zu Neoangiogenese und zur Entstehung der plexiformen Läsionen in der PAH (VOELKEL *et al.* 1997, COOL *et al.* 1999, BUDHIRAJA *et al.* 2004, HUMBERT *et al.* 2004).

2.1.3. Pulmonale Vasokonstriktion und pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität

Die pulmonale Vasokonstriktion wurde bereits von Wood *et al.* im Jahr 1958 als Teil der PAH beschreiben (WOOD 1958, RUBIN 1997). Der pulmonalen Vasokonstriktion wird eine Beteiligung in der frühen Phase der Entstehung der pulmonalen hypertensiven Prozesse zugesprochen (HUMBERT *et al.* 2004, WITZENRATH *et al.* 2006). Als direkte Folge der Vasokonstriktion kommt es zu einer Verengung des Gefäßlumens (MANDEGAR *et al.* 2004). Die eingetretene pulmonale Vasokonstriktion trägt somit zum Anstieg der pulmonalvaskulären *Resistance* bei und führt zu einem erhöhten Ppa (MANDEGAR *et al.* 2004). Der erhöhte Ppa und die pulmonale Vasokonstriktion können die Hyperplasie und Hypertrophie der vaskulären SMC über eine Erhöhung der DNS-Synthese fördern (HISHIKAWA *et al.* 1994, MANDEGAR *et al.* 2004).

Die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität konnte bereits in wesentlichen PAH-Modellen, wie dem Modell der pulmonalen T_H2-Inflammation, dem Monokrotalin-Modell, sowie dem chronischen Hypoxie-Modell, nachgewiesen werden (GILLESPIE *et al.* 1986, LIU *et al.* 2005, HABERBERGER *et al.* 2009).

Im chronischen Mausmodell der pulmonalen T_H2-Inflammation konnten Haberberger *et al.* eine erhöhte pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität sowie ein bedeutendes *Remodeling* der intraazinären Arterien und kleinen Pulmonalarterien nachweisen. Hierbei bestand eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der pulmonalvaskulären Reagibilität und der Wanddicke der kleinen Pulmonalarterien (HABERBERGER *et al.* 2009). Die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität konnte für eine Reihe von Vasokonstriktoren nachgewiesen werden, wie Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), ET-1, Angiotensin II und den Thromboxan-A₂-Rezeptor-Agonisten U46619 (WITZENRATH *et al.* 2006).

Gillespie et al. stellten im Monokrotalin-Modell der Ratte fest, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach Monokrotalin-Applikation (Tag 4 und Tag 7), noch vor dem Eintreten der pulmonalen Hypertonie, eine pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität auf vasokonstriktorische Stimuli induziert wird. Zu diesem Zeitpunkt sind weder ein Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks noch eine rechtsventrikuläre Hypertrophie messbar. Erst 14 Tage nach Monokrotalin-Applikation zeigte sich ein Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks und der rechtsventrikulären Hypertrophie im Vergleich zur Kontrollgruppe (*GILLESPIE et al.* 1986).

An isolierten Pulmonalarterien von chronisch hypoxisch gehaltenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität auf Endothelin induziert wird (*LIU et al.* 2005). Der der pulmonalvaskulären Hyperreagibilität zugrundeliegende Mechanismus könnte reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Cyclooxygenase-2 (COX-2), Proteinkinase C und den Thromboxan-Rezeptor involvieren (*WITZENRATH et al.* 2006, *DELANNOY et al.* 2010).

2.1.4. Pulmonalarteriell *Remodeling*

Das pulmonalarterielle *Remodeling* entsteht bei PAH in Folge mehrerer Prozesse. So scheinen die endotheliale Dysfunktion, eine Aktivierung der glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten, eine vermehrte Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie dem Endothelwachstumsfaktor (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) und dem Plättchen-Wachstumsfaktor (*Platet-derived growth factor*, PDGF), sowie eine chronisch persistierende Vasokonstriktion aufgrund des Ungleichgewichtes zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren hierzu beizutragen (*MANDEGAR et al.* 2004, *MORRELL et al.* 2009). Es umfasst Umbauprozesse mit charakteristischen strukturellen Veränderungen wie fibrotischen proliferativen Veränderungen der *Tunica adventitia*, einer Hypertrophie der *Tunica media* und einer Verdickung sowie Fibrose der *Tunica intima* (*YEAGER et al.* 2011). Unter physiologischen Bedingungen herrscht in den PASMC, EC und Fibroblasten ein optimales Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose (*MANDEGAR et al.* 2004). Ist dieses Gleichgewicht zugunsten der Proliferation verschoben, kommt es zur progressiven Zunahme der Gefäßwanddicke mit konsekutiver Senkung der pulmonalvaskulären Dehnbarkeit (*Compliance*) (*HUMBERT et al.* 2004, *THENAPPAN et al.* 2016). Es kommt zu Strukturverlust, bis hin zu sogenannten plexiformen Läsionen mit Entstehung von Mikrothromben (*HUMBERT et al.* 2004). Das Gefäßlumen nimmt ab oder obliteriert vollständig, was einen Anstieg der PVR sowie des Ppa zur Folge hat (*RABINOVITCH* 1998, *MANDEGAR et al.* 2004). Der erhöhte Druck im Lungenkreislauf führt zu einer rechtsventrikulären Hypertrophie und im weiteren Verlauf zur Rechtsherzdilatation mit der konsekutiven Gefahr des Rechtsherzversagens (*MANDEGAR et al.* 2004, *THENAPPAN et al.* 2016).

Die Veränderung der zellulären Komponenten der pulmonalarteriellen Wände ist im Bereich der *Intima* gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Proliferation der Endothelzellen (TUDER *et al.* 1994, COOL *et al.* 1997, VOELKEL *et al.* 1997, COOL *et al.* 1999). Darüber hinaus bildet sich bei schweren Formen der PAH zwischen dem Endothel und der *Lamina elastica interna* eine Schicht aus Myofibroblasten und extrazellulärer Matrix, genannt *Neointima* (HUMBERT *et al.* 2004). Im Bereich der *Media* kommt es zur Hypertrophie und Hyperplasie von glatten Muskelzellen sowie zu einer vermehrten Ablagerung interzellulärer Bindegewebsproteine, was eine Verdickung zur Folge hat (RABINOVITCH 2007). Ferner wandern Fibroblasten aus der *Adventitia* in die *Tunica media* ein (HUMBERT *et al.* 2004). In der *Tunica adventitia* kommt es ebenfalls zur Zellproliferation und zur Produktion und Ablagerung von extrazellulären Matrix-Proteinen, insbesondere Kollagen, mit einem Anstieg der Expression von Prokollagen I und III (STENMARK und MECHAM 1997, HUMBERT *et al.* 2004, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2005, FRID *et al.* 2006). In der *Adventitia* akkumulieren darüber hinaus Myofibroblasten, welche α -glattes Muskelaktin (α -smooth muscle actin, α -SMA) exprimieren (FRID *et al.* 2006). Diese glatten Muskelzell-ähnlichen (*smooth muscle cell like*, SM-like) Zellen können sich scheinbar aus vorhandenen vaskulären glatten Muskelzellen, Fibroblasten der *Tunica adventitia* oder aus zirkulierenden Vorläuferzellen, welche diesen Phänotyp einnehmen können, umwandeln (FRID *et al.* 2006, MORRELL *et al.* 2009). Wie experimentell gezeigt werden konnte, sind die bereits ansässigen Vorläuferzellen in der Lage, in verschiedenen Stadien der vaskulären Schädigungen, SM-like-Eigenschaften zu exprimieren. Eine erhöhte Produktion von Endothelin oder Transformierendem Wachstumsfaktor β -1 (TGF β -1) führt auch zur Differenzierung von Fibrozyten zu Myofibroblast-ähnlichen Zellen (MORRELL *et al.* 2009). Eine weitere Veränderung in der Gefäßwand stellt eine erhöhte Neovaskularisation durch die *Vasa vasorum* dar, welche vorrangig die *Tunica adventitia*, aber auch die äußeren Teile der *Media* betrifft (HUMBERT *et al.* 2004).

Die exzessive EC-Proliferation in Verbindung mit Neoangiogenese resultiert in der Bildung von plexiformen Läsionen mit *In-situ*-Thrombosen (TUDER *et al.* 1994, COOL *et al.* 1997, HERVE *et al.* 2001, CHEN *et al.* 2004). Morphologisch handelt es sich bei den plexiformen Läsionen um eine aneurysmale Dilatation der muskulären pulmonalen Arterien (TUDER *et al.* 1994). Im proximalen Bereich der versorgenden Arterie entsteht eine Obstruktion des Lumens, verursacht durch eine Proliferation und Fibrose der *Tunica intima*. Das Ursprungsgefäß (*parent vessel*) zeichnet sich durch eine dünnere *Tunica media* sowie durch eine nicht klar definierte innere *Tunica elastica* aus (WAGENVOORT und WAGENVOORT 1970, TUDER *et al.* 1994). Die plexiformen Läsionen weisen eine glomeruloide Struktur auf, aus denen sich abzweigende Kanäle von den Pulmonalarterien bilden (TUDER *et al.* 1994).

Die Inflammation nimmt eine zentrale Rolle ein, in dem sie zu einer Triggerung oder Vermittlung bei pulmonalarteriellen *Remodeling* führt (DALEY *et al.* 2008, HASSOUN *et al.* 2009). Anzeichen, dass der Inflammation eine bedeutende Rolle zukommt, sind unter anderem eine Erhöhung der Entzündungszellen in der Nähe der Gefäße, die unter pulmonalarteriellen *Remodeling* stehen, sowie ein Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel IL-6 und IL-1 β , bei PAH Patienten (TUDER *et al.* 1994, HUMBERT *et al.* 1995). Eine perivaskuläre Entzündung mit Zellinfiltration ohne Vaskulitis konnte in 7 von 10 Fällen mit einer Beteiligung von B- und T-Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden, auch findet eine Beteiligung von Mastzellen statt (TUDER *et al.* 1994, NICOLLS *et al.* 2005). Die dabei vorhandenen Entzündungszellen tragen nun durch die Anwesenheit ihrer Zytokine und Wachstumsfaktoren zur Proliferation bei (TUDER *et al.* 1994). Bereits beschriebene beteiligte Zytokine in den inflammatorischen Zellinfiltraten sind IL-1 und Wachstumsfaktoren wie TNF- α und TGF- β , die von Makrophagen freigesetzt werden (POLVERINI *et al.* 1977, KNIGHTON *et al.* 1983, GILLESPIE *et al.* 1988, TUDER *et al.* 1994). Auch proinflammatorische Modelle in Ratten und Mäusen, wie das Modell der pulmonalen T_H2-Inflammation oder das Modell der chronischen Hypoxie führen zur Entstehung eines pulmonalarteriellen *Remodeling* (RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2005, DALEY *et al.* 2008, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2008, BURKE *et al.* 2009, STENMARK *et al.* 2009). Beim Monokrotalin-Modell führt eine akute vaskuläre Endothelschädigung zu endothelialer Dysfunktion und im späteren Prozess zu pulmonalarteriellen *Remodeling* (MOLTENI *et al.* 1984, GALIÉ *et al.* 2004).

2.1.5. Therapeutische Möglichkeiten

Die aktuell verfügbaren pharmakologischen Therapeutika zur Behandlung der PAH verbessern sowohl den klinischen Zustand der Erkrankten als auch die Überlebensprognose der Patienten, die mit den bereits etablierten PAH-Therapien behandelt werden (GALIÉ *et al.* 2009, HUMBERT *et al.* 2014, MANDRAS *et al.* 2020). Die PAH bleibt dennoch weiterhin eine unheilbare Krankheit. Bis zu den neunziger Jahren war die einzige spezifische Therapiemöglichkeit eine Lungentransplantation (STERIADE *et al.* 2014). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stehen verschiedene Medikamentengruppen für PAH-Patienten zur Verfügung, zu denen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ERAs), Phosphodiesterase (PDE)-5-Inhibitoren, Prostazyklin-Analoga, Prostazyklin-Rezeptor-Agonisten und Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase zählen (HUMBERT *et al.* 2004, MANDRAS *et al.* 2020). Aus Sicht einer klinischen und hämodynamischen Verbesserung bietet sowohl eine Behandlung mit ERAs, Prostanoiden, Prostazyklin-Rezeptor-Agonisten, Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase oder PDE-5-Inhibitoren eine Verbesserung (RYERSON *et al.* 2010, GALIÉ

et al. 2016, ROSENKRANZ *et al.* 2021). Kombinationsbehandlungen mit mehreren Medikamenten aus unterschiedlichen Gruppen bieten weitere klinische Verbesserungen und werden in letzter Zeit vermehrt eingesetzt (HUMBERT *et al.* 2014, GHOFRANI *et al.* 2020, MANDRAS *et al.* 2020).

ERAs spielen eine Schlüsselrolle in der Behandlung der PAH (HUMBERT und SIMONNEAU 2005, MAKI *et al.* 2020). Es gibt unselektive ERAs, die sowohl den Endothelin-Rezeptor-A als auch den Endothelin-Rezeptor-B binden, und ERAs, die selektiv den Endothelin-Rezeptor-A binden (BARST 2007). Duale ERAs stellen sowohl zur Behandlung der SSc-assoziierten PAH als auch zur Behandlung digitaler Ulzera eine therapeutische Möglichkeit dar (RUBIN *et al.* 2002, STEEN und MEDSGER 2003, HAMAGUCHI *et al.* 2017).

Die Inhibierung der auf den glatten Muskelzellen lokalisierten ETA- und ETB-Rezeptoren durch duale ERAs verhindert die von den Rezeptoren vermittelten vasokonstriktorisches und proliferativen Effekte. Duale ERAs inhibieren jedoch auch die vasokonstriktorisches Wirkung des ETB-Rezeptors an den glatten Muskelzellen, sowie die Effekte der auf den EC lokalisierten ETB-Rezeptoren, Vasodilatation und Endothelin-Clearance (BARST 2007). Die fibrotischen Veränderungen, z.B. in der *Intima* der Pulmonalarterien, werden zwar über beide Rezeptoren vermittelt, aber in erster Linie über den ETA-Rezeptor (PIETRA *et al.* 1989, SHI-WEN *et al.* 2001). ET-1 vermittelt über den ETA-Rezeptor die Senkung der MMP-1 und führt somit zu einem verminderten Kollagenabbau (SHI-WEN *et al.* 2001).

Die selektiven ETA-Inhibitoren bieten den Vorteil, dass die Wirkung des auf den EC exprimierten ETB-Rezeptors gegeben ist (OPITZ und EWERT 2006, BARST 2007). Dennoch bleibt bei dem selektivem ETA-Antagonismus der vasokonstriktorisches Effekt des auf den glatten Muskelzellen lokalisierten ETB-Rezeptors erhalten (DUPUIS 2001). Ob für die Therapie der PAH eine vollständigere Blockade der vasokonstriktorisches, proliferativen und profibrotischen Wirkung des Endothelin einen eindeutigen Vorteil liefert, wird weiterhin diskutiert (DUPUIS 2001, BARST 2007, DUPUIS und HOEPER 2008, BADLAM und BULL 2017). Experimentelle Studien an humanen Lungenfibroblasten und Rattenlungen legen nahe, dass eine Blockade der beiden Endothelin-Rezeptoren in den PA und somit an den glatten Muskelzellen und den Fibroblasten von Vorteil ist (SATO *et al.* 1995, SHI-WEN *et al.* 2007). Durch eine duale Blockade der Endothelin-Rezeptoren ist eine effektivere Inhibierung der vasokonstriktorisches Wirkung des ET-1 festgestellt worden, als bei der alleinigen Blockade des ETA-Rezeptors (SATO *et al.* 1995). Andere Arbeiten sehen einen Vorteil in der selektiven ETA-Rezeptor-Blockade (DAVENPORT *et al.* 1995, RUBIN *et al.* 2005). Die Kontroverse, ob eine selektive Inhibierung des ETA-Rezeptors oder die duale Endothelin-Rezeptor-Blockade von Vorteil ist, bedarf weiterer Forschung (JACOBS *et al.* 2006, BARST 2007, DUPUIS und HOEPER 2008).

2.1.6. Besonderheiten der murinen und humanen Lunge

In diesem Abschnitt wird auf besondere Unterschiede der Lungenanatomie zwischen Mensch und Maus eingegangen. Die Luft gelangt bei beiden Spezies über die oberen Atemwege in die Trachea, die Bronchien, die Bronchiolen und letztendlich in die Alveolen (SUAREZ *et al.* 2012).

Das Aufzweigungsmuster des Bronchialbaums unterscheidet sich bei Mensch und Maus: Bei der Maus ist dieser *monopodial*, beim Mensch ist er *dichotom* (PATRA 1986). Bei beiden Spezies besteht die Lunge aus zwei Lungenflügeln, dem rechten und dem linken. Die Anzahl der Lungenlappen ist hingegen unterschiedlich. Die Maus besitzt im rechten Lungenflügel vier Lungenlappen, beim Menschen sind es drei Lungenlappen. Der linke Lungenflügel besteht bei der Maus nur aus einem Lungenlappen, während es beim Menschen zwei Lungenlappen sind (SUAREZ *et al.* 2012). Der Mauslungen-Parenchymanteil beträgt 18%, wohingegen die humane Lunge einen Parenchymanteil von 12% aufweist (IRVIN und BATES 2003). Die Alveolen der Maus haben einen Durchmesser von 39-80 μm , die humanen Alveolen einen Durchmesser von 200-400 μm (IRVIN und BATES 2003, SUAREZ *et al.* 2012).

Das sauerstoffarme Blut wird bei beiden Spezies vom rechten Ventrikel über die *Arteria pulmonalis* in die Lunge geführt, die pulmonale Zirkulation führt das Blut bis zu den Alveolen, wo ein Austausch zwischen CO_2 und O_2 stattfindet. Der in der Lunge stattfindende Gasaustausch versorgt den großen Kreislauf über die Aorta, die dem linken Ventrikel entspringt, mit sauerstoffreichem Blut. Die Versorgung der Lunge mit sauerstoffangereichertem Blut erfolgt über Abzweigungen der Aorta und der interkostalen Arterien. Diese versorgen somit die Bronchien, die Lymphknoten und die viszerale Pleura. Die nutritive Versorgung endet auf der Ebene der terminalen Bronchiolen (SUAREZ *et al.* 2012). Die Lungenperfusion zeichnet sich durch einen geringen Strömungswiderstand, eine hohe Flussgeschwindigkeit und ein niedriges Druck-System aus (HUMBERT *et al.* 2004, MANDEGAR *et al.* 2004). Die pulmonalen Arterien fließen in ein dichtes Netz von pulmonalen Kapillaren welche auf der Höhe der *Ductus alveolares* enden (SUAREZ *et al.* 2012).

Die elastischen Pulmonalarterien weisen bei der Maus alternierende Schichten von konzentrischen elastischen Fasern und glatten Muskelzellen auf. Beim Menschen sind die Pulmonalarterien dünn und weisen einen großen Durchmesser auf. Dies trägt zum niedrigen Druck im Lungengefäßsystem bei. Bei der Maus gibt es Pulmonalarterien mit einem Außendurchmesser der glatten Muskelzellschicht von 20 μm . Beim Mensch wäre eine derartig ausgeprägte Muskularisation der Arteriolen bereits ein Anzeichen von pulmonaler Hypertonie (SUAREZ *et al.* 2012). Die humanen elastischen Pulmonalarterien weisen eine dünne Schicht von elastischen Fasern auf. Nur ein kleiner distaler Anteil des

pulmonalarteriellen Systems sind muskuläre Pulmonalarterien. Diese sind reich an Elastin und haben eine dünne Muskelschicht (SUAREZ *et al.* 2012).

2.1.7. Pulmonale T_H2-Inflammation als Modell der PAH

Die multifaktorielle Genese und die Komplexität der Veränderungen, die im Laufe der PAH auftreten, machen es äußerst schwierig, die Erkrankung mithilfe von Tiermodellen zu reproduzieren (FIRTH *et al.* 2012). Dies ist der Grund, warum eine Vielzahl von Tiermodellen vorhanden ist, um die zugrunde liegenden Pathomechanismen der PAH genauer zu untersuchen (FIRTH *et al.* 2012). Zu den PAH-Modellen zählen das Hypoxie-Modell der Maus, der Ratte, des Schafs oder des Schweins, das Monokrotalin-Modell der Ratte, das pulmonale T_H2-Modell der Maus und der Ratte, sowie verschiedene Modelle genmodifizierter Mauslinien (DALEY *et al.* 2008, FIRTH *et al.* 2012, MIZUNO *et al.* 2012).

Das Hypoxie-Modell bietet den Vorteil der guten Reproduzierbarkeit. Es gibt jedoch zwischen den Spezies, den Geschlechtern und dem Alter relevante Unterschiede (STENMARK *et al.* 2006, STENMARK *et al.* 2009). Chronische Hypoxie induziert in Mäusen und Ratten pulmonale Vasokonstriktion, Hypertrophie der *Tunica Media* und eine Muskularisation der präkapillären Arteriolen (FIRTH *et al.* 2012). Zudem kommt es zu einer pulmonalarteriellen Entzündungsreaktion (STENMARK *et al.* 2009). Auch bei anderen Tierarten, wie zum Beispiel Hühnern, führt die Hypoxie-Exposition zu PAH-assoziierten Veränderungen (YANG *et al.* 2012). Ein Nachteil des Hypoxiemodells ist, dass die Veränderungen, im Gegensatz zu den Veränderungen bei humaner PAH, bei Rückkehr zur Normoxie reversibel sind, ferner tritt insbesondere bei Mäusen nur mildes pulmonalarteriell *Remodeling* auf, welches ausschließlich die *Tunica media* betrifft (STENMARK *et al.* 2009). Eine Weiterentwicklung stellt das SU5416/ Hypoxiemodell bei Ratten dar, bei denen eine Injektion des VEGF-Rezeptorblockers SU5416 mit einer chronischen Hypoxieexposition kombiniert wird. Die Tiere entwickeln eine schwere, progressive und irreversible PAH, bei der auch den plexiformen Läsionen des Menschen ähnliche Veränderungen auftreten. Das Modell konnte bislang jedoch nicht erfolgreich auf Mäuse übertragen werden (GOMEZ-ARROYO *et al.* 2012).

Das Monokrotalin-Modell der Ratte bietet den Vorteil, dass bereits eine einzige subkutane Applikation ausreicht, binnen sieben Tagen zu pulmonalarteriell *Remodeling*, binnen zehn Tagen zu pulmonaler Hypertonie und binnen 12 Tagen zu einer Rechtsherzhypertrophie zu führen (KAY *et al.* 1982). Ferner konnte bei Ratten nach Monokrotalin Behandlung in isolierten perfundierten Lungen nachgewiesen werden, dass es zu einer frühen und transienten Erhöhung in der pulmonalvaskulären Reagibilität auf bestimmte Vasokonstriktoren kommt (GILLESPIE *et al.* 1986). Das Monokrotalin-Modell konnte bislang

nicht auf die Maus übertragen werden. Ursache dafür ist, dass Mäuse das Monokrotalin aufgrund von Speziesunterschieden im hepatischen Cytochrom CYP3A nicht in den aktiven Metaboliten Dehydromonokrotalin umwandeln können (GOMEZ-ARROYO *et al.* 2012). Ein Nachteil des Monokrotalinmodells ist, dass die Veränderungen im Gegensatz zur humanen PAH sehr leicht durch pharmakologische Eingriffe verhindert werden können, teilweise sogar mit Stoffen, die beim Menschen PAH auslösen, wie zum Beispiel Dexfenfluramin (STENMARK *et al.* 2009).

Es gibt zunehmende Evidenz für eine entscheidende Rolle der immunologischen Prozesse in der Pathogenese der PAH und wiederholte Beobachtungen, dass T_H2-Inflammation an der Entstehung PAH-assoziiierter Pathologien beteiligt sein könnte (HASSOUN *et al.* 2009). Daher erscheint auch das Modell der pulmonalen T_H2-Inflammation zunehmend relevant. Die T_H2-Antwort wurde in diesem Modell für diverse Allergene wie Ovalbumin (OVA), Hausstaubmilben (*house dust mite*, HDM) und *Aspergillus fumigatus* bereits gut charakterisiert (CORRY *et al.* 1998, GRÜNIG *et al.* 1998, DALEY *et al.* 2008, DAAN DE BOER *et al.* 2013). Das T_H2-induzierte Modell bietet die Möglichkeit, die PAH-assoziierten pulmonalvaskulären Veränderungen genauer zu erforschen: Dieses Modell eignet sich gut, da verschiedene Allergene und genmodifizierte Mauslinien eingesetzt werden können (RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2005, DALEY *et al.* 2008, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2008, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2008, THOUA *et al.* 2012, PARK *et al.* 2013).

Das Allergen-induzierte Inflammationsmodell führt nach Allergen-Exposition zu pulmonalen Gefäßveränderungen, mit perivaskulärer Inflammation, pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität und ausgeprägtem und komplexem pulmonalarteriellen *Remodeling* (RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2005, WITZENRATH *et al.* 2006, DALEY *et al.* 2008, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2009, WENG *et al.* 2011, GOMEZ-ARROYO *et al.* 2012, MUSHABEN *et al.* 2012). OVA-sensibilisierte und anschließend wiederholt OVA-atemwegsexponierte Mäuse zeigen erheblich verdickte Arterienwände mit einer Hyperplasie der glatten Aktin-exprimierenden Muskelzellen (DALEY *et al.* 2008, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2008, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2009). Ferner kommt es zu einer Erhöhung der Anzahl an Myofibroblasten und Prokollagen-1-positiven Zellen, sowie zur Proliferation von Endothelzellen in der *Intima* (RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2008, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2009). Das Lungengewebe ist gekennzeichnet durch eine transiente Leukozyteninfiltration mit signifikanter peribronchialer und perivaskulärer Eosinophilie (RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2005, DALEY *et al.* 2008, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2009). Daley *et al.* konnten im Modell einer Antigen-induzierten pulmonalen Inflammation zeigen, dass eine Verbindung zwischen der Antigen-induzierten T_H2-Immunantwort und der Induktion eines ausgeprägten pulmonalarteriellen *Remodeling* besteht. Die T_H2-Immunantwort bestimmt den Grad des pulmonalarteriellen *Remodeling* in OVA-sensibilisierten und OVA-atemwegsexponierten Mäusen. Dieses

Antigen-induzierte pulmonalarterielle *Remodeling* erfordert die Anwesenheit von CD4⁺-T-Zellen. Mäuse, in denen die CD4⁺-T-Zellen depletiert wurden, wiesen kein ausgeprägtes T_H2-induziertes pulmonalarterielles *Remodeling* auf. Darüber hinaus war das pulmonalarterielle *Remodeling* nach IL-13-Blockade und bei IL-4-defizienten Mäusen signifikant reduziert. Das pulmonalarterielle *Remodeling* korreliert mit den Antigen-induzierten Serum-Immunglobulinen (Ig) IgE und IgG1 sowie mit den Zytokinen IL-4 und IL-5 aus der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (DALEY *et al.* 2008).

Bei Mäusen wird infolge Antigensensibilisierung und anschließender Atemwegsexposition eine pulmonale eosinophile Inflammation induziert (GAVETT *et al.* 1994). Die Anwesenheit von IL-4 induziert eine Immunantwort vom T_H2-Typ und ist ebenso wie IL-5 für die eosinophile Inflammation infolge Antigenexposition erforderlich (COYLE *et al.* 1995, WILLS-KARP und EWART 1997, CHO *et al.* 2004). Die Expression von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) in respiratorischen Epithelzellen in Verbindung mit einer mehrfachen Atemwegsexposition mit OVA führt zu einer verstärkten Eosinophilie im Lungengewebe und in der BALF, sowie zu einer Erhöhung aktivierter CD4- und CD8-T-Zellen im Lungenhomogenat (LEI *et al.* 1998, STÄMPFLI *et al.* 1998). Allergenspezifische T-Zellen werden durch verschiedene Mediatoren in die Atemwege rekrutiert. Diese führen dann zu einer Lungeninflammation, die durch eine eosinophile Infiltration gekennzeichnet ist (VAN OOSTERHOUT *et al.* 1993, WILLS-KARP und EWART 1997, DORFMÜLLER *et al.* 2003, LANDGRAF und JANCAR 2008).

Trotz ausgeprägtem pulmonalarteriellem *Remodeling* konnten Daley *et al.* im T_H2-Modell keine Erhöhung des basalen rechtsventrikulären systolischen Drucks und auch keine Rechtsherzhypertrophie nachweisen (DALEY *et al.* 2008). Prolongierte Antigenapplikation resultiert im Allergen-induzierten Modell jedoch auch in pulmonaler Hypertonie (MUSHABEN *et al.* 2012). Witzenrath *et al.* beschrieben zudem, dass die pulmonale T_H2-Inflammation in Mäusen eine pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität zur Folge hat (WITZENRATH *et al.* 2006).

2.2. Das Endothelin-System

Der potente endogene Vasokonstriktor ET-1 wurde 1988 erstmals aus porzinen Aorta-Endothelzellen isoliert. ET-1 besteht aus 21 Aminosäuren und zwei intramolekularen Disulfidbrücken (YANAGISAWA *et al.* 1988, INOUE *et al.* 1989). Es weist eine Homologie zum Schlangengift Sarafotoxin S6a, 6b, 6c und 6d der *Atractaspis engaddensis* auf (KLOOG *et al.* 1988, YANAGISAWA *et al.* 1988, WILLIAMS *et al.* 1991, TAKIMOTO *et al.* 1993). Sarafotoxin 6c führt zu einer vorübergehenden Gefäßdilatation sowie zu einer verlängerten Kontraktion der glatten Muskelzellen in den Bronchien, im Gastrointestinaltrakt und im

2. Literatur

Uterussystem und wirkt über eine selektive Aktivierung des ETB-Rezeptors (WILLIAMS *et al.* 1991, TAKIMOTO *et al.* 1993, ZAMORA *et al.* 1993, MIZUGUCHI *et al.* 1997).

Es existieren drei Endothelin-Isopeptide, das klassische Endothelin (Endothelin-1; ET-1), das (Trp⁶,Leu⁷) Endothelin (Endothelin-2; ET-2) und das (Thr²,Phe⁴,Thr⁵,Tyr⁶,Lys⁷,Tyr¹⁴) Endothelin (Endothelin-3; ET-3) (YANAGISAWA *et al.* 1988, INOUE *et al.* 1989, SAIDA *et al.* 1989). Alle drei Endothelin-Isopeptide weisen eine starke vasokonstriktorische und systemische blutdrucksteigernde Wirkung auf (INOUE *et al.* 1989). Die humanen Gene für ET-1 befinden sich auf dem Chromosom 6, die für ET-2 auf dem Chromosom 1 und die für ET-3 auf dem Chromosom 20 (BLOCH *et al.* 1989, BLOCH *et al.* 1989, INOUE *et al.* 1989, ARINAMI *et al.* 1991). Bei der Maus liegen die Gene für ET-1 auf dem Chromosom 13, die für ET-2 auf dem Chromosom 4 und die für ET-3 auf dem Chromosom 2 (WILLIAMSON *et al.* 1995, MAEMURA *et al.* 1996, KOTAKE-NARA und SAIDA 2006). ET-1 wird in verschiedenen Zellen generiert. Hierbei handelt es sich in erster Linie um EC. Aber auch vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs), Kardiomyozyten, Leukozyten und Fibroblasten sind in der Lage, ET-1 zu synthetisieren (BATTISTINI *et al.* 1993, LÜSCHER und BARTON 2000). Die humane Endothelin-Synthese erfolgt aus dem Prepro-Endothelin, einem aus 212 Aminosäuren bestehenden Neuropeptid (ITOH *et al.* 1988). Dieses wird zunächst über eine Endopeptidase zum „*Big Endothelin*“ umgebaut, das bei Menschen aus 38 Aminosäuren besteht (INOUE *et al.* 1989, TAILLÉ *et al.* 2007). Aus dem *Big Endothelin* wird nun durch das Endothelin-konvertierende Enzym 1 (*endothelin-converting-enzyme-1*, ECE1) und 2 (ECE2) über eine proteolytische Spaltung das Endothelin generiert (YANAGISAWA *et al.* 1988, INOUE *et al.* 1989, IKEGAWA *et al.* 1990, XU *et al.* 1994, EMOTO und YANAGISAWA 1995).

In anästhesierten Ratten konnte die Wirkung der Isopeptide auf den systemischen Blutdruck gezeigt werden (INOUE *et al.* 1989). ET-1 und ET-2 weisen einen zweiphasigen Wirkungsverlauf auf, bei dem es nach einem Peak zu einer Absenkung der vasopressorischen Wirkung mit einem darauffolgenden Wiederanstieg und einem langsamen Abfall kommt. Bei ET-1 dauerte es ungefähr 121 Minuten bis die Druckantwort um 80% zur *Baseline* zurückgegangen war, bei ET-2 159 Minuten, während sie bei ET-3 bereits nach 74 Minuten um 80 % zurückging (INOUE *et al.* 1989).

ET-1 spielt in der Pathogenese der PAH eine wesentliche Rolle (RUBIN *et al.* 2002, GALIÉ *et al.* 2004). *Giaid et al.* konnten im Jahre 1993 bei PAH-Patienten, die bereits vaskuläre Veränderungen wie eine Verdickung der *Tunica media* und eine Fibrose der *Tunica intima* der Lungenarterien aufwiesen, mittels Immunocytochemie eine erhöhte Immunreaktivität gegenüber Endothelin-1 nachweisen. Diese zeigte sich insbesondere in den Endothelzellen veränderter muskulärer Pulmonalarterien und in plexiformen Läsionen. Eine erhöhte Endothelin-1-Expression konnte auf mRNA-Ebene an den gleichen Lokalisationen, an denen

die ET-1-Immunoreaktivität festgestellt wurde, nachgewiesen werden. Dies waren vor allem die vaskulären EC (GIAID *et al.* 1993). ET-1 fördert die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen (WEISSBERG *et al.* 1990, JANAKIDEVI *et al.* 1992). Zudem trägt ET-1 zur Migration und Proliferation der PASMC beim pulmonalarteriellen *Remodeling* bei (UNDEM *et al.* 2012, HUETSCH *et al.* 2018).

ET-1 induziert die Produktion von Zytokinen in humanen Makrophagen, wie TNF- α (HALLER *et al.* 1991, CHANEZ *et al.* 1996). Die Freisetzung von TNF- α , IL-1 β und IL-6 in humanen Monozyten wird ebenfalls durch ET-1 hervorgerufen (HELSET *et al.* 1993). ET-1 induziert in humanen Lungenfibroblasten die Expression von GM-CSF (XU und ZHONG 1997).

ET-1 spielt weiterhin eine wichtige Rolle durch die Fähigkeit, neutrophile Granulozyten zu stimulieren („*primen*“), deren Aggregation und Margination zu fördern, sowie sie zur Freisetzung von plättchenaktivierendem Faktor und Elastase zu stimulieren (MICHAEL und MARKEWITZ 1996, HENRY 1999).

Die ET-1-Plasma-Konzentration beträgt physiologischerweise bei Menschen zwischen 1-2 pg/ml, wohingegen die ET-1-Konzentration im Plasma von naiven Mäusen zwischen $0,52 \pm 0,31$ pg/ml liegt (HUMBERT und SIMONNEAU 2005, WUNDER *et al.* 2005).

ET-1 wird von Epithelzellen der Lunge vorzugsweise in Richtung *Tunica submucosa* sekretiert, wo es auto- oder parakrin wirkt (HENRY 1999). Die autokrine Aktivierung der Epithelzelle hat die Sekretion weiterer Bronchomodulatoren wie den Cyclooxygenase-Produkten Thromboxan A₂ und Prostaglandin E₂ zur Folge (TAKIMOTO *et al.* 1996). Die höchste ET-1 Konzentration scheint in Endothelzellen nachweisbar zu sein (YANAGISAWA und MASAKI 1989, OZAKI *et al.* 1995). In Endothelzellen wird die Produktion von ET-1 durch verschiedene Wirkstoffe stimuliert, wie zum Beispiel Angiotensin II, Calcium-Ionophor, Transformierender Wachstumsfaktor TGF- β , IL-1, Vasopressin und Phorbol ester (YANAGISAWA *et al.* 1989, YOSHIZUMI *et al.* 1989, IMAI *et al.* 1992, OZAKI *et al.* 1995). In den Endothelzellen wird ET-1 vorrangig in Richtung abluminaler Seite und somit ausgerichtet zur glatten Muskulatur freigesetzt, wo es parakrin wirken kann (LÜSCHER und BARTON 2000). An den glatten Muskelzellen kommt es über beide Rezeptoren zur Vasokonstriktion (MAZZUCA und KHALIL 2012).

2.2.1. Endothelin-Rezeptoren

Die vasoaktive Wirkung von ET-1 wird in den vaskulären glatten Muskelzellen über die am ETA- und ETB-Rezeptor gekoppelten G-Proteine G_q, G₁₁, G_{12/13}, G_i und G_o, und in den Endothelzellen über das am ETB-Rezeptor gekoppelte G-Protein G_q vermittelt (ARAI *et al.* 1990, SAKURAI *et al.* 1990, MAZZUCA und KHALIL 2012, HORINOUCHE *et al.* 2013). Endothelin-Rezeptoren findet man im Gefäßsystem in pulmonalen, subkutanen, koronaren

und mammären Arterien, sowie in Venen und glomerulären Kapillaren. Auf der zellulären Ebene befinden sich die ETA-Rezeptoren in den vaskulären glatten Muskelzellen, während man die ETB-Rezeptoren vor allem in den Endothelzellen und zu geringen Teilen ebenfalls in den vaskulären glatten Muskelzellen vorfindet (MAZZUCA und KHALIL 2012). Das Verhältnis der ETA- und ETB-Rezeptoren ist in den humanen Pulmonalarterien deutlich zugunsten des ETA-Rezeptors verschoben (93:7) (FUKURODA *et al.* 1994).

2.2.1.1. ETA-Rezeptor

Das Gen für den aus 427 Aminosäuren bestehenden ETA-Rezeptor befindet sich auf dem Chromosom 8 bei der Maus und auf dem Chromosom 4 bei Menschen (ARAI *et al.* 1990, HOSODA *et al.* 1991, PEZZETTI *et al.* 2000, ZHANG *et al.* 2013). Eine hohe Dichte dieses Rezeptors befindet sich auf den glatten Muskelzellen und Fibroblasten der Lunge von Maus und Mensch, vor allem in den Pulmonalarterien, aber auch in der Muskulatur der großen Bronchiolen (TAKUWA *et al.* 1989, HENRY 1999, SHI-WEN *et al.* 2001, ABRAHAM und DISTLER 2007). Besonders stark ist der ETA-Rezeptor in der *Tunica media* des proximalen Teils der pulmonalen Arterien lokalisiert. Die humanen PA weisen einen höheren Anteil an ETA-Rezeptoren als an ETB-Rezeptoren auf (DAVIE *et al.* 2002). Von den Endothelin-Isopeptiden haben ET-1 und ET-2 eine höhere Affinität zum ETA-Rezeptor als ET-3 (ARAI *et al.* 1990). ET-1 wirkt direkt auf die glatten Muskelzellen über die Bindung und konsekutive Aktivierung des ETA-Rezeptors und induziert hierüber Vasokonstriktion (OZAKI *et al.* 1995). Zudem führt ET-1 über die Aktivierung des ETA-Rezeptors zur Proliferation der PASMC (ZAMORA *et al.* 1993). Die Aktivierung des ETA-Rezeptors in humanen Bronchialepithelzellen hat eine Hochregulierung in der Genexpression und der Freisetzung von Fibronectin zur Folge, was eine starke chemotaktische Wirkung für Fibroblasten darstellt und zu deren Rekrutierung führt (MARINI *et al.* 1996).

2.2.1.2. ETB-Rezeptor

Das Gen für diesen aus 442 Aminosäuren bestehenden Rezeptor ist auf dem murinen Chromosom 14 und dem humanen Chromosom 13 lokalisiert (SAKURAI *et al.* 1990, NAKAMUTA *et al.* 1991, HOSODA *et al.* 1994, ROIX *et al.* 2001). Die Endothelin-Isopeptide weisen keine selektive Affinität zum ETB-Rezeptor auf (SAKURAI *et al.* 1990).

Die Lunge hat eine hohe ETB-Rezeptor-Expression (SAKURAI *et al.* 1990, FUKURODA *et al.* 1994). Diese sind vor allem im distalen Bereich des Lungengefäßbaums lokalisiert (DAVIE *et al.* 2002). Die ETB-Rezeptoren sind auf den EC der Lungengefäße, auf den glatten Muskelzellen der *Tunica Media* der meisten Arterien und Venen, sowie in den

Bronchiolen und Alveolen exprimiert (LI *et al.* 1994, DAVIE *et al.* 2002, KELLAND *et al.* 2010, WATTS 2010). ET-1 führt über den ETB-Rezeptor auf den glatten Muskelzellen zu einer Vasokonstriktion, wohingegen die Aktivierung des auf den Endothelzellen lokalisierten ETB-Rezeptors eine über NO- und PGI₂-Freisetzung induzierte Vasodilatation zur Folge hat (TAKAYANAGI *et al.* 1991, CLOZEL *et al.* 1992, GALIÉ *et al.* 2004). Sowohl NO als auch PGI₂ wirken zudem als antiproliferative Mediatoren (CHICHE *et al.* 1998, ZUCKER *et al.* 1998, NAGASE *et al.* 1999).

Der ETB-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der *Clearance* des ET-1. Diese erfolgt vor allem über die Lunge sowie über die Nieren und die Leber. Endothelin wird sehr schnell aus der Zirkulation entfernt. So betrug die *Clearance*-Rate eines Endothelinbolus in einer isolierten perfundierten Rattenlunge 80 % nach nur einer Passage. Die rasche Endothelin-*Clearance* könnte auch eine Ursache für die niedrige Endothelin-Konzentration im Plasma sein (FUKURODA *et al.* 1994).

2.2.2. Endothelin-Signalkaskaden

Die Signaltransduktion von ET-1 bewirkt an den glatten Muskelzellen via ETA und ETB Vasokonstriktion und Proliferation. Dabei führt die Bindung von ET-1 an ETA und ETB über eine Aktivierung der G-Proteine G_q und G_s (ETA-Rezeptor), beziehungsweise G_q und G_i (ETB-Rezeptor) zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) (REMUZZI *et al.* 2002). Diese bewirkt wiederum die Produktion der sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) (TAKUWA *et al.* 1989). Die daraufhin ausgelöste Ca²⁺-Mobilisierung erfolgt in zwei Phasen: In der ersten, schnellen Phase kommt es durch die Bindung von IP₃ an dessen Rezeptor am sarkoplasmatischen Retikulum zur Ca²⁺-Freisetzung und somit zur Erhöhung der freien intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Infolgedessen tritt in der zweiten, verzögerten Phase durch die anhaltende erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ein Influx von extrazellulärem Ca²⁺ über die speicherabhängigen Kalziumkanäle (*store-operated Ca²⁺ channels*, SOCC) ein. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Dies führt zum Einstrom des extrazellulären Ca²⁺ über die Rezeptor-gesteuerten Kalziumkanäle (*receptor-operated Ca²⁺ channels*, ROCC) (TAKUWA *et al.* 1989, SIMONSON und DUNN 1990, HORINOUCI *et al.* 2013). Durch die erhöhte Ca²⁺-Konzentration entsteht der Ca²⁺-Calmodulin-Komplex, welcher zur Phosphorylierung der Ca²⁺-abhängigen Myosin-leichte-Ketten-Kinase führt. Im Folgenden entsteht eine Aktin-Myosin-Bindung und somit die Kontraktion (HORINOUCI *et al.* 2013).

ET-1 ist ferner in der Lage über ETA und ETB den Ras-Raf-Signalweg und im Folgenden die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) zu aktivieren (WANG *et al.* 1994, YOGI *et al.* 2007). Die MAPK führt zur Kontraktion der glatten

2. Literatur

Muskelzellen und darüber hinaus im weiteren Verlauf der Kaskade zur Phosphorylierung der extrazellulär signalregulierten Kinase (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK) (ADAM und HATHAWAY 1993, YOGI *et al.* 2007, CHEN *et al.* 2009). Über eine Aktivierung der proto-Onkogene c-fos, c-myc und c-jun wird schließlich Zellproliferation induziert (TAKUWA *et al.* 1989, BOBIK *et al.* 1990, SIMONSON *et al.* 1992, WANG *et al.* 1994).

Die Aktivierung von ETA ($G_{12/13}$) führt über den Ca^{2+} -unabhängigen Rho-Kinase-Signalweg zur Vasokonstriktion. Hierbei wird der Guanosintriphosphat (GTP)-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) aktiviert, welcher im weiteren Verlauf der Signalkaskade über Rho-GTP die Rho-Kinase aktiviert. Es kommt zu einer Phosphorylierung der Myosin-Phosphatase und zur konsekutiven Kontraktion der glatten Muskelzellen (HORINOUCI *et al.* 2013). Der Rho-Kinase Signalweg spielt auch in der Vermittlung der Vasokonstriktion in experimentellen Modellen der PAH eine zentrale Rolle (OKA *et al.* 2007, FIRTH *et al.* 2012). ET-1 triggert zudem über die Rho-Kinase und den Bindegewebs-Wachstumsfaktor die Produktion extrazellulärer Matrixproteine, wie Fibronectin und Kollagen Typ I (HAHN *et al.* 1993, RIZVI *et al.* 1996, RODRIGUEZ-VITA *et al.* 2005).

Die Signaltransduktion des ETB-Rezeptors, der sich auf den EC befindetet, führt hingegen zur Vasodilatation und hat eine *Clearance*-Funktion für das zirkulierende ET-1 (TAKAYANAGI *et al.* 1991, CLOZEL *et al.* 1992, FUKURODA *et al.* 1994). Infolge der Bindung des ET-1 an den auf EC lokalisierten ETB-Rezeptor kommt es zur Aktivierung der PLC mit konsekutivem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Hierdurch kommt es zur Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin (CaM)-abhängigen endothelialen NO-Synthase (eNOS) und der Ca^{2+} -abhängigen COX-2 (HORINOUCI *et al.* 2013). Die COX-2 führt nach Freisetzung von Arachidonsäure durch die Phospholipase A_2 zur Bildung von PGI_2 aus Arachidonsäure (DEACON und KNOX 2010).

Die Aktivierung der eNOS bewirkt eine Produktion von NO. NO wird in den EC aus L-Arginin synthetisiert (LIU *et al.* 2003). Es konnte gezeigt werden, dass NO die Prepro-ET-1-Genexpression senkt und die ET-1-Sekretion mittels Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (*soluble guanylate cyclase*, sGC) reduziert (KELLY *et al.* 2004). NO und PGI_2 sind in der Lage, über verschiedene Mechanismen eine relaxierende Wirkung auf die glatten Muskelzellen hervorzurufen (HORINOUCI *et al.* 2013). NO diffundiert von den EC zu den glatten Muskelzellen, in denen es die sGC stimuliert (MONCADA und HIGGS 1991, GAO *et al.* 2016). Infolgedessen kommt es zur Erhöhung von zyklischem Guanosinmonophosphat (*cyclic guanosine monophosphate*, cGMP). Die Proteinkinase G wird stimuliert und triggert die Vasodilatation, indem es zur Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt (HORINOUCI *et al.* 2013). Der Ca^{2+} -Influx über die Ca^{2+} -Kanäle sinkt und ein Efflux in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) und nach extrazellulär findet statt (MAZZUCA und KHALIL 2012, HORINOUCI *et al.* 2013). PGI_2 induziert Vasodilatation,

indem es in glatten Muskelzellen die Adenylatcyclase stimuliert. Es kommt zu einem Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (*cyclic adenosine monophosphate*, cAMP), woraufhin die Proteinkinase A aktiviert wird. Es folgt eine Senkung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol (MAZZUCA und KHALIL 2012, HORINOUCI *et al.* 2013).

Die EC sind ein wesentlicher Ort der Endothelin-Synthese und des Endothelin-Abbaus. Die Degradierung des ET-1 erfolgt via ETB-Rezeptor. Dem ETB-Rezeptor kommt daher nicht nur in der Regulation des vaskulären Muskeltonus, sondern auch in der *Clearance* des ET-1 eine wesentliche Funktion zu. Das extrahierte Endothelin gelangt nicht zurück in die Zirkulation, sondern wird von dem vaskulären Endothel abgesondert (FUKURODA *et al.* 1994, DUPUIS *et al.* 1996, GRATTON *et al.* 1997, HENRY 1999, DUPUIS 2001). Das vom ETB-Rezeptor gebundene ET-1 wird schnell in die Zelle internalisiert (OKSCHE *et al.* 2000). Die Endozytose führt den Ligand-ETB-Rezeptor-Komplex ins Endosom/ Lysosom, wo der ETB-Rezeptor und das Endothelin gemeinsam abgebaut werden (OKSCHE *et al.* 2000, HORINOUCI *et al.* 2013).

ET-1 induziert in Fibroblasten ETA/ETB-abhängig die Produktion von Kollagen I und Kollagen III. ET-1 führt in Fibroblasten zudem via Aktivierung des ETA-Rezeptors zur Reduktion der Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1)-Sekretion. Da MMP-1 am Kollagen-Abbau beteiligt ist, könnte die Aktivierung des ETA-Rezeptors zur Akkumulation von Kollagen in der extrazellulären Matrix beitragen (SHI-WEN *et al.* 2001).

Zudem führt ET-1 in Lungenfibroblasten via ETA-Rezeptor und *rac*/ Phosphoinositid-3-Kinase/ Akt-Kaskade zur Induktion der α -SMA-Protein-Expression und fördert somit die Bildung von Myofibroblasten (SHI-WEN *et al.* 2004). Ferner konnte gezeigt werden, dass ET-1 über die MAPK/ ERK-Kinase (MEK)/ ERK/ MAPK-Signalkaskade die Genexpression des Bindegewebs-Wachstumsfaktors (CCN2) induziert, welcher zur Differenzierung von humanen Fibroblasten in Myofibroblasten beiträgt (SHI-WEN *et al.* 2004, FONSECA *et al.* 2011, WENG *et al.* 2014). Auch die Fähigkeit von TGF- β , die Expression von profibrotischen Genen wie Fibronectin, Kollagen I und CCN2 zu induzieren, ist ET-1-abhängig (SHI-WEN *et al.* 2007).

3. Material und Methoden

Die tierexperimentellen Untersuchungen erfolgten gemäß Tierschutzgesetz § 8 Abs. 1 und § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4, nach Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin.

3.1. Tiere

Die folgenden hier untersuchten Mauslinien wurden in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin gezüchtet:

- Endothelin-B-Rezeptor-defiziente Mäuse (ETB^{-/-}) mit einem Dopamin-β-Hydroxylase-ETB-Transgen auf einem C57BL/6/129-Hintergrund und deren korrespondierende Wildtyp-Mäuse (WT) (QUASCHNING *et al.* 2005);
- Humanes Prepro-Endothelin-1-überexprimierende Mäuse (ET^{tg}), Linie 856, auf einem NMRI/C57BL/6-Hintergrund und deren korrespondierende WT-Mäuse (WT) (HOCHER *et al.* 1997).

Die ETB-defizienten Mäuse ließen sich bei deutlich alterierter Hautpigmentierung und Fellfarbe phänotypisch differenzieren (OHUCHI *et al.* 1999).

Die Genotypisierung der ET^{tg}-Linie erfolgte routinemäßig mittels Standard-Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) aus Blut oder Schwanzspitzenbiopsien (Tabelle (Tab.) 1) (KRAUSE-RELLE 2010).

Tab. 1 Primer der ET^{tg}-Polymerase-Kettenreaktion

Primer	Sequenz	Bandengröße (Basenpaare)	Nachweis
ET-1 9003 se	5'CCC CAT TCT AAG CAT AGG GGC 3'	~503	ET ^{tg}
ET-1 9507 ase	5'AGC CAG TGA AGA TGG TTG GGG 3'	~503	ET ^{tg}

Die Tiere wurden in folgenden Gruppen eingesetzt:

- 1) Naive 8-12 Wochen bzw. 6 Monate alte ETB^{-/-}-Mäuse und deren korrespondierende WT-Mäuse zur Analyse funktioneller Parameter in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML), rechtsventrikulärer Hypertrophie, pulmonaler Inflammation und zur Organanalyse von Milz und Leber.
- 2) 12-14 Wochen alte ETB^{-/-}-Mäuse und deren korrespondierende WT-Mäuse nach Induktion einer pulmonalen T_H2-Inflammation zur Analyse funktioneller Parameter in der IPML, rechtsventrikulärer Hypertrophie, pulmonaler Inflammation, humoraler

Immunantwort und pulmonaler Kollagendeposition und zur Organanalyse von Milz und Leber.

- 3) Naive 2-6 Monate bzw. 16-18 Monate alte ET^{tg}-Mäuse und deren korrespondierende WT-Mäuse zur Analyse funktioneller Parameter in der IPML, rechtsventrikulärer Hypertrophie und pulmonaler Inflammation. Die Organanalyse von Milz und Leber erfolgte an naiven ET^{tg}-Mäusen und korrespondierenden WT-Mäusen der Altersklassen 2-4 Monate (Mo), 12 Mo und >16 Mo.

3.2. Tierhaltung

Während der Versuchszeit erfolgte die Haltung der Mäuse in Gruppen, spezifisch-pathogenfrei in geschlossenen, individuell ventilierten Käfigen (*individual ventilated cage*, IVC) (Typ II-L, EHERT, Emmendingen, Deutschland) mit konventioneller Einstreu. Den Tieren stand pelletiertes Ovalbumin-freies Futter und Wasser ad libitum, sowie Nist- und Spielmaterial zur Verfügung. Es gab einen zwölfstündigen Tag/Nacht-Beleuchtungsrhythmus.

3.3. Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge (IPML)

3.3.1. Isolierung von Lunge und Organen

Die im Anschluss beschriebene Präparation erfolgte gemäß Arbeitsanleitung der AG Witzenrath, modifiziert nach *von Bethmann et al.* (VON BETHMANN *et al.* 1998). Verwendete Geräte, Substanzen und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 3, 5, 11 und 12 beschrieben.

Die Maus wurde gewogen und anschließend durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (160 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (75 mg/kg Körpergewicht), gelöst in steriler isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%), narkotisiert. Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes und somit nach Erreichen des Toleranzstadiums wurde das Operationsfeld mit Braunol® gereinigt. Das Tier wurde in dorsaler Lage auf eine Präparierbank gelegt und es erfolgte die Tracheotomie nach medianer Inzision von Kutis und Subkutis. Zwischen den Knorpelspannen 2 und 3 erfolgte nach Legen einer lockeren Ligatur die transversale Inzision der Trachea, gefolgt von der Intubation. Fortan erfolgte für den Zeitraum der Präparation eine Überdruckbeatmung.

Das Tier wurde entlang der *Linea alba* laparotomiert. Jeweils lateral und parallel zur letzten Rippe wurden Entlastungsschnitte vorgenommen. Zum Eröffnen des Thorax wurde der *Processus xyphoideus* leicht angehoben und das Zwerchfell horizontal auf Höhe des

Ligamentum falciforme aufgeschnitten, sodass die Sicht auf das Herz möglich war. Es wurden 70 I.E. Heparin in einem Gesamtvolumen von 50 µl intrakardial injiziert. Nach einem einminütigen Intervall wurde das Tier über die *Vena cava caudalis* entblutet. Die Vorderextremitäten wurden auf einer Präparierunterlage in der Plexiglaskammer (Typ 839, Größe 1) (Abb.1, Tab. 3) fixiert. Anschließend wurde der Unterleib vom Thorax abgetrennt. Milz und Leber wurden teilweise asserviert und bis zur Verarbeitung auf Eis gelagert. Es folgte eine Sternotomie. Mögliche Verwachsungen der Lunge mit Pleura, Thymus oder Perikard wurden schonend gelöst, um die vollständige Entfaltung der Lunge zu ermöglichen. Der eröffnete Thorax wurde mit Nadeln fixiert. Perikard und Thymus wurden partiell stumpf abpräpariert. Um die *Arteria pulmonalis* wurde eine lockere Ligatur gelegt. Im anschließenden Präparationsschritt wurde die Herzspitze um ca. 1 mm abgeschnitten und der linke Ventrikel mittels Pinzette leicht geweitet. Der rechte Ventrikel wurde eröffnet, sodass hierüber ein Katheter in die *Arteria pulmonalis* vorgeschoben und mittels Ligatur fixiert werden konnte. Über diesen Katheter erfolgte die nicht-rezirkulierende Perfusion der Lunge mit sterilem, auf 37°C erwärmtem, blasenfreiem Perfusionsmedium mit einer konstanten Perfusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min. Für den venösen Abfluss wurde ein zweiter Katheter über den linken Ventrikel in den linken Vorhof geführt und mittels Ligatur fixiert. Als Perfusionsmedium diente ein Krebs-Henseleit-Hydroxyethylamylopectin-Puffer (Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila), der mit 20 mmol/l Natriumhydrogencarbonat 8,4% (B. Braun SE, Melsungen) und einem Gasgemisch aus 75% N₂, 20% O₂ und 5% CO₂ versetzt wurde. Nach der Präparation erfolgte das Schließen der Plexiglaskammer und das Umstellen des Beatmungsmodus von Überdruck- auf druckkontrollierte Unterdruckbeatmung (min. -4,5 bis max. -9 cm H₂O; 90 Atemzüge pro Minute; Inspirationszeit zu Expirationszeit von 1:1) mittels Venturiventil. Der linksarterielle Mitteldruck wurde auf +2,2 cm H₂O eingestellt. Zur Atelektaseprophylaxe erfolgte die Einstellung einer tiefen Inspiration (-24 cm H₂O) in Abständen von 4 Minuten.

3.3.2. Analyse der pulmonalvaskulären Reagibilität

Die Analyse der pulmonalvaskulären Reagibilität erfolgte gemäß Arbeitsanleitung der AG Witzernath. Verwendete Geräte, Software, Substanzen und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 2, 3, 5, 11 und 12 beschrieben.

Im Anschluss an die Isolierung der Lunge erfolgte nach rund 20-minütigem Intervall die Substanzapplikation. Die Vasokonstriktoren Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619, Endothelin-1 und Serotonin wurden als Einzeldosis oder in aufsteigenden Dosierungen appliziert. Mit der kontinuierlichen Gabe des selektiven Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten BQ-123 (8 µM) oder des Lösungsmittels *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) wurde 10 Minuten vor

der Endothelin-1-Applikation begonnen (Tab. 2). Die funktionellen Parameter wurden über die gesamte Versuchszeit von dem Computerprogramm Pulmodyn® (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) aufgezeichnet. Die Rohdaten wurden anschließend in eine Microsoft Excel-Datei exportiert. Die Datenanalyse erfolgte mittels GraphPad Prism® 8 (Graph Pad Software Incorporated, San Diego, USA).

Neben dem Erfassen des basalen pulmonalarteriellen Mitteldrucks im Vorfeld der Substanzapplikation erfolgte die Berechnung der pulmonalvaskulären Reagibilität (Differenz aus maximal gemessenem pulmonalarteriellen Mitteldruck und basalem pulmonalarteriellen Mitteldruck).

Tab. 2 Applikationsdauer der Substanzen und Intervalle

Substanzen/ Lösungsmittel	Applikationsdauer (min)	Intervall zwischen den Applikationen (min)
U46619/ DMSO	3	12
Endothelin-1/ Essigsäure, Aqua dest.	10	24
Serotonin/ Aqua dest.	0,5	8

3.3.3. Geräte und Software

Tab. 3 Verwendete Geräte und Software für die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge

Geräte und Software	Hersteller
Aufsätze nach Drechsler mit Filterplatte	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Chirurgisches Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
- Differentialdruckaufnehmer (DP45-14) - Druckaufnehmer (MPX Typ 399/2 und P75 Typ 379) - Messbrücke ((DBA) Typ 660) - Plexiglaskammer (Typ 839, Größe 1) - Plugsys®-Grundgerät mit Messmodulen - Pulmodyn® (Software)	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten)

3. Material und Methoden

- Silikon-Präparationsunterlage - Trachealkanüle	
Einhängethermostat (ecoline E 100)	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
GraphPad Prism® 8	Graph Pad Software Incorporated (San Diego, USA)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Peristaltikpumpe Ismatec® Reglo-Analog	Cole-Parmer GmbH (Wertheim)

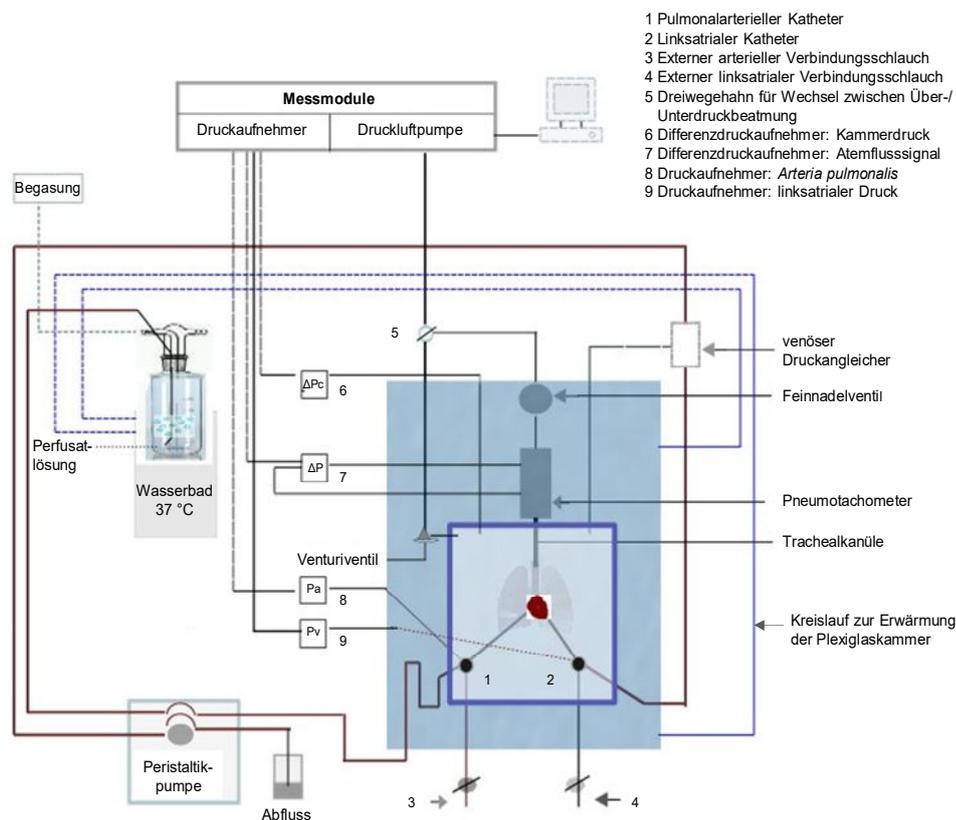


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Untersuchungseinheit der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslung (IPML)

Die präparierte Lunge befindet sich in einer geschlossenen Kammer aus Plexiglas. Über eine Trachealkanüle erfolgt initial eine Überdruckbeatmung der Lunge. Nach Schließen der Plexiglas-Kammer wird mit Hilfe des Venturiventils auf Unterdruckbeatmung umgestellt. Via pulmonalarteriellem Katheter wird die Lunge mit Perfusatlösung, die mittels Wasserbad auf 37 °C erwärmt wurde, perfundiert. Via linksatrialem Katheter erfolgt der Abfluss der Perfusatlösung. Die Plexiglas-Kammer wird mit 37 °C warmem Wasser aus dem Wasserbad umspült, so dass die Organe bei einer konstanten Temperatur gehalten werden. Es erfolgt eine kontinuierliche Aufzeichnung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks ($P_{pa\ mean}$) und der dynamischen *Compliance* (C_{dyn}). Modifiziert nach von *Bethmann et al.* (VON BETHMANN *et al.* 1998).

3.4. Materialentnahme

3.4.1. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte gemäß Arbeitsanweisung der AG Witzenrath. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 11 und 12 beschrieben.

3. Material und Methoden

Die aseptische Blutentnahme erfolgte über eine Punktion der *Vena cava caudalis*. Zur Plasmagewinnung wurde das heparinisierte Blut auf Eis gelagert und anschließend bei 1520 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus, Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau). Anschließend wurde das Plasma in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C asserviert.

3.4.2. Bronchoalveoläre Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage erfolgte gemäß Arbeitsanweisung der AG Witzenrath. Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Substanzen sind in den Tabellen 5, 10, 11 und 12 beschrieben.

Im Vorfeld der bronchoalveolären Lavage wurde zunächst die linke Lunge hilusnah ligiert und für weitere Analysen asserviert. Die rechte Lunge wurde zweimal via Trachealkanüle mit je 650 µl eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), in der zuvor der Protease-Inhibitor cOplete™ mini gelöst wurde (eine Tablette cOplete™ mini auf 10 ml PBS), langsam und gleichmäßig lavagiert. Die BALF wurde in je ein Rundbodenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 1012 g und 4°C (Heraeus, Megafuge, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils vorsichtig in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C asserviert. Die Zellpellets wurden in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und in einer Gesamtmenge von 1 ml PBS resuspendiert.

Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) der BALF bestimmt. Hierfür wurden 7 µl der resuspendierten BALF mit 7 µl Methylviolett (verdünnt in 5% Essigsäure, Merck KGaA, Darmstadt) in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und auf einem Schüttler gemischt. Anschließend wurde die Neubauer-Zählkammer mit 7 µl dieser Lösung befüllt. Die Errechnung der GZZ/ml erfolgte, indem die gefärbten Zellen aller 4 Großquadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt wurden, der Mittelwert errechnet wurde und dieser auf 1 ml umgerechnet wurde ($[GZZ/ml] = [GZZ \text{ absolut}] \times 2 \times 10^4 [1/ml]$).

3.4.3. Lungenentnahme

Die Lungenentnahme erfolgte gemäß Arbeitsanweisung der AG Witzenrath. Verwendete Substanzen, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 5, 10, 11 und 12 beschrieben.

Für die Gewinnung der blutfreien Lunge wurde diese mindestens drei Minuten mit Perfusat blutleer gespült. Anschließend wurden die einzelnen Lungenlappen distal vom Hilus entnommen, in Mikroreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C

asserviert. Für histologische Untersuchungen wurde die Lunge für 15 Minuten via Trachealkanüle mit 4% Paraformaldehyd (PFA) mit einem Druck von 20 cm H₂O instilliert. Im Anschluss wurde die Trachea ligiert, die Lunge in 4% PFA überführt, für 24 Stunden unter Lichtschutz gelagert und dann in PBS (Dulbecc's PBS (1x) ohne Calcium & Magnesium, steril, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) überführt. Das PBS wurde nach weiteren 24 Stunden durch frisches PBS ersetzt. Die Lungen befanden sich zu jedem Zeitpunkt unter einem ausreichenden Flüssigkeitsspiegel.

Die weitere Aufarbeitung der Lungen inklusive der Beurteilung der histologischen Schnitte erfolgte durch Prof. Dr. med. Thomas Tschernig (Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar).

Die Lungen wurden mithilfe eines Gewebeeinbeters (SLEE medical GmbH, Nieder-Olm) in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden fünf µm dicke Schnitte so angefertigt (Mikrotom HM355 S, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich), dass Hilus und periphere Strukturen lokalisiert werden konnten. Pro Lunge wurden mindestens vier Schnitte im Abstand von 50 µm angefertigt. Mindestens zwei Schnitte pro Lunge wurden mittels Hämatoxylin-Eosin und Masson-Goldner-Trichrom gefärbt. Die Mikrofotografien wurden per Lichtmikroskop (Axiophot, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) mittels Digitalkamera und Abbildungssystem (Color View II camera, CellSens software, Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg) aufgenommen und anschließend ausgewertet.

3.4.4. Rechtsherzanalyse

Die Rechtsherzanalyse erfolgte gemäß Arbeitsanweisung der AG Witzenrath. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 5, 11 und 12 beschrieben.

Das Herz wurde entnommen und bis zur Untersuchung in PBS gelagert. Die Analyse erfolgte mikroskopisch (Stemi DV4, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) bei 32-facher Vergrößerung. Nach Entfernung von Perikard, Fettgewebe und größeren zu- und abführenden Gefäßen, wurden beide Vorhöfe abgetrennt. Es folgte die Abtrennung des rechten Ventrikels (RV) von der restlichen Einheit bestehend aus linkem Ventrikel (LV) und Septum (S). Im Anschluss wurden die einzelnen Kompartimente mittels Feinwaage gewogen und für die Beurteilung der rechtsventrikulären Hypertrophie der Fulton-Index ($RV / (LV + S)$) ermittelt.

3.5. Zelldifferenzierung

Die Zelldifferenzierung erfolgte gemäß Arbeitsanweisung der AG Witzenrath. Verwendete Substanzen, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 5, 10, 11 und 12 beschrieben.

Pro resuspendierter BALF wurden je 2 Zytospin-Objektträger angefertigt. Hierzu wurden die Zytospins mit vorgesehenen Filtereinsätzen bestückt, die mit 100 µl sterilem PBS befeuchtet wurden. Anschließend wurden die Zytospins mit 100 µl der Resuspension befüllt und für 10 Minuten bei 72 g in der Zytospin-Zentrifuge (Shandon Cytospin®3, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) zentrifugiert. Nachdem die Zytospin-Objektträger für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet wurden, erfolgte die Pappenheimfärbung (4 Minuten Färbung mit May-Grünwald-Eosin-Methylblau-Lösung; Spülen mit Phosphatpufferlösung [pH 7,2]; 8 Minuten Giemsa-Färbung; Spülen mit Phosphatpufferlösung). Die Objektträger wurden erneut bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend eingedeckelt (Clarion™ Mounting Medium, Merck KGaA, Darmstadt). Die Zelldifferenzierung erfolgte am Mikroskop (Axioskop 20, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) mithilfe eines Zellzählergeräts (Assistent® Counter AC-12, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön).

3.6. Modell der pulmonalen T_H2-Inflammation

Die pulmonale T_H2-Inflammation erfolgte gemäß Arbeitsanweisung der AG Witzenth. Verwendete Substanzen, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 5, 6, 11 und 12 beschrieben.

Die systemische OVA-Sensibilisierung der Mäuse erfolgte an Versuchstag 0 und 14 durch intraperitoneale Applikation von 20 µg OVA (Grade V; Merck KGaA, Darmstadt) gelöst in 100 µl Aluminiumhydroxid-Suspension (1,3%; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) und 10 µl PBS. Die Kontrolltiere erhielten eine intraperitoneale Applikation von 100 µl Aluminiumhydroxid-Suspension und 10 µl PBS.

An den Tagen 28, 29 und 30 wurde in einer Aerosol-Expositionskammer (FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach), in der sich die Mäuse frei bewegen konnten, die Atemwegsexposition durchgeführt. OVA (1%, gelöst in sterilem PBS) bzw. steriles PBS als Kontrolle wurde mithilfe eines Ultraschallverneblers (FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach) als Aerosol für jeweils 20 Minuten appliziert. Am Tag 32 erfolgten die funktionellen Analysen bzw. die Asservierung von Plasma, BALF, Lunge, Milz, Leber und Herz.

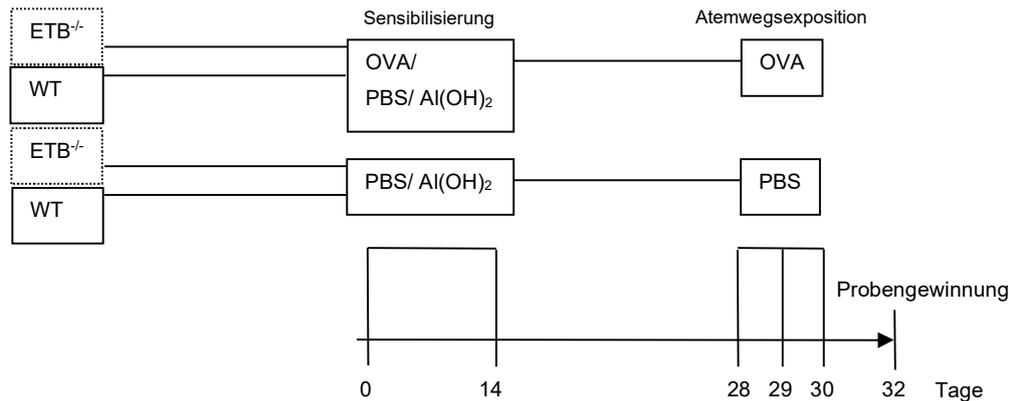


Abb. 2: Schematischer Versuchsaufbau zum Modell der pulmonalen TH2-Infiammation

An Tag 0 und 14 erfolgte die systemische Sensibilisierung mittels intraperitonealer (i.p.) Applikation einer Ovalbumin(OVA)-phosphatgepufferten Salzlösung(PBS)-Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_2$)-Suspension bzw. die Scheinsensibilisierung mittels i.p. Applikation einer PBS- $\text{Al}(\text{OH})_2$ -Suspension. An den Tagen 28, 29 und 30 erfolgte jeweils eine Atemwegsexposition mit OVA (gelöst in PBS) bzw. eine Kontroll-Exposition mit PBS. Die Analysen erfolgten an Tag 32.

Es gab 4 Versuchsgruppen (siehe Tabelle 4): zwei Verumgruppen (Endothelin-B-Rezeptor-defizient ($\text{ETB}^{-/-}$) und Wildtyp (WT)), die nach systemischer OVA-Sensibilisierung wiederholt mit OVA atemwegsexponiert wurden (OVA/OVA) und zwei Kontrollgruppen ($\text{ETB}^{-/-}$ und WT), die nach systemischer Scheinsensibilisierung wiederholt mit PBS atemwegsexponiert wurden (PBS/PBS).

Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 8-10 Wochen alt und standen über den gesamten Versuchszeitraum unter täglicher Beobachtung. Die Gruppen wurden wie folgt unterteilt:

Tab. 4: Gruppen im Modell der pulmonalen TH2-Infiammation

Mausstamm	(Schein-)Sensibilisierung	Atemwegsexposition
$\text{ETB}^{-/-}$	PBS	PBS
WT	PBS	PBS
$\text{ETB}^{-/-}$	OVA	OVA
WT	OVA	OVA

3.7. Quantifizierung von Ovalbumin-spezifischem Immunglobulin E

Die Quantifizierung von Ovalbumin-spezifischem Immunglobulin E erfolgte gemäß einer von mir modifizierten Arbeitsanweisung der AG Worm (Klinik für Dermatologie, Venerologie und

3. Material und Methoden

Allergologie, Charité Universitätsmedizin Berlin). Verwendete Substanzen, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 5, 7, 11 und 12 beschrieben.

Die Plasmakonzentration des OVA-spezifischen Immunglobulin (Ig) E wurde mittels *sandwich-enzyme-linked-immunosorbent-assay* (ELISA) bestimmt. Der Standard wurde aus dem Plasmapool der OVA-sensibilisierten und OVA-atemwegsexponierten Tiere (OVA/OVA) an Tag 32 gewonnen. Dem unverdünnten Standard wurde ein Wert von 1.000 Laboreinheiten pro Milliliter (*Lab Units*, LU/ml) zugewiesen. Die Plasmaentnahme erfolgte bei allen Tieren an Tag 32 des Protokolls (Abb. 2).

Der ELISA erfolgte wie folgt: Beschichten mittels Ratte-anti-Maus IgE-Antikörper (Klon 553413, R35-72), Blocken mit 3% bovinem Serum-Albumin, Auftragen des Standards und der Proben als Doppelbestimmung. Die Proben wurden in Verdünnungen von 1:1 bis 1:2 bei den PBS/PBS-Tieren und von 1:3 bis 1:15 bei den OVA/OVA-Tieren aufgetragen. Der Standard wurde von 1.000-1,95 LU/ml eingesetzt. Im nächsten Schritt der Detektion wurde Biotin-konjugiertes OVA und im Anschluss Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase aufgetragen. Die Substrat-Enzymreaktion erfolgte mittels 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und wurde mit Schwefelsäure in einer Konzentration von 1 mol/l gestoppt. Die Messung wurde bei 450 nm ohne Referenzfilter mittels Mikrotiterplatten-Reader HT-2 (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe) und WinRead Anthos Software (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe) durchgeführt. Zwischen jedem Schritt wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten mit PBS/Tween 20 (0,05%) gewaschen. Die Platten wurden bei 20°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Gesamtkonzentration des OVA-spezifischen IgE wurde in LU/ml angegeben. Bei nicht detektierbaren Werten wurde der Wert der unteren Detektionsgrenze verwendet.

3.8. Quantifizierung von Ovalbumin-spezifischem Immunglobulin G1

Die Quantifizierung von Ovalbumin-spezifischem Immunglobulin G1 erfolgte gemäß einer von mir modifizierten Arbeitsanweisung der AG Worm (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité Universitätsmedizin Berlin). Verwendete Substanzen, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 5, 7, 11 und 12 beschrieben.

Bei diesem ELISA handelt es sich um einen etablierten *Sandwich*-ELISA zur Bestimmung der IgG1-Konzentration im Plasma. Die Plasmagewinnung erfolgte wie bereits beschrieben an Tag 32 des Protokolls (Abb. 2).

Die einzelnen Schritte des ELISA entsprachen denen des OVA-spezifischen IgE-ELISA. Es wurden stets Doppelbestimmungen der Standards und der Proben eingesetzt. Das Beschichten erfolgte mit OVA (Grad V; 5 µg/ml), das Blocken mit 3% Milchpulver. Als Standard wurde monoklonales Anti-Ovalbumin (Klon OVA-14, Maus IgG1 Isotyp) in einer Konzentration von 3,125-0,006 µg/ml eingesetzt. Die Proben wurden 1:100-1:1600

(PBS/PBS-Gruppen) bzw. 1:400-1:8400 (OVA/OVA-Gruppen) verdünnt. Zur Detektion wurden Biotin-konjugiertes Ratte-anti-Maus IgG1 (Klon A85-1) und im Anschluss Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase eingesetzt. Die Substrat-Enzymreaktion erfolgte mittels TMB und wurde mit Schwefelsäure in einer Konzentration von 1 mol/l gestoppt. Die Messung der 96-Well-Mikrotiterplatte wurde ohne Referenzfilter bei 450 nm mittels Mikrotiterplatten-Reader HT-2 (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe) und WinRead Anthos Software (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe) durchgeführt.

Zum Waschen der Platten zwischen den verschiedenen Schritten wurde PBS/Tween 20 (0,05%) verwendet. Die Gesamtkonzentration des OVA-spezifischen IgG1 wurde in µg/ml angegeben. Bei nicht detektierbaren Werten wurde der Wert der unteren Detektionsgrenze verwendet.

3.9. Thromboxan-B₂-Quantifizierung

Die Thromboxan-B₂-Quantifizierung erfolgte mit einem kommerziellen *Kit* nach Herstelleranleitung. Verwendete Substanzen, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 7, 11 und 12 beschrieben.

Die Quantifizierung von Thromboxan B₂ erfolgte aus Perfusatproben, die im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge vor, während und nach der zehnmütigen Gabe von ET-1 (100 nM) aus dem venösen Abflussschlauch entnommen, umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C asserviert wurden. Am Tag der Thromboxan-B₂-Quantifizierung wurden die Proben gemäß Hersteller-Protokoll auf Eis aufgetaut.

Bei dem hier verwendeten kompetitiven Enzym-Immunoassay (EIA) handelt es sich um ein kommerzielles *Kit* (Cayman Chemical, Michigan, USA). Thromboxan B₂ und Thromboxan-B₂-Acetylcholinesterase-Konjugat (TXB₂-AChE-Tracer) konkurrieren hierbei um eine limitierte Anzahl an TXB₂-spezifischen Kaninchen-Antiserum-Bindungsstellen. Die einzelnen Schritte lauteten wie folgt: Die 96-Well-Mikrotiterplatte enthielt monoklonale Maus-anti-Kaninchen IgG1-Antikörper. Der Thromboxan-B₂-Standard wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml bis 7,8 pg/ml eingesetzt. Die Perfusatproben wurden unverdünnt in Doppelbestimmung aufgetragen. Die Konzentrationen des TXB₂-AChE-Tracer sowie des Antiserums sind in dem *Kit* definiert. Zur Entwicklung wurde das im *Kit* enthaltene Ellmans-Reagenz eingesetzt. Die Messung erfolgte ohne Referenzfilter bei 405 nm mittels Mikrotiterplatten-Reader HT-2 (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe) und WinRead Anthos Software (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe). Zum Waschen der Platten zwischen den verschiedenen Schritten wurde ein im *Kit* enthaltener Waschpuffer verwendet. Die Inkubation erfolgte

lichtgeschützt auf einem Schüttler. Aus den Messwerten wurden gemäß Herstelleranleitung die Thromboxan-B₂-Konzentrationen ermittelt.

3.10. Quantifizierung des vasoaktiven intestinalen Peptids

Die Quantifizierung des vasoaktiven intestinalen Peptids erfolgte mit einem kommerziellen *Kit* nach Herstelleranleitung. Verwendete Substanzen, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 7, 11 und 12 beschrieben.

Die bei -80°C asservierten Plasmaproben der OVA/OVA- und PBS/PBS-behandelten ETB-defizienten-Tiere und WT-Tiere wurden auf Eis aufgetaut. Bei diesem kompetitiven Enzym-Immunoassay handelt es sich um ein kommerzielles *Kit* (Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe), das gemäß den Herstellerangaben verwendet wurde. Die Standardverdünnungen wurden in einer Konzentration von 1,00 ng/ml bis 0,04 ng/ml eingesetzt. Die 96-Well-Mikrotiterplatte enthielt bereits den Sekundärantikörper, der an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet und die unspezifischen Bindungsstellen waren bereits geblockt. Die Standardverdünnungen und die Proben wurden in einem doppelten Ansatz aufgetragen. Der Primär-Antikörper sowie die Positivkontrollen sind in diesem *Kit* definiert. Die Detektion erfolgte mit biotinyliertem Peptid und Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase. Zur Substrat-Enzymreaktion wurde TMB eingesetzt und mit Schwefelsäure in einer Konzentration von 1 mol/l gestoppt. Die Messung der 96-Well-Mikrotiterplatte wurde ohne Referenzfilter bei 450 nm mittels Mikrotiterplatten-Reader HT-2 (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe) und WinRead Anthos Software (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe) durchgeführt.

Zum Waschen der Platten zwischen den verschiedenen Schritten wurde im *Kit* enthaltener, einfach konzentrierter Assay-Puffer verwendet. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt auf einem Schüttler. Die Gesamtkonzentration des vasoaktiven intestinalen Peptids wurde in ng/ml angegeben.

3.11. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die in der qPCR verwendeten Geräte, Substanzen und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 8, 11 und 12 beschrieben.

Die Genexpressionsanalysen erfolgten durch Dr. med. Christoph Tabeling und Dr. rer. nat. Jan Naujoks. Hierfür wurde die blutfreie rechte Lunge homogenisiert und mit 1 ml Trizol versetzt. Das Homogenat wurde schockgefroren und bei -80°C asserviert. Für die Isolation der RNS wurde 1 ml entnommen, 200 µl Chloroform zugefügt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 Minuten, 4°C, 12000 g). Die obere, wässrige Phase, welche die RNS enthält, wurde anschließend vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß

überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt, um die RNS zu präzipitieren. Nach erneuter Zentrifugation (15 Minuten, 4°C, 12000 g) wurde der Überstand verworfen und das RNS-Pellet mittels 75% Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das RNS-Pellet an der Luft für 10-15 min getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in H₂O gelöst, schockgefroren und bei -80°C asserviert. Zur Umschreibung in cDNS wurde die Reverse-Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt, mittels *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich). Der *Mastermix* bestand aus 0,8 µl dNTP-Mix, 1 µl *MultiScribe*™-RT, 2 µl RT-Puffer, 2 µl RT-*Random Primer* und aus 4,2 µl Nuklease-freiem H₂O. 10 µl der RNS-Probe und 10 µl des *Mastermix* wurden in den *Thermocycler* gegeben und nacheinander für 10 min bei 25°C, für 120 min bei 37°C und für 5 min bei 85°C inkubiert und anschließend auf 4°C heruntergekühlt.

Für die nun folgende qRT-PCR wurden das *Real Time* PCR System und die dazugehörigen Materialien (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) eingesetzt. Dabei wurden die Gene für ET-1, ETA, ETB und TXA₂ als Zielgene sowie Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als *Housekeeping* Gen amplifiziert. Der verwendete *Mastermix* setzte sich aus 4 µl destilliertem H₂O, 1 µl TaqMan™-*Assay-on-demand* und 10 µl TaqMan™-*Mastermix* zusammen. Im *Assay-on-demand* befanden sich die *Primer* für das jeweilige zu messende Gen sowie die sondengebundenen Indikatorfarbstoffe FAM und TAMRA zur quantitativen Messung. Die Proben wurden auf einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte als Doppelbestimmungen gemessen. Die Amplifikationszyklen wurden im qRT-PCR *Thermocycler* (ABI 7300 Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) wie folgt definiert: 2 Minuten bei 50°C, 10 Minuten bei 95°C und in 40-Facher Wiederholung 15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei 60°C. Zur relativen Expressionsanalyse wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet. Hierfür wurde die Expression des jeweiligen Zielgens zuerst auf die Expression des *Housekeeping* Gens normalisiert und anschließend als Zu- oder Abnahme relativ zur Kontrollgruppe quantifiziert.

3.12. Zytokinbestimmung aus der BALF

Die bei der Zytokinbestimmung verwendeten Geräte, Substanzen und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 9, 11 und 12 beschrieben.

Die Messung der Zytokine erfolgte aus BALF-Proben, die bis zur Durchführung dieses Assays bei -80°C asserviert wurden. Die Probenentnahme wurde bereits beschrieben. Die Durchführung des Assays erfolgte komplett durch Dr. med. vet. Birgitt Gutbier. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und in Abhängigkeit vom vorhandenen Material in Einfachbestimmung oder in Doppelbestimmung auf eine 96-*Well*-Mikrotiterfilterplatte aufgetragen. *Beads*, Detektionsantikörper sowie alle weiteren verwendeten Substanzen

3. Material und Methoden

wurden kommerziell erworben und der Zytokin-Multiplexassay nach Herstellerangaben (Bio-Plex™ *Cytokine Assay*, Katalog-Nummer #X60-003MAMT, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen) durchgeführt. Die Quantifizierung der Maus-Zytokine bzw. Maus-Chemokine IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-12p40, KC (*keratinocyte chemoattractant*), RANTES (CCL5) und G-CSF erfolgte aus unverdünnter BALF. Der Standard wurde nach Herstellerangaben rekonstituiert und die Standardreihe in einer eins zu vier Verdünnungsreihe (9 Verdünnungsstufen) als Einzelbestimmung aufgetragen. Im ersten Schritt wurden zur Befeuchtung der Platten 100 μ l Assaypuffer pro *Well* aufgetragen und mit Hilfe einer Vakuumpumpe wieder abgesaugt. Anschließend wurden je 50 μ l der *Beads* pro *Well* hinein pipettiert und die Flüssigkeit erneut abgesaugt. Es folgten zwei Waschschrte mit 100 μ l Waschpuffer pro *Well*. Je 50 μ l des Standards und der Proben wurden in ein *Well* gegeben und eine Stunde lang inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit je 100 μ l Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 25 μ l Detektionsantikörperlösung pro Vertiefung aufgetragen. Es folgten eine erneute Inkubationszeit von einer Stunde gefolgt von drei Waschrten mit je 100 μ l Waschpuffer. In jede Vertiefung wurden 50 μ l der Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung gegeben und für zehn Minuten inkubiert. Die angegebenen Inkubationszeiten erfolgten jeweils im Dunkeln und auf einem Schüttler (300 Umdrehungen pro Minute (rpm)). Nach drei weiteren Waschrten wurden je 125 μ l des Assaypuffers aufgetragen und die Platte direkt vor der Messung für eine Minute aufgerüttelt (1000 rpm). Als Analysegerät wurde ein Bio-Plex *Array Reader* mit der entsprechenden Software (Bio-Plex Manager™ Software Version 4.0; Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen) verwendet. Bei nicht detektierbaren Messwerten wurde die untere Detektionsgrenze der Standardkurve (*observed concentration*) für die Auswertung angegeben.

3.13. Chemikalien, Puffer, Kits, Reagenzien und Geräte

Tab. 5 Eingesetzte Substanzen im IPML-Modell/ Bronchoalveoläre Lavage

Substanzen	Hersteller
<i>Aqua ad injectabilia</i>	B. Braun SE (Melsungen)
<i>Aqua dest.</i>	B. Braun SE (Melsungen)
Beatmungsgas, direkt und über die Aufsätze nach Drechsler (5% CO ₂ , 20% O ₂ und 75% N ₂)	Abteilung Technische Gase, Charité - Universitätsmedizin Berlin
Braunol®	B. Braun SE (Melsungen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA (Darmstadt)
Endothelin-1, humanes und porcines	Merck KGaA (Darmstadt)
Essigsäure 5%	Merck KGaA (Darmstadt)
Heparin 5000 I.E./ml	PANPHARMA GmbH (Trittau)
Ketamin 10% (100 mg/ml)	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG (WDT) (Garbsen)
Krebs-Henseleit-Hydroxyethylamylopectin-Puffer	SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG (Naila)
Natriumchloridlösung (NaCl) 0,9%	B. Braun SE (Melsungen)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) 8,4%	B. Braun SE (Melsungen)
Phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's PBS (1x)) ohne Ca & Mg, steril	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) / Thermo Fischer Scientific GmbH (Dreieich)
<i>Protease-Inhibitor cOmplete™ Mini</i>	Merck KGaA (Darmstadt)
Rompun® 2% (Xylazinhydrochlorid 20 mg/ml)	Bayer AG (Leverkusen)
Serotonin Hydrochlorid (5-Hydroxytryptamin)	Merck KGaA (Darmstadt)
Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619	Merck KGaA (Darmstadt)

3. Material und Methoden

Tab. 6 Verwendete Substanzen für die Induktion der pulmonalen T_H2-Entzündung

Substanzen	Hersteller
Aluminiumhydroxid (Alu-Gel-S) 1,3% Suspension	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Ovalbumin (OVA), Grad V	Merck KGaA (Darmstadt)

Tab. 7 Eingesetzte Substanzen, Geräte und Software für ELISA/ EIA

Substanzen	Hersteller
Biotin-konjugiertes Ovalbumin	Deutsches Rheumaforschungszentrum (Berlin)
Biotin-konjugiertes Ratte-anti-Maus IgG1 Klon A85-1	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Bovines Serum-Albumin, Grad V, pH 7,0	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethanol, absolut reinst	Merck KGaA (Darmstadt)
Mikrotiterplatten-Reader (Photometer) HT-2	anthos Mikrosysteme GmbH (Friesoythe)
Milchpulver, fettarm, zum Blocken	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Monoklonales anti-Ovalbumin, Klon OVA- 14, Maus IgG1 Isotyp	Merck KGaA (Darmstadt)
Ovalbumin (OVA), Grad V	Merck KGaA (Darmstadt)
Ratte anti-Maus IgE-Antikörper (Klon 553413, R35-72)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck KGaA (Darmstadt)
TMB <i>Soluble</i>	Merck KGaA (Darmstadt)
<i>Thromboxane B2 EIA Kit</i>	Cayman Chemical (Michigan, USA)
Tween® 20	Merck KGaA (Darmstadt)
VIP EIA <i>Kit</i>	Phoenix Europe GmbH, (Karlsruhe)
WinRead Anthos Software	anthos Mikrosysteme GmbH (Friesoythe)

Tab. 8 Eingesetzte Substanzen und Geräte für die qPCR

Substanzen und Geräte	Hersteller
<i>Assay on demand</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Chloroform	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Ethanol	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
H ₂ O	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
H ₂ O, Nuklease-frei	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Mikrotiterplatte (96 Well)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
qRT-PCR <i>Thermocycler</i> (ABI 7300 <i>Real-Time</i> PCR System)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
<i>Real Time</i> PCR System®	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich))
TaqMan™ Assay Mm01243722_m1 (ETA)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
TaqMan™ Assay Mm00432989_m1 (ETB)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
TaqMan™ Assay Mm00438656_m1 (ET-1)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
TaqMan™ Assay Mm00436917_m1 (TXA ₂ -Rezeptor)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
TaqMan™ <i>-Mastermix</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Trizol	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)

Tab. 9 Eingesetzte Substanzen und Geräte für Bio-Plex

Substanzen und Geräte	Hersteller
Bio-Plex™ <i>Mouse 13-Plex Assay</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)
Bio-Plex™ <i>Cytokine Reagent Kit</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)
Bio-Plex™ <i>Millipore</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)
Bio-Plex™ <i>Multiplex-Suspension Array</i> Technologie	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)
Bio-Plex™ <i>Workstation</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)
Bio-Plex <i>Array Reader</i> mit der entsprechenden Software (Bio-Plex Manager™ Software version 4.0)	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)

3. Material und Methoden

Tab. 10 Eingesetzte Substanzen für die Zytologie und Histologie

Zytologie/ Histologie	Hersteller
Clarion™ Mounting Medium	Merck KGaA (Darmstadt)
Giemsa-Lösung	Merck KGaA (Darmstadt)
Kristallviolett	Merck KgaA (Darmstadt)
May-Grünwald-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KgaA (Darmstadt)
Natronlauge	Merck KgaA (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Merck KgaA (Darmstadt)
Phosphatpufferlösung pH 7,2	Waldeck GmbH & Co. KG (Münster)
Salzsäure	Merck KgaA (Darmstadt)
<i>Tissue-Tek® O.C.T Compound</i> , Kryoeinbettmedium	Sakura Finetek Germany GmbH (Umkirch)

3.14. Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 11 Verwendete allgemeine Geräte

Allgemeine Geräte	Hersteller
Aerosol-Expositions-System AES-0702/ Ultraschall-Aerosolgenerator LS260 modifiziert	FMI GmbH (Föhr Medical Instruments) (Seeheim-Ober Beerbach)
Analysewaage Sartorius, MC 5 (-OCE)	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav (Tuttnauer Systec 2540EL)	Systec GmbH (Linden)
Dampfsterilisator (Varioklav Typ 755)	HP Medizintechnik GmbH (Oberschleißheim)
Destillieranlage ELECT A. Dest Anlage Purelab Plus / A. Bideast Adaptor	ELGA LabWater Veolia Water Technologies Deutschland GmbH (Celle)
Eppendorf Easypet® 3	Eppendorf SE (Hamburg)
Färbekasten	neoLab Migge GmbH (Heidelberg)
Feinwaage (Sartorius CPA 224S-OCE)	Sartorius AG (Göttingen)
Flüssigstickstoff-Behälter	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Gefrierschrank -80°C	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Gefrierschrank -20°C	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Gefrierschrank -20°C	Philliph Kirsch GmbH (Willstätt-Sand)
Glasgefäße	DWK Life Sciences GmbH (Wertheim)
Glasgefäße	Technische Glaswerke Ilmenau GmbH (Ilmenau)
IKA R- Schüttler MTS 2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Kaltlichtquelle Flexilux 600 <i>longlife</i>	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH (March- Hugstetten)
Kühlschränke +4°C	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Kühlschrank +4°C	Philliph Kirsch GmbH (Willstätt-Sand)
Labor-pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin)
Mehrkanalpipetten	Eppendorf SE (Hamburg)
Magnetrührer (Variomarg Electronicrührer Mno)	HP Medizintechnik GmbH (Oberschleißheim)
Mikroskop Axioskop 20	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)

3. Material und Methoden

Mikroskop Stemi DV4	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
Multipette (Eppendorf multipette plus)	Eppendorf SE (Hamburg)
Neubauer-Zählkammer (<i>Bright-Line</i>)	LO - Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf SE (Hamburg)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Sicherheitswerkbank Herasafe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau)
<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf SE (Hamburg)
Tischzentrifuge (Galaxy mini)	VWR International GmbH (Darmstadt)
Trockenschrank (Heraeus, Function Line)	Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau)
Vortex (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, USA)
Zellzähler (Assistant® Counter AC-12)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (Sondheim vor der Rhön)
Zentrifuge (Heraeus, Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau)
Zentrifuge (Heraeus, Megafuge)	Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau)
Zytospin Shandon Cytofunnel	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Zytospin Shandon Cytoclip	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Zytospin-Zentrifuge Shandon Cytospin®3	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)

Tab. 12 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
BD Falcon™ Konische und Rundboden Röhren 15 ml/ 50 ml	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
BD Falcon™ Polypropylen Konische und Rundboden Röhren 5 ml	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
BD Falcon™ Serologische Pipetten 2 ml/ 5 ml/ 10 ml/ 25 ml	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
<i>Combitips advanced®</i>	Eppendorf SE (Hamburg)
Deckgläser	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Filterkarten Zytospin Shandon	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Histologische Einbettkassetten	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
IPML Ersatzschläuche	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten)
Kanülen	B. Braun SE (Melsungen)
	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)

Latexhandschuhe Braun Vasco® Sensitiv	B. Braun SE (Melsungen)
Mikrotiterplatte (96-Well) für ELISA	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
Mikroreaktionsgefäß, <i>Safe seal</i>	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
	Eppendorf SE (Hamburg)
Multipette, Aufsatz	Eppendorf SE (Hamburg)
Nitrilhandschuhe Braun Vasco® Nitril	B. Braun SE (Melsungen)
Objektträger	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Parafilm® M	Amcor Limited (Zürich, Schweiz)
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
	Eppendorf SE (Hamburg)
Spritzen 1 ml, 2 ml, 5 ml	B. Braun SE (Melsungen)
Schraubbecher 100 ml, steril	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
Stickstoff, flüssig	Linde GmbH (Pullach)
Trockeneis	Charité - Universitätsmedizin Berlin
Verneblungsschlauch (Polyethylen-Wellenschlauch)	FMI GmbH (Föhr Medical Instruments) (Seeheim-Ober Beerbach)
Vernichtungsbeutel	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

3.15. Statistische Datenanalyse

Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 8 (Graph Pad Software Incorporated, San Diego, USA). Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung getestet. Nicht-parametrische Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert, parametrische Daten mittels t-Test. Der Vergleich der Dosis-Wirkungskurven im Rahmen der Analyse der pulmonalvaskulären Reagibilität erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Wiederholungsmessung (*two-way repeated measures analysis of variance* (ANOVA)), bei fehlender Signifikanz beim Genotyp-Faktor wurden die einzelnen Dosierungen dezidiert mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Eine statistische Signifikanz lag bei einem P-Wert $\leq 0,05$ vor.

Ein Ausschluss von der statistischen Analyse erfolgte bei Präparationsfehlern, Lungenveränderungen (Ödeme, Embolien, Karnifizierungen etc.), technischen Messfehlern, pulmonaler Minderperfusion sowie bei sonstigen schwerwiegenden Organveränderungen.

4. Ergebnisse

4.1. Effekte der ETB-Defizienz auf das pulmonale Gefäßsystem

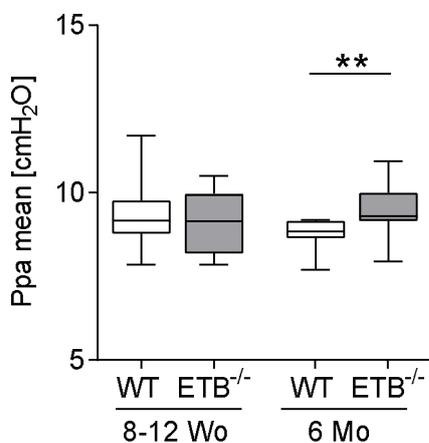
Die Analysen dienten dazu, die altersabhängigen Effekte der ETB-Defizienz auf das pulmonale Gefäßsystem zu eruieren.

4.1.1. Funktionelle Analysen in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge, basaler pulmonalarterieller Mitteldruck und dynamische Compliance

Während der unter basalen Bedingungen ermittelte pulmonalarterielle Mitteldruck (Ppa mean) der 8-12 Wochen alten ETB^{-/-}-Mäuse mit dem der WT-Mäuse vergleichbar war, zeigte sich bei den 6 Monate alten ETB^{-/-}-Tieren ein moderat, aber signifikant erhöhter Ppa mean (Abb. 3A).

Die unter standardisierten Bedingungen ermittelte dynamische Compliance zeigte sich in der Folge der ETB-Defizienz im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Tieren in beiden Altersklassen reduziert (Abb. 3B).

3A



3B

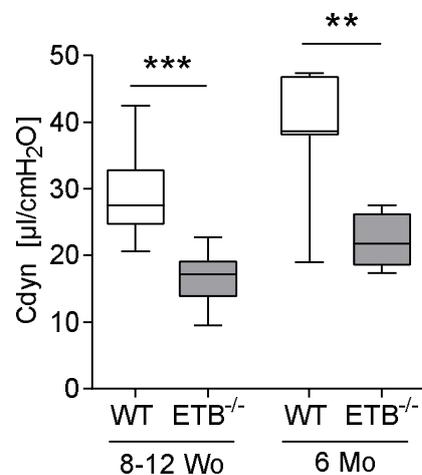


Abb. 3: Altersabhängige Effekte der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz auf pulmonalarteriellen Mitteldruck und dynamische Compliance.

In isoliert perfundierten und ventilerten Lungen 8-12 Wochen (Wo) alter und 6 Monate (Mo) alter Endothelin-B-Rezeptor-defizienter (ETB^{-/-})-Mäuse und korrespondierender Wildtyp (WT)-Mäuse erfolgte unter basalen Bedingungen die Messung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (Ppa mean) (A) und der dynamischen Compliance (C_{dyn}) (B). Dargestellt sind Median, erstes und drittes Quartil, sowie

4. Ergebnisse

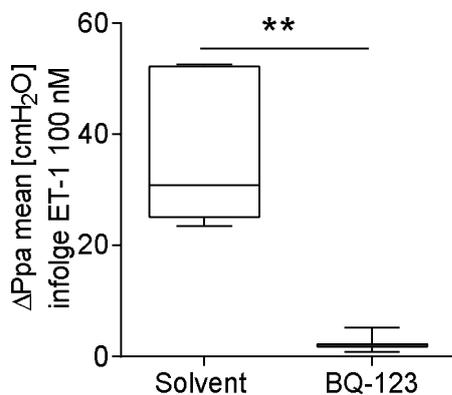
Minimum und Maximum von n=14-26 (8-12 Wochen) bzw. n=7-10 (6 Monate). ** p<0,01, *** p<0,001, Mann-Whitney-U-Test.

4.1.2. Der ETB-Rezeptor moduliert die pulmonalvaskuläre Reagibilität

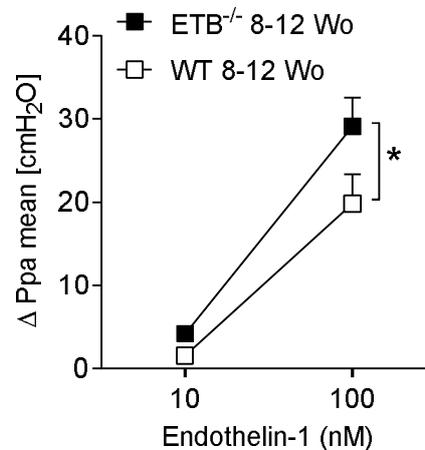
In isoliert perfundierten und ventilierten Lungen naiver 8-12 Wochen alter Wildtyp-Mäuse hatte die Applikation des Endothelin-Rezeptor-A-Inhibitors BQ-123 (8 μ M) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Solvent) eine fast vollständige Reduktion der pulmonalvaskulären Druckantwort auf 100nM Endothelin-1 zur Folge (Abb. 4A).

Im Gegensatz hierzu hatte die Defizienz des Endothelin-Rezeptors B in 8-12 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu den korrespondierenden WT-Mäusen eine signifikant höhere pulmonalvaskuläre Druckantwort auf ET-1 zur Folge (Abb. 4B). Auch die Applikation des Thromboxan-Rezeptor-Agonisten U46619 in den isolierten Lungen 6 Monate alter ETB-defizienter Mäuse führte im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen in der höchsten Konzentration zu einer verstärkten pulmonalen Vasokonstriktion (Abb. 4C).

4A



4B



4C

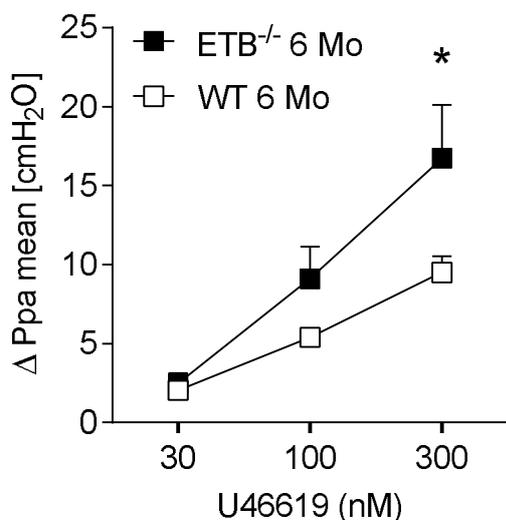


Abb. 4: Effekte der Endothelin-Rezeptoren A und B auf die pulmonale Vasokonstriktion.

Im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslung wurden die Effekte des Endothelin-Rezeptor-A-Inhibitors BQ-123 (A) bzw. der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz (ETB^{-/-}) von 8-12 Wochen (Wo) alten Tieren (B) auf die Endothelin-1 (ET-1)-evozierte pulmonalvaskuläre Reagibilität untersucht. Hierzu wurde der maximale Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (ΔP_{pa} mean) als Reaktion auf die Applikation von 100nM ET-1 ermittelt. Analog hierzu wurde der Effekt der ETB-Defizienz auf die Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619-induzierte pulmonale Vasokonstriktion bei 6 Monate (Mo) alten Tieren untersucht (C). Die Applikation des BQ-123 (8 μ M) wurde 10 Minuten vor Endothelin-Applikation begonnen und bis zum Versuchsende fortgeführt. Dargestellt sind Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum (A), bzw. der Mittelwert + SEM der beobachteten Daten (B, C) von n=5-7. * p<0,05, ** p<0,01; Mann-Whitney-U-Test (A), zweifaktorielle Varianzanalyse mit Wiederholungsmessung (Dosierung p<0,001, Genotyp p<0,05, Dosierung x Genotyp p>0,05) (B), zweifaktorielle Varianzanalyse mit Wiederholungsmessung (Dosierung p<0,001, Genotyp p>0,05, Dosierung x Genotyp p<0,05) mit Mann-Whitney-U-Test dezidiert pro Dosierung (C).

4.1.2. ETB-Defizienz ist mit rechtsventrikulärer Hypertrophie assoziiert

Die Gewichtsanalysen der Herzkompartimente mittels Fulton-Index (Quotient aus rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel inklusive Septum) ergab, dass sowohl die 8-12 Wochen alten ETB^{-/-}-Mäuse als auch die 6 Monate alten ETB^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen eine Hypertrophie des rechten Ventrikels aufwiesen (Abb. 5).

5

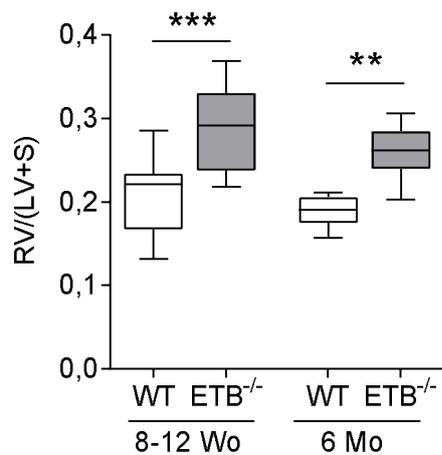


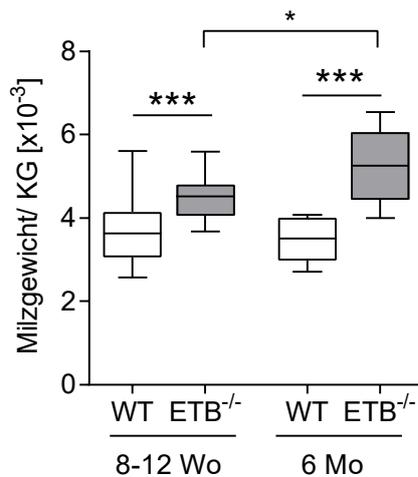
Abb. 5: Effekte der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz (ETB^{-/-}) auf das rechte Herz.

Die Rechtsherzanalyse erfolgte mittels Bestimmung des Fulton-Index (Quotient aus rechtem Ventrikel (RV) und linkem Ventrikel (LV) inklusive Septum (S)) nach dem Wiegen der Herzkompartimente. Verglichen wurden 8-12 Wochen (Wo) alte und 6 Monate (Mo) alte ETB-defiziente Mäuse mit den jeweiligen Wildtyp (WT)-Kontrollen. Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=16-21 (8-12 Wochen) bzw. n=7-8 (6 Monate). ** p<0,01, *** p<0,001; Mann-Whitney-U-Test.

4.1.3. Splenomegalie in ETB-defizienten Mäusen

In Relation zum Körpergewicht wiesen die 8-12 Wochen alten, ETB-defizienten Tiere im Vergleich zu den entsprechenden WT-Tieren eine moderate, aber signifikante Splenomegalie auf (Abb. 6A). Diese Splenomegalie zeigte sich mit zunehmendem Alter progredient (Abb. 6A). Das Lebergewicht in Relation zum Körpergewicht zeigte sich hingegen in allen untersuchten Gruppen vergleichbar (Abb. 6B).

6A



6B

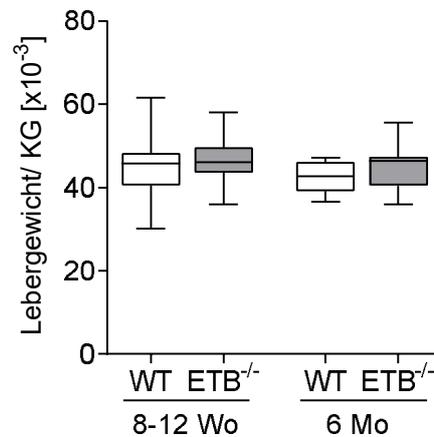


Abb. 6: Milz- (A) und Lebergewicht (B) in Relation zum Körpergewicht (KG) von 8-12 Wochen (Wo) und 6 Monate (Mo) alten Endothelin-B-Rezeptor-defizienten (ETB^{-/-})-Tieren und Wildtyp (WT)-Tieren.

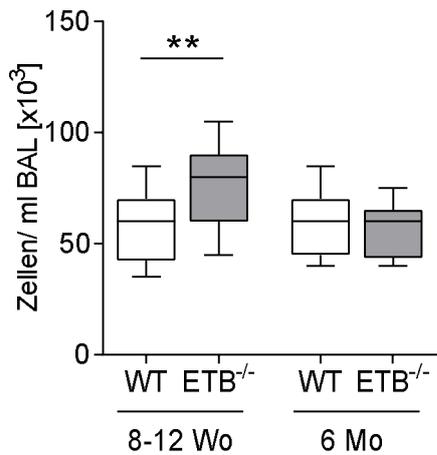
Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=16-28 (8-12 Wochen (Wo)) bzw. n=8-11 (6 Monate (Mo)). * p<0,05, *** p<0,001, Mann-Whitney-U-Test.

4.1.4. Lymphozyten in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von jungen ETB-defizienten Mäusen erhöht

Die naiven 8-12 Wochen alten ETB-defizienten Mäuse wiesen im Vergleich zu den WT-Kontrollen eine erhöhte Gesamtzellzahl in der BAL auf (Abb. 7A), was insbesondere auf eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten und Makrophagen zurückzuführen war (Abb. 7B). Zwischen den 6 Monate alten ETB-defizienten und korrespondierenden WT-Tieren konnten hingegen keine Unterschiede in der Gesamtzellzahl (Abb. 7A) und in der Anzahl der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen nachgewiesen werden (Abb. 7B).

4. Ergebnisse

7A



7B

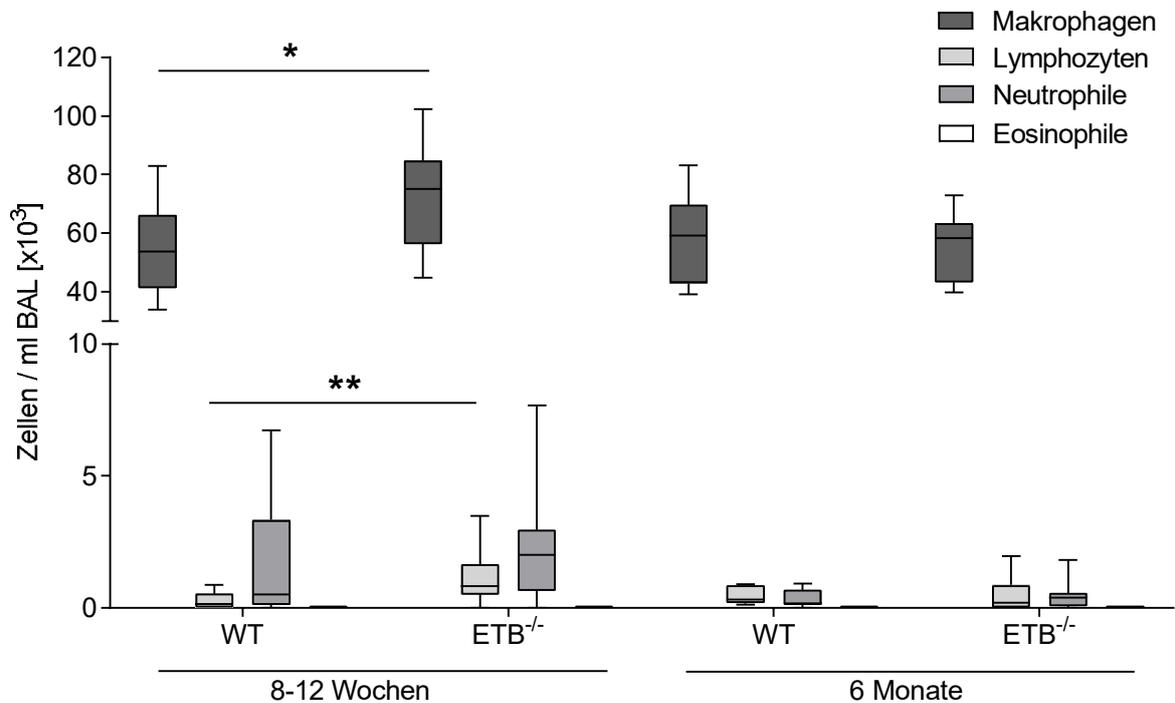


Abb. 7: Der altersabhängige Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz (ETB^{-/-}) auf die Leukozytenzahl in der bronchoalveolären Lavage (BAL).

Gesamtzellzahl (A) und Leukozytendifferenzierung (B) in der bronchoalveolären Lavage (BAL) jeweils im Vergleich zwischen naiven 8-12 Wochen (Wo) alten und naiven 6 Monate (Mo) alten ETB^{-/-}-Mäusen mit den korrespondierenden Wildtyp (WT)-Tieren. Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=13-17 (8-12 Wochen) bzw. n=7-8 (6 Monate). * p < 0,05, ** p < 0,01; Mann-Whitney-U-Test.

4.2. Die Effekte der ETB-Defizienz auf PAH-assoziierte (Gefäß-) Veränderungen in der pulmonalen T_H2-Inflammation

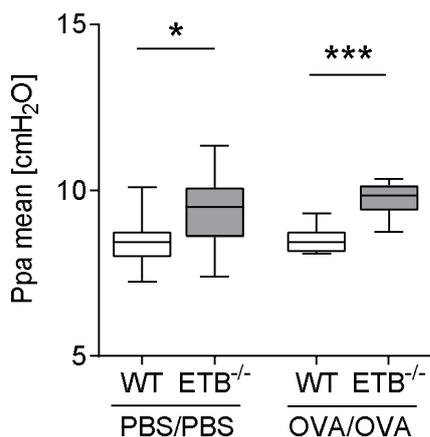
Diese Analysen dienen dazu, die Rolle des ETB-Rezeptors in der pulmonalen T_H2-Inflammation besser zu verstehen, insbesondere im Hinblick auf die Veränderungen des pulmonalen Gefäßsystems.

4.2.1. Pulmonalarterieller Mitteldruck und dynamische *Compliance* in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge

Der basale pulmonalarterielle Mitteldruck war in den ETB^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den korrespondierenden WT-Mäusen erhöht. Dieser Unterschied zeigte sich sowohl nach PBS/PBS- als auch nach OVA/OVA-Behandlung, unabhängig von pulmonaler T_H2-Inflammation (Abb. 8A).

Die Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz führte dazu, dass sowohl die Tiere der PBS/PBS- als auch die Tiere der OVA/OVA-Gruppe im Vergleich zu deren korrespondierenden Wildtyp-Tieren eine geringere dynamische *Compliance* aufwiesen. Infolge der Ovalbumin-induzierten T_H2-Inflammation kam es im Vergleich zur jeweiligen PBS/PBS-Gruppe sowohl bei den WT- als auch bei den ETB-defizienten Mäusen zu einer Reduktion der dynamischen *Compliance* (Abb. 8B).

8A



8B

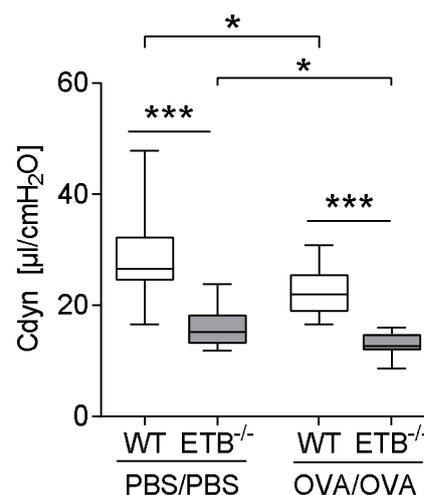


Abb. 8: Effekte der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz und der pulmonalen T_H2-Inflammation auf pulmonalarteriellen Mitteldruck und dynamische *Compliance*.

Untersucht wurden isoliert perfundierte und ventilierte Lungen Endothelin-B-Rezeptor-defizienter (ETB^{-/-})-Mäuse und korrespondierender Wildtyp (WT)-Mäuse an Tag 32 des Protokolls nach erfolgter

4. Ergebnisse

systemischer Scheinsensibilisierung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Aluminiumhydroxid an den Tagen 0 und 14 und PBS-Aerosol-Atemwegsexposition an den Tagen 28-30 (PBS/PBS) oder analog hierzu nach erfolgter systemischer Ovalbumin (OVA)-Sensibilisierung und OVA-Aerosol-Atemwegsexposition (OVA/OVA). Unter basalen Bedingungen wurden pulmonalarterieller Mitteldruck (Ppa mean) (A) und dynamische Compliance (C_{dyn}) (B) gemessen. Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=13-14 Tieren. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test.

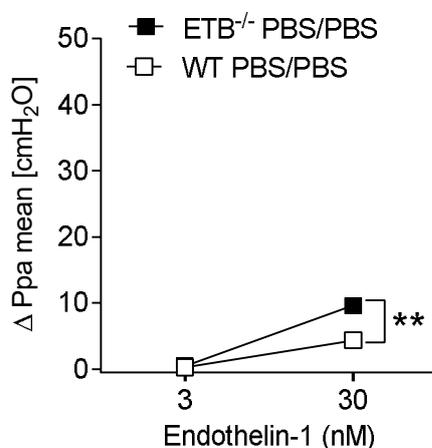
4.2.2. Einfluss der ETB-Defizienz auf die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität

Die Untersuchung der pulmonalvaskulären (Hyper-)Reagibilität erfolgte nach jeweiliger intravaskulärer Applikation der Vasokonstriktoren ET-1, Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619 und Serotonin in jeweils aufsteigenden Dosierungen.

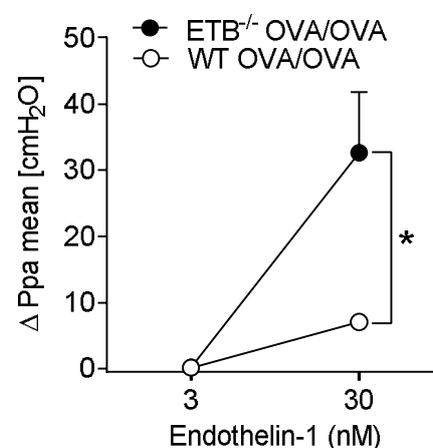
In jeder Gruppe konnten dosisabhängige Effekte der Vasokonstriktoren beobachtet werden (Abb. 9A-F). Beim Vergleich innerhalb der scheinsensibilisierten Gruppen (WT PBS/PBS und $ETB^{-/-}$ PBS/PBS) hatte die $ETB^{-/-}$ Defizienz eine erhöhte pulmonalvaskuläre Reagibilität auf ET-1 und in der höchsten Dosierung auf U46619 zur Folge, wohingegen sich die pulmonalvaskuläre Reagibilität auf Serotonin vergleichbar zeigte (Abb. 9A, 9C, 9E).

Die OVA/OVA-behandelten $ETB^{-/-}$ -Mäuse wiesen im Vergleich zu den OVA/OVA-behandelten WT-Tieren eine deutlich stärkere pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität auf ET-1 auf (Abb. 9B). Auch die pulmonalvaskuläre Druckantwort der OVA/OVA-behandelten $ETB^{-/-}$ -Mäuse auf U46619 war im Vergleich zur korrespondierenden WT-Gruppe erhöht (Abb. 9D), wohingegen das Ausmaß der pulmonalvaskulären Hyperreagibilität auf Serotonin in den WT- und $ETB^{-/-}$ -Mäusen vergleichbar war (Abb. 9F).

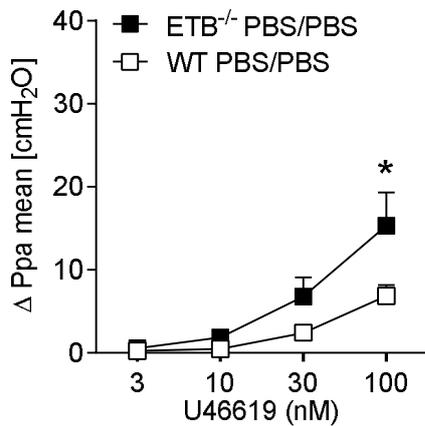
9A



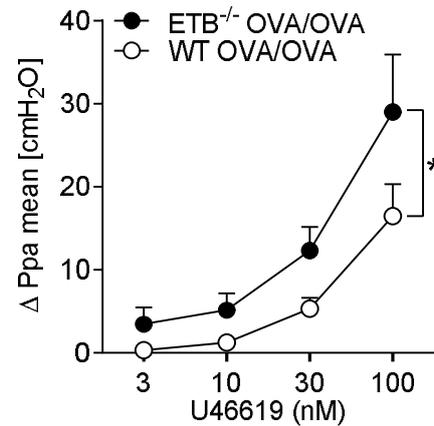
9B



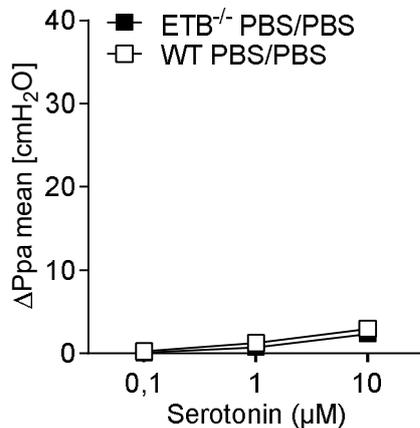
9C



9D



9E



9F

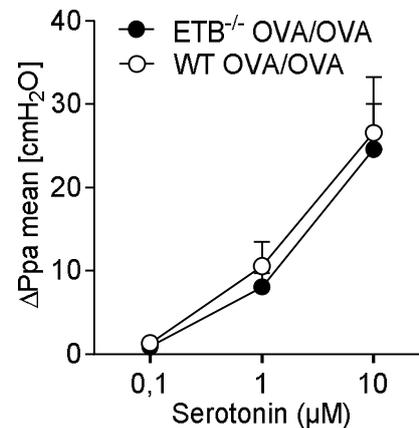


Abb. 9: Der Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz auf die T_H2-induzierte pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität.

Untersucht wurden isoliert perfundierte und ventilierte Lungen Endothelin-B-Rezeptor-defizienter (ETB^{-/-})-Mäuse und korrespondierender Wildtyp (WT)-Mäuse an Tag 32 des Protokolls nach erfolgter systemischer Scheinsensibilisierung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und PBS-Aerosol-Atemwegsexposition (PBS/PBS) oder systemischer Ovalbumin (OVA)-Sensibilisierung und OVA-Aerosol-Atemwegsexposition (OVA/OVA). Die pulmonalvaskuläre Reagibilität (Δ Ppa mean) auf Endothelin-1 (9A), Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619 (9B) und Serotonin (9C) entspricht der Differenz zwischen dem maximalen pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) infolge der Stimulus-Applikation und dem basalen Ppa mean. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der beobachteten Daten von n=5-8 Tieren. * p<0,05; ** p<0,01, zweifaktorielle Varianzanalyse mit Wiederholungsmessung mit folgenden Ergebnissen: Dosierung p<0,001, Genotyp p<0,01, Dosierung x Genotyp p<0,01 (A); Dosierung p<0,01, Genotyp p<0,05, Dosierung x Genotyp p<0,05 (B); Dosierung p<0,001, Genotyp p>0,05, Dosierung x Genotyp p<0,05 (C); Dosierung p<0,001, Genotyp

4. Ergebnisse

$p < 0,05$, Dosierung x Genotyp $p > 0,05$ (D); Dosierung $p < 0,001$, Genotyp $p > 0,05$, Dosierung x Genotyp $p > 0,05$ (E); Dosierung $p < 0,001$, Genotyp $p > 0,05$ Dosierung x Genotyp $p > 0,05$ (F). In 9C, 9E und 9F wurde aufgrund fehlenden Genotyp-Effektes ein Mann-Whitney-U-Test (dezidiert pro Dosierung), im Anschluss an die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Wiederholungsmessung durchgeführt.

4.2.3. Pulmonale T_H2 -Inflammation aggraviert die Rechtsherzhypertrophie bei Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz

Bei den PBS/PBS-behandelten ETB-defizienten Tieren war im Vergleich zu den entsprechenden WT-Tieren ein erhöhter Fulton-Index als Zeichen einer rechtsventrikulären Hypertrophie zu beobachten (Abb. 10). Interessanterweise nahm das Ausmaß der Rechtsherzhypertrophie in den ETB-defizienten Tieren im Gegensatz zu den WT-Tieren nach Induktion der pulmonalen T_H2 -Inflammation (OVA/OVA) weiter zu.

10

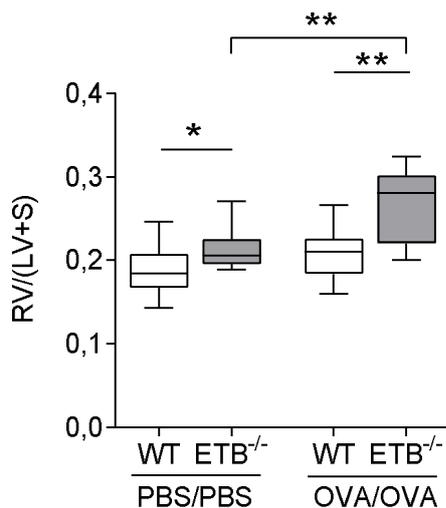


Abb. 10: Einfluss der pulmonalen T_H2 -Inflammation auf die Rechtsherzhypertrophie bei Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz.

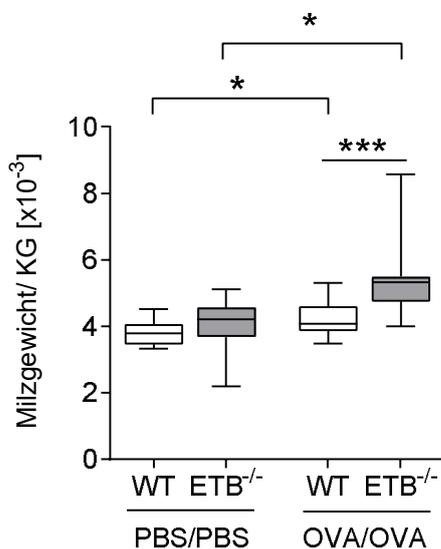
An Tag 32 des Protokolls erfolgte die Rechtsherzanalyse mittels Bestimmung des Fulton-Index (Quotient aus rechtem Ventrikel (RV)/ und linkem Ventrikel (LV) inklusive Septum (S)) nach dem Wiegen der Herzkompartimente. Verglichen wurden Endothelin-B-Rezeptor-defiziente (ETB^{-/-})-Mäuse und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse nach erfolgter systemischer Scheinsensibilisierung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und PBS-Aerosol-Atemwegsexposition (PBS/PBS) oder systemischer Ovalbumin (OVA)-Sensibilisierung und OVA-Aerosol-Atemwegsexposition (OVA/OVA). Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=10-12 Tieren. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test.

4.2.4. T_H2-induzierte Splenomegalie ist in ETB-defizienten Mäusen ausgeprägter

In beiden scheinensensibilisierten Gruppen (WT PBS/PBS und ETB^{-/-} PBS/PBS) war das Milzgewicht in Relation zum Körpergewicht vergleichbar (Abb. 11A). Die OVA/OVA-induzierte T_H2-Antwort hatte im Vergleich zu den PBS/PBS-Gruppen sowohl bei den WT- als auch bei den ETB^{-/-}-Tieren einen Anstieg des Milzgewichtes zur Folge. Diese T_H2-induzierte Splenomegalie war in den ETB-defizienten Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren stärker ausgeprägt (Abb. 11A).

Das Lebergewicht in Relation zum Körpergewicht zeigte sich in allen Gruppen vergleichbar (Abb. 11B).

11A



11B

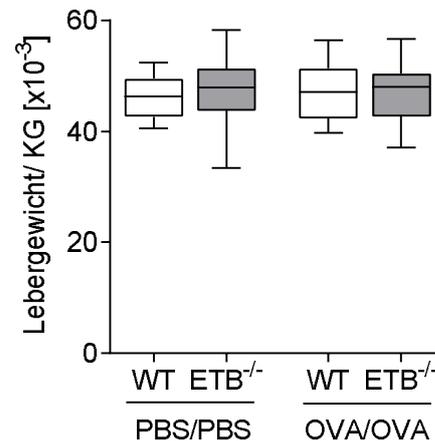


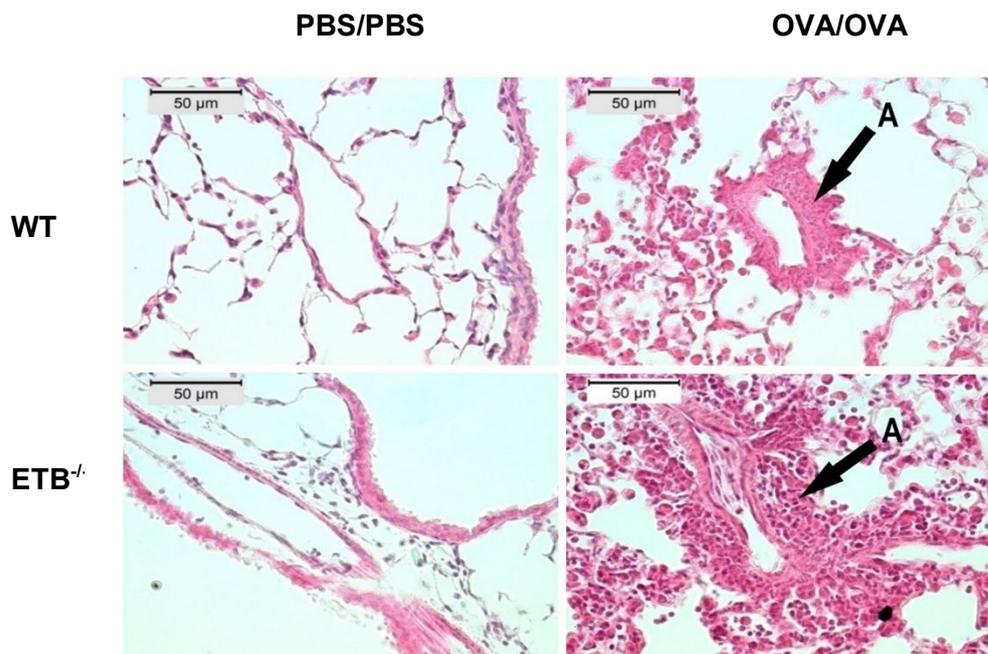
Abb. 11: Einfluss von Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz und pulmonaler T_H2-Inflammation auf Milz- (A) und Lebergewicht (B) in Relation zum Körpergewicht (KG).

Organentnahmen und Gewichtsanalysen erfolgten an Tag 32 des Protokolls. Verglichen wurden Endothelin-B-Rezeptor-defiziente (ETB^{-/-})-Mäuse und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse nach erfolgter systemischer Scheinsensibilisierung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und PBS-Aerosol-Atemwegsexposition (PBS/PBS) oder systemischer Ovalbumin (OVA)-Sensibilisierung und OVA-Aerosol-Atemwegsexposition (OVA/OVA). Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=13-14 Tieren. * p<0,05, *** p<0,001; Mann-Whitney-U-Test.

4.2.5. Verstärkte T_H2-induzierte perivaskuläre Inflammation infolge von ETB-Defizienz

Die Aufarbeitung und Analyse der Lungen nach Isolierung und Fixierung erfolgte freundlicherweise durch Prof. Dr. med. Thomas Tschernig aus dem Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar. Die in Paraformaldehyd fixierten und in Paraffin eingebetteten Lungen wurden mittels Hämatoxylin-Eosin oder Masson-Goldner-Trichrom gefärbt. Die anschließenden mikroskopischen Analysen zeigten, dass die OVA/OVA-induzierten Leukozyten-Infiltrate insbesondere perivaskulär lokalisiert waren und dass diese in den ETB^{-/-}-Lungen im Vergleich zu den WT-Lungen deutlich ausgeprägter waren (Abb. 12A). Zudem zeigten die Masson-Goldner-Trichrom-gefärbten Lungenschnitte, dass die OVA/OVA-Behandlung in den ETB-defizienten-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen eine ausgeprägtere pulmonale Kollagen-deposition zur Folge hatte (Abb. 12B).

12A



12B

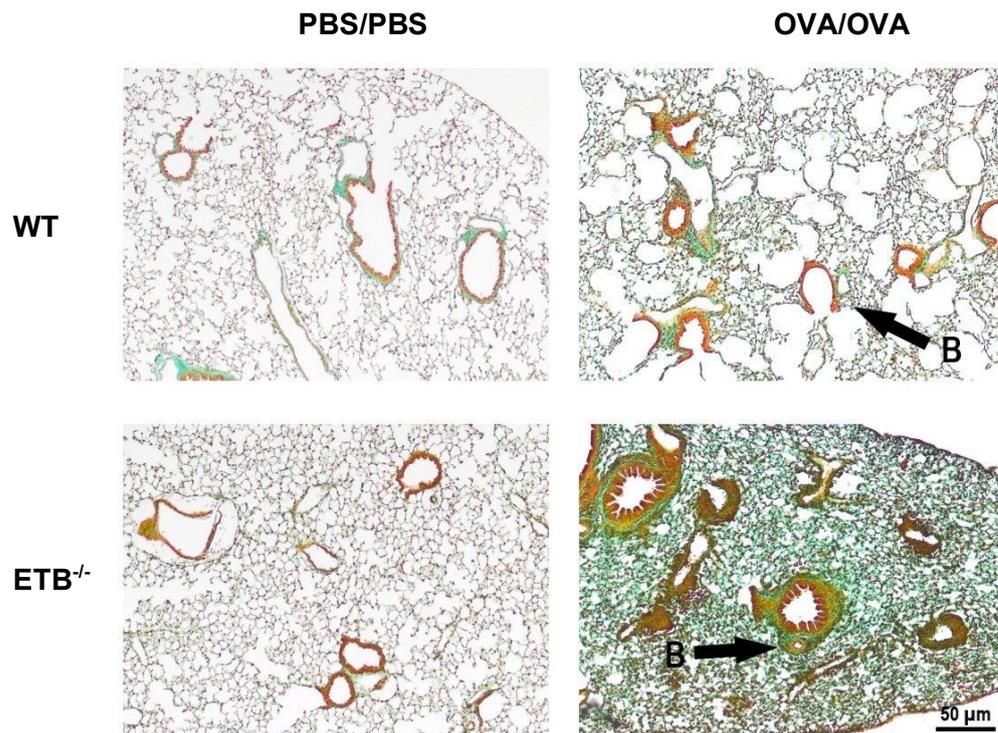


Abb. 12: Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz (ETB^{-/-}) auf T_H2-induzierte perivaskuläre Inflammation (A) und Kollagen-Deposition (B) in der Lunge.

Die Isolierung und Paraformaldehyd-Fixierung der Lungen erfolgte an Tag 32 des Protokolls. Verglichen wurden ETB^{-/-}-Mäuse und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse nach erfolgter systemischer Scheinsensibilisierung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und PBS-Aerosol-Atemwegsexposition (PBS/PBS) oder systemischer Ovalbumin (OVA)-Sensibilisierung und OVA-Aerosol-Atemwegsexposition (OVA/OVA).

Gezeigt sind Lungengewebsschnitte nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (12A) und Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (12B). Der Maßstabsbalken in 12B gilt für alle 4 Bilder. Die Abbildungen sind jeweils repräsentativ für n=7 Tiere.

4.2.6. ETB-Defizienz hat eine verstärkte pulmonale T_H2-Inflammation zur Folge

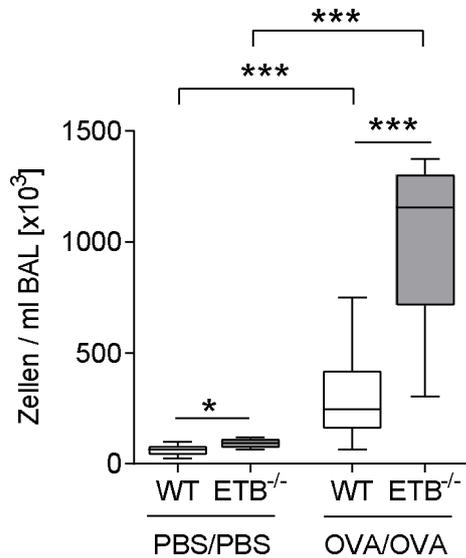
Die PBS/PBS-behandelten ETB^{-/-}-Mäuse wiesen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Mäusen eine moderat, aber signifikant höhere Gesamt-Zellzahl in der bronchoalveolären Lavage auf (Abb. 13A), mit einer erhöhten Anzahl an Makrophagen (Abb. 13B).

Infolge der Ovalbumin-Sensibilisierung und -Atemwegsexposition (OVA/OVA) kam es sowohl in den WT-Tieren als auch in den ETB^{-/-}-Mäusen zu einem Anstieg der Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) (Abb. 13A). Beide OVA/OVA-Gruppen wiesen eine eosinophile Alveolitis auf. Diese war jedoch in den ETB-defizienten-Tieren deutlich

4. Ergebnisse

verstärkt nachweisbar (Abb. 13B). Auch die Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen waren in den OVA/OVA-behandelten $ETB^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden WT-Mäusen vermehrt nachweisbar.

13A



13B

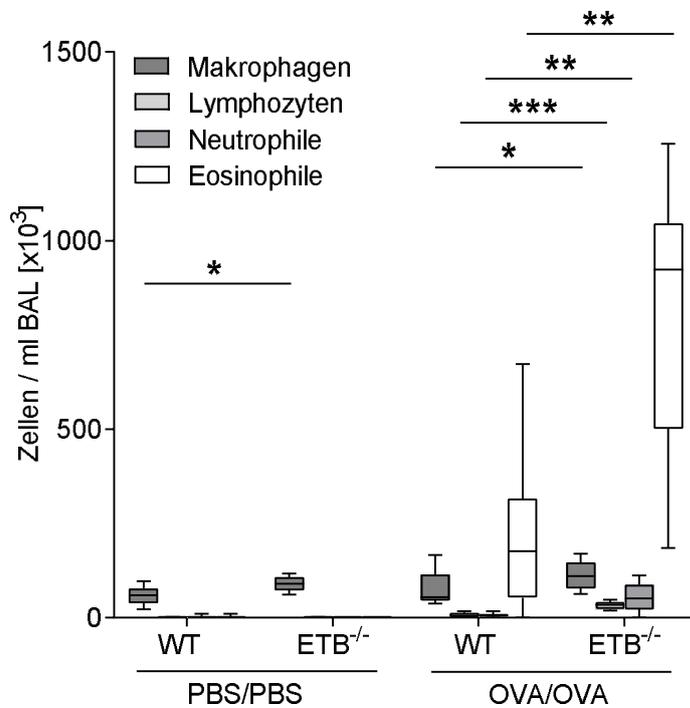


Abb. 13: Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz ($ETB^{-/-}$) auf die Gesamtzellzahl (A) und Leukozytendifferenzierung (B) in der bronchoalveolären Lavage (BAL).

Die BAL erfolgte an Tag 32 des Protokolls. Verglichen wurden ETB^{-/-}-Mäuse und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse nach erfolgter systemischer Scheinsensibilisierung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und PBS-Aerosol-Atemwegsexposition (PBS/PBS) oder systemischer Ovalbumin (OVA)-Sensibilisierung und OVA-Aerosol-Atemwegsexposition (OVA/OVA). Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=8-10 Tieren. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001; Mann-Whitney-U-Test.

4.2.7. Die pulmonale Induktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 erfolgt unabhängig von ETB

Die Quantifizierung verschiedener Zytokine und Chemokine in BALF-Proben der vier untersuchten Gruppen ergab, dass die OVA/OVA-induzierte Inflammation unabhängig von der ETB-Defizienz zu einem Anstieg der T_H2-Zytokine IL-5 und IL-13 führte. Ferner kam es infolge der OVA/OVA-Behandlung zu einem Anstieg von IL-12p40, der in den ETB^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen deutlich stärker ausfiel. G-CSF zeigte einen signifikanten Anstieg ausschließlich in der ETB-defizienten, OVA/OVA behandelten Gruppe, IL-4 in der OVA/OVA behandelten WT-Gruppe. Die OVA/OVA behandelten ETB^{-/-}-Tiere zeigten leicht niedrigere IL-2 Werte als ihre korrespondierenden WT-Tiere. Weder die ETB-Defizienz noch die OVA/OVA-Behandlung hatten einen signifikanten Effekt auf die Zytokin- und Chemokin-Level von IL-1 β , KC und RANTES (Tab. 13).

Tab. 13 Zytokin- und Chemokin-Quantifizierung in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit.

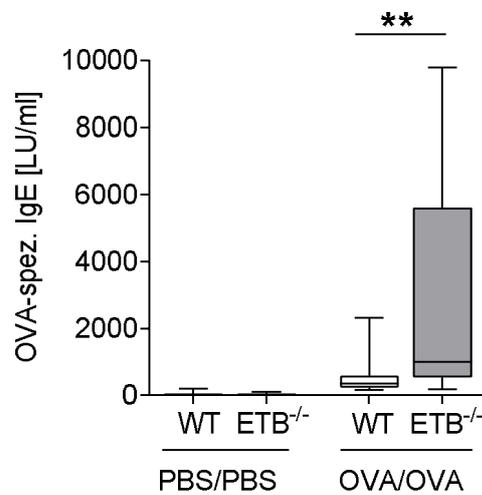
Zytokine	Detektionsgrenzen	WT PBS/PBS	ETB ^{-/-} PBS/PBS	WT OVA/OVA	ETB ^{-/-} OVA/OVA
IL-1β	6,24 - 23002	6,24 \pm 0	6,24 \pm 0	7,64 \pm 0,90	7,02 \pm 0,50
IL-2	0,91 - 3939	1,90 \pm 0,13	1,62 \pm 0,71	2,08 \pm 0,31	1,36 \pm 0,13 *
IL-4	1,01 - 14576	1,01 \pm 0	1,01 \pm 0	7,01 \pm 4,28 #	4,15 \pm 1,78
IL-5	0,45 - 1804	0,51 \pm 0,06	0,57 \pm 0,09	7,43 \pm 2,20 ##	4,31 \pm 1,15 #
IL-12p40	0,54 - 40552	25,18 \pm 4,30	22,55 \pm 1,45	80,10 \pm 21,14 #	313 \pm 47,72 #, **
IL-13	3,62 - 58768	4,56 \pm 0,62	4,15 \pm 0,53	25,04 \pm 7,79 #	21,78 \pm 5,50 #
KC	2,4 - 41653	1261 \pm 481	953 \pm 480	812 \pm 282	780 \pm 114
RANTES	5,27 - 16749	10,25 \pm 2,04	9,33 \pm 2,99	9,09 \pm 1,50	9,36 \pm 0,74
G-CSF	0,73 - 3375	29,60 \pm 8,34	19,77 \pm 4,77	92,70 \pm 29,00	142 \pm 25,84 #

Angaben in pg/ml. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=3-5 (PBS/PBS) und n=6 (OVA/OVA) Tieren. Sternchen geben signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Kontrollgruppe an (* p<0,05, ** p<0,01); Rauten geben signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen PBS/PBS-Kontrollgruppe an (# p<0,05, ## p<0,01); Mann-Whitney-U-Test.

4.2.8. ETB-Defizienz hat eine verstärkte humorale Immunantwort auf Ovalbumin zur Folge

Die Plasmaspiegel des OVA-spezifischen IgE und IgG1 waren erwartungsgemäß nach OVA/OVA-Behandlung erhöht nachweisbar (Abb. 14A und 14B). Die ETB-Defizienz führte im Vergleich zu den WT-Tieren zu einem deutlich stärkeren Anstieg der OVA-spezifischen IgE-Spiegel (Abb. 14A). Auch die OVA-spezifischen IgG1-Spiegel zeigten sich in der Tendenz ($p=0,119$) in den OVA/OVA-behandelten $ETB^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen erhöht (Abb. 14B).

14A



14B

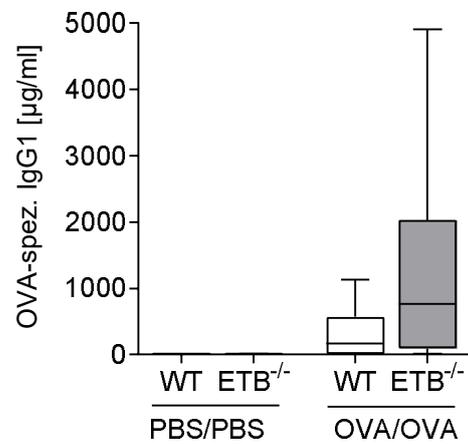


Abb. 14: Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz ($ETB^{-/-}$) auf die Plasmaspiegel von Ovalbumin (OVA)-spezifischem Immunglobulin (Ig)E (A) und IgG1 (B).

Die Gewinnung der Plasmaproben erfolgte an Tag 32 des Protokolls. Verglichen wurden $ETB^{-/-}$ -Mäuse und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse nach erfolgter systemischer Scheinsensibilisierung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und PBS-Aerosol-Atemwegsexposition (PBS/PBS) oder systemischer Ovalbumin (OVA)-Sensibilisierung und OVA-Aerosol-Atemwegsexposition (OVA/OVA). Das Detektionslimit lag bei 0,98 µg/ml (A) bzw. 0,01 µg/ml (1B). Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von $n=22-24$ Tieren (A) und $n=13-14$ Tieren (B). ** $p<0,01$; Mann-Whitney-U-Test.

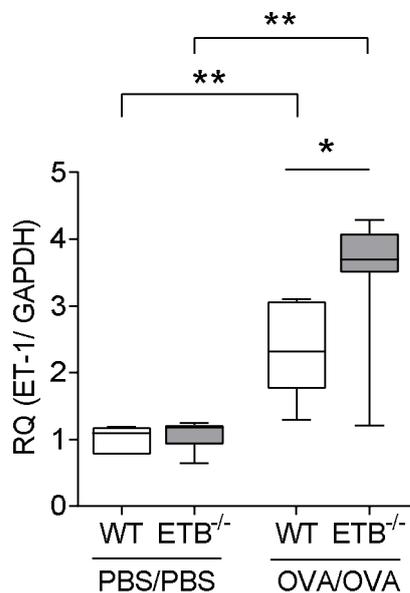
4.2.9. ETB-Defizienz führt zu einer verstärkten pulmonalen Endothelin-1-Expression infolge von T_H2-Inflammation

Auf mRNA-Ebene zeigte sich infolge der OVA/OVA-Behandlung eine Hochregulierung der pulmonalen ET-1-Expression (Abb. 15A). Diese Hochregulierung war in den ETB^{-/-}-Lungen im Vergleich zu den WT-Lungen ausgeprägter. Der Endothelin-Rezeptor A war infolge der OVA/OVA-Behandlung herunterreguliert (Abb. 15B), wobei die ETA-Expression in den OVA/OVA-behandelten ETB^{-/-}-Lungen moderat, aber signifikant im Vergleich zu den entsprechenden WT-Lungen verringert war.

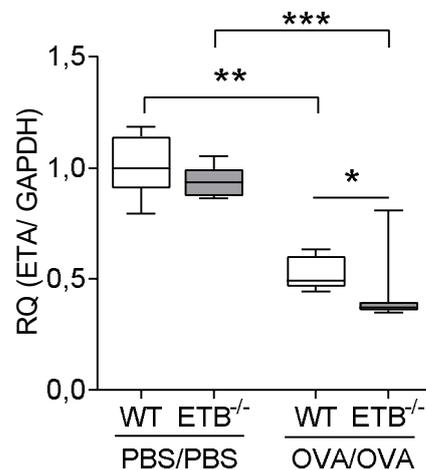
Die ETB-Expression war in den Lungen der PBS/PBS-behandelten ETB^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen um circa 50% niedriger. Infolge der OVA-induzierten Inflammation sank die ETB-Expression in beiden Gruppen (Abb. 15C).

Im Vergleich beider PBS/PBS-Gruppen wiesen die ETB^{-/-}-Lungen eine in der Tendenz (p=0,073) höhere TXA₂-Rezeptor-Expression als die WT-Lungen auf. Die pulmonale mRNA-Expression des TXA₂-Rezeptors zeigte sich in den OVA/OVA-behandelten Gruppen im Vergleich zu den PBS/PBS-behandelten Gruppen herunterreguliert (Abb. 15D).

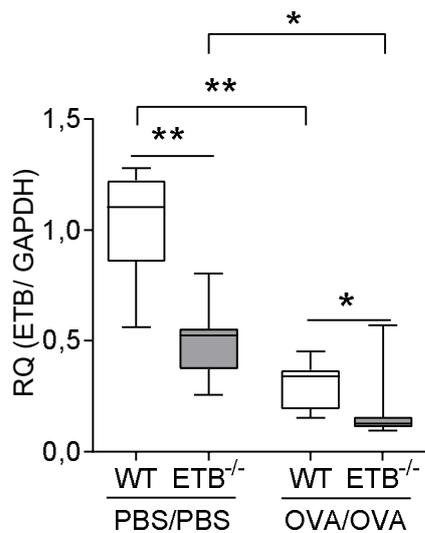
15A



15B



15C



15D

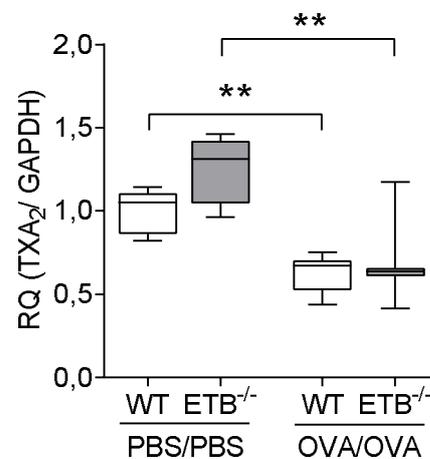


Abb. 15: Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz ($ETB^{-/-}$) und der T_H2 -Inflammation auf die pulmonale messenger Ribonukleinsäure (mRNS)-Expression.

Die Isolierung der Lungen erfolgte an Tag 32 des Protokolls. Verglichen wurden $ETB^{-/-}$ -Mäuse und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse nach erfolgter systemischer Scheinsensibilisierung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und PBS-Aerosol-Atemwegsexposition (PBS/PBS) oder systemischer Ovalbumin (OVA)-Sensibilisierung und OVA-Aerosol-Atemwegsexposition (OVA/OVA). Die mRNS-Expressionsanalysen erfolgten mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qPCR) in der relativ quantitativen (RQ) Messung unter Verwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hierfür wurde die Expression des jeweiligen Zielgens (Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-Rezeptor A (ETA), Endothelin-Rezeptor B (ETB) und Thromboxan- A_2 -Rezeptor (TXA_2)) zuerst auf die Expression des *Housekeeping* Gens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert und anschließend als Zu- oder Abnahme relativ zur Kontrollgruppe quantifiziert. Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von $n=6-7$ Tieren. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$); Mann-Whitney-U-Test.

4.2.10. Kein Einfluss der ETB-Defizienz auf den Plasmaspiegel des vasoaktiven intestinalen Peptids

Zur Untersuchung eines potenziellen pathomechanistischen Zusammenhangs zwischen dem Endothelin-System in der pulmonalen T_H2 -Inflammation und dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) erfolgte die Quantifizierung des VIP-Plasmaspiegels mittels EIA. Weder die OVA/OVA-Behandlung noch die ETB-Defizienz hatten einen signifikanten Einfluss auf den VIP-Plasmaspiegel.

16

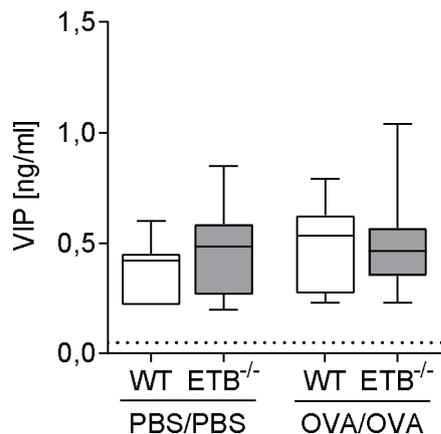


Abb. 16: Quantifizierung der Plasmaspiegel des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP).

Die Gewinnung der Plasmaproben erfolgte an Tag 32 des Protokolls. Verglichen wurden Endothelin-B-Rezeptor-defiziente (ETB^{-/-})-Mäuse und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse nach erfolgter systemischer Scheinsensibilisierung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und PBS-Aerosol-Atemwegsexposition (PBS/PBS) oder systemischer Ovalbumin (OVA)-Sensibilisierung und OVA-Aerosol-Atemwegsexposition (OVA/OVA).

Das Detektionslimit lag bei 0,05 ng/ml (gepunktete Linie). Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=7-8 Tieren pro Gruppe.

4.2.11. Thromboxan-Freisetzung infolge ET-1-Applikation

Das folgende Experiment hatte zum Ziel, die Effekte der ETB-Defizienz auf die Endothelin-1-vermittelte pulmonalvaskuläre Thromboxan-A₂-Freisetzung zu untersuchen. Da Thromboxan A₂ in der Blutbahn eine äußerst kurze Halbwertszeit von 30 Sekunden hat, ehe es zu Thromboxan B₂ degradiert wird (CHRISTMAN *et al.* 1992), erfolgte die Quantifizierung von Thromboxan B₂ aus Perfusatproben mittels EIA. Die jeweiligen Perfusatproben wurden während des IPML-Experiments zwei Minuten vor der ET-1-Applikation sowie zwei, sechs, zehn und 14 Minuten nach der ET-1-Applikation asserviert. Nach sechs und nach zehn Minuten zeigten die Perfusatproben der naiven ETB-defizienten Tiere im Vergleich zu den Perfusatproben der naiven WT-Kontrollen deutlich höhere Thromboxan-B₂-Konzentrationen (Abb. 17). Nach Beendigung der ET-1-Applikation kam es wieder zu einer Reduktion der pulmonalvaskulären Thromboxan-Freisetzung (Abb. 17).

17

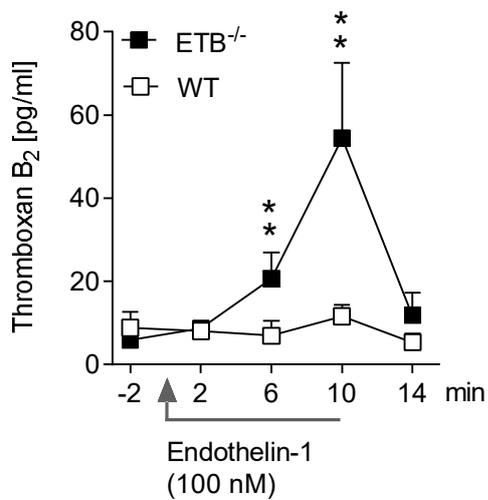


Abb. 17: Der Einfluss der Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz auf die pulmonalvaskuläre Thromboxan-B₂-Freisetzung.

Im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge erfolgte die Asservierung von Perfusatproben zwei Minuten (min) vor einer zehnminütigen Endothelin-1-Applikation sowie zwei, sechs, zehn und 14 Minuten nach der Endothelin-1-Applikation. Die Thromboxan-B₂-Level der Perfusatproben Endothelin-B-Rezeptor-defizienter (ETB^{-/-})-Lungen und korrespondierender Wildtyp (WT)-Lungen wurden vergleichend untersucht. Das Detektionslimit lag bei 7,8 pg/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der beobachteten Daten von je n=7 Tieren. ** p<0,01; Mann-Whitney-U-Test (dezidiert pro Zeitpunkt) im Anschluss an zweifaktorielle Varianzanalyse mit Wiederholungsmessung (Zeitpunkt p<0,05, Genotyp p>0,05, Zeitpunkt x Genotyp p<0,01).

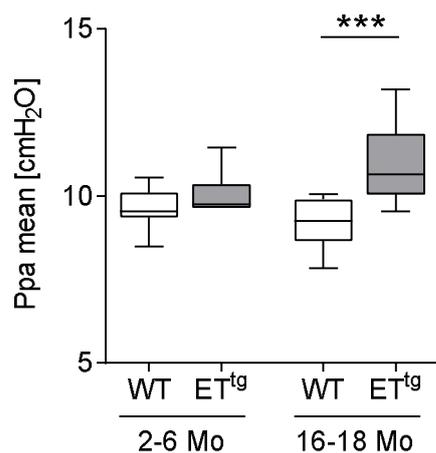
4.3. Altersabhängige Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression

4.3.1. Die Überexpression von Prepro-Endothelin-1 (ET^{tg}) führt zu einem Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks

Während sich der basale pulmonalarterielle Mitteldruck (Ppa mean) der 2-6 Monate alten ET^{tg}-Tiere im Vergleich zu den WT-Kontrollen unverändert zeigte, führte die Prepro-Endothelin-1-Überexpression in den gealterten Tieren zu einem moderaten, aber signifikanten Anstieg des Ppa mean im Vergleich zu den korrespondierenden WT-Tieren (Abb. 18A).

Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression auf die basale dynamische *Compliance* ließen sich hingegen nicht nachweisen. Altersbedingt zeigten sowohl die WT- als auch die ET^{tg}-Tiere eine erhöhte dynamische *Compliance* (Abb. 18B).

18A



18B

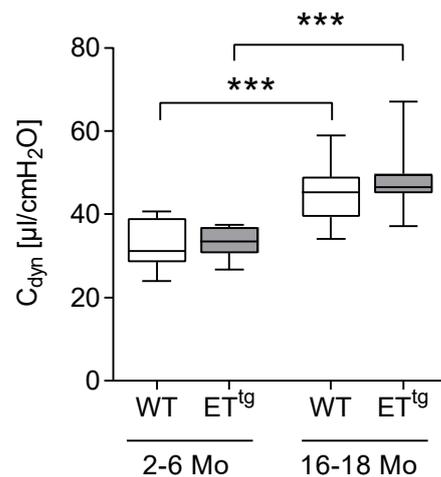


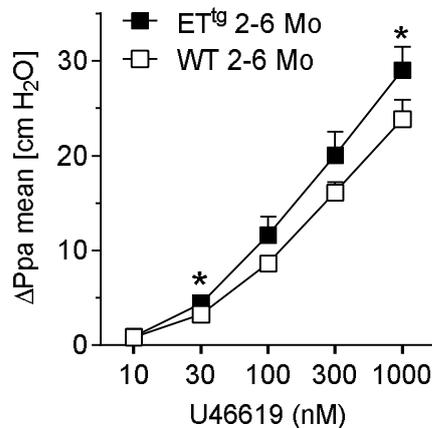
Abb. 18: Altersabhängige Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf den basalen pulmonalarteriellen Mitteldruck (Ppa mean) und die dynamische *Compliance* (C_{dyn}).

Isoliert perfundierte und ventilierte Lungen naiver ET^{tg}-Mäuse und korrespondierender Wildtyp (WT)-Mäuse der Altersklassen 2-6 Monate (Mo) und 16-18 Mo wurden untersucht. Unter standardisierten basalen Bedingungen erfolgten die Messungen des Ppa mean (A) und der C_{dyn} (B). Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=7-12 (2-6 Mo) und n=9-11 (16-18 Mo). *** p<0,001; Mann-Whitney-U-Test.

4.3.2. Altersabhängige Effekte der Prepro-ET-1-Überexpression auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität

Die 2-6 Monate alten ET^{tg}-Tiere wiesen in der höchsten Dosierung im Vergleich zu den entsprechenden WT-Kontrolltieren eine moderat verstärkte Reagibilität auf den Thromboxan-Rezeptor-Agonisten U46619 auf (Abb. 19A). Die U46619-evozierte pulmonalvaskuläre Reagibilität der 16-18 Monate alten ET^{tg}-Tiere zeigte sich im Vergleich zur korrespondierenden WT-Gruppe unverändert (Abb. 19B).

19A



19B

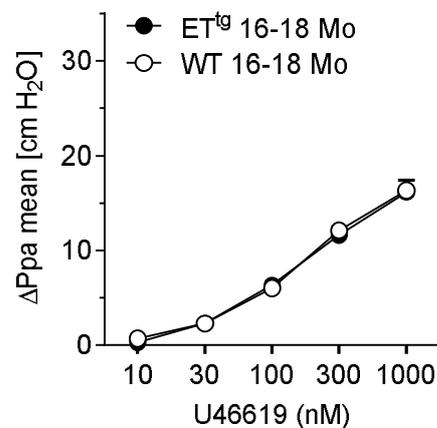


Abb. 19: Altersabhängige Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf die pulmonalvaskuläre Reagibilität.

Isoliert perfundierte und ventilierte Lungen naiver ET^{tg}-Mäuse und korrespondierender Wildtyp (WT)-Mäuse der Altersklassen 2-6 Monate (Mo) und 16-18 Mo wurden untersucht. Zur Untersuchung der pulmonalvaskulären Reagibilität erfolgte die intravasale Applikation des Thromboxan-Rezeptor-Agonisten U46619 in aufsteigenden Dosierungen. Die pulmonalvaskuläre Reagibilität entspricht dem maximalen Anstieg des pulmonalarteriellen Mittelrucks (ΔP_{pa} mean) als Reaktion auf die U46619-Applikation. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM von $n=7-12$ (2-6 Mo) und $n=9-10$ (16-18 Mo) Tieren.

* $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test (dezidiert pro Dosierung) im Anschluss an zweifaktorielle Varianzanalyse mit Wiederholungsmessung (Dosierung $p < 0,001$, Genotyp $p > 0,05$ Dosierung x Genotyp $p > 0,05$ (A); Dosierung $p < 0,001$, Genotyp $p > 0,05$, Dosierung x Genotyp $p > 0,05$ (B)).

4.3.3. Chronische Prepro-ET-1-Überexpression induziert Rechtsherzhypertrophie

Die Herzanalyse mittels Fulton-Index ergab, dass die 16-18 Monate alten ET^{tg} -Tiere im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen eine rechtsventrikuläre Hypertrophie aufwiesen (Abb. 20). Bei den jüngeren ET^{tg} -Tieren lag hingegen keine Rechtsherzhypertrophie vor.

20

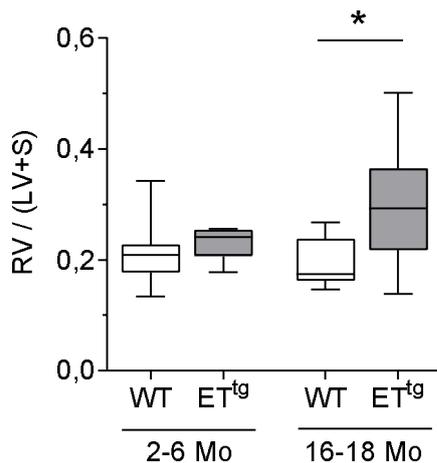


Abb. 20: Altersabhängige Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf den Fulton-Index.

Analysiert wurden naive ET^{tg} -Mäuse und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse der Altersklassen 2-6 Monate (Mo) und 16-18 Mo. Die Rechtsherzanalyse erfolgte mittels Bestimmung des Fulton-Index (Quotient aus rechtem Ventrikel (RV) und linkem Ventrikel (LV) inklusive Septum (S)) nach dem Wiegen der Herzkompartimente. Dargestellt sind der Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=5-9 (2-6 Mo) und n=9-11 (16-18 Mo). * $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test.

4.3.4. Erhöhte Lymphozytenzahl in der bronchoalveoläre Lavage-Füssigkeit der gealterten ET^{tg}-Mäuse

Die Analyse der entnommenen BAL-Proben diente der Ermittlung der Zellzahl der Leukozyten-Subpopulationen. Infolge der chronischen Überexpression von ET-1 konnte bei den 16-18 Monate alten Mäusen eine moderate, aber signifikante Erhöhung der Lymphozytenzahl beobachtet werden. Die älteren Tiere zeigten im Vergleich zu den jüngeren Tieren eine signifikante Abnahme der Makrophagenzahl, unabhängig von der ET-1-Überexpression (Abb. 21).

21

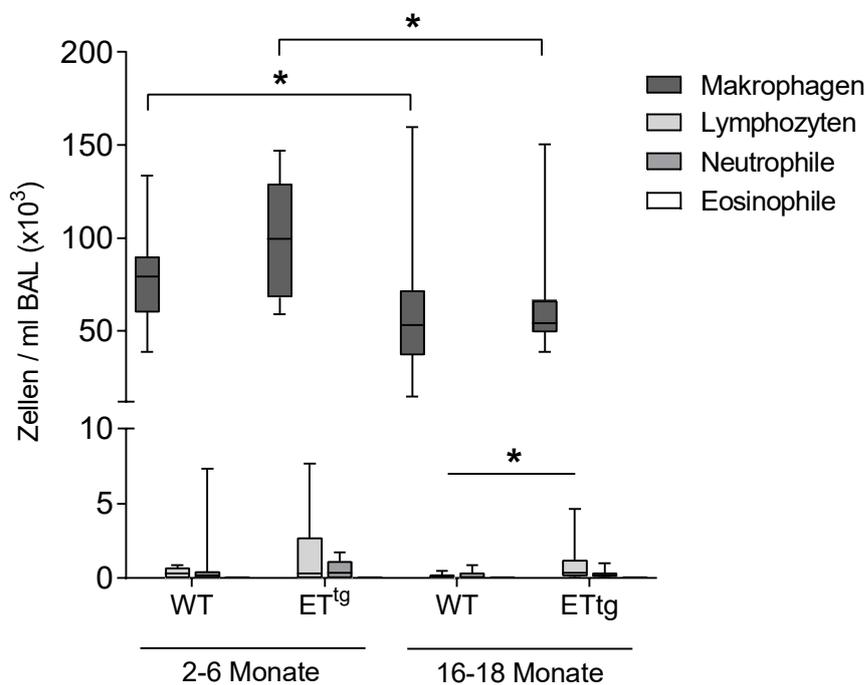


Abb. 21: Altersabhängige Effekte der Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf die Leukozyten-Subpopulationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Analysiert wurden naive ET^{tg}-Mäuse und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse der Altersklassen 2-6 Monate (Mo) und 16-18 Mo. Dargestellt sind Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=7-12 (2-6 Mo) und n=10-17 (16-18 Mo). * p<0,05; Mann-Whitney-U-Test.

4.3.5. Altersabhängige Splenomegalie infolge der Prepro-ET-1-Überexpression

Die ET^{tg}-Tiere wiesen in allen untersuchten Altersklassen im Vergleich zu den entsprechenden WT-Tieren eine signifikante Splenomegalie auf (Abb. 22A, 23A). Diese Splenomegalie war mit zunehmendem Alter progredient (Abb. 23A).

Während die jungen ET^{tg}-Tiere (2-4 Monate) im Vergleich zu den entsprechenden WT-Tieren ein leicht, aber signifikant geringeres Lebergewicht in Relation zum Körpergewicht aufwiesen, zeigten die alten ET^{tg}-Tiere (≥16 Monate) im Vergleich zu den WT-Kontrollen ein höheres Lebergewicht in Relation zum Körpergewicht (Abb. 23B). Das Körpergewicht selbst war zwischen den verwendeten Mauslinien nicht verschieden (Abb. 22B).

22A



22B

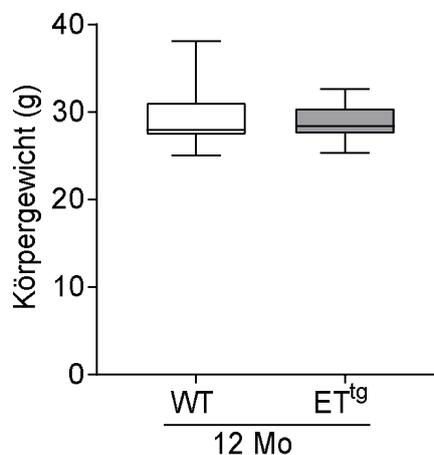
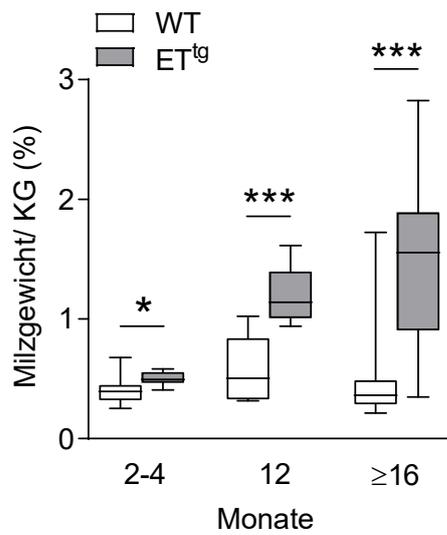


Abb. 22: Foto repräsentativer Milzen von 12 Monate alten Mäusen (A) und Körpergewicht in Gramm (g) von 12 Monate (Mo) alten Prepro-Endothelin-1-überexprimierenden Mäusen (ET^{tg}) im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäusen (B).

A: Gezeigt wird die altersabhängige Splenomegalie der Prepro-Endothelin-1-überexprimierenden Mäuse (ET^{tg}) gegenüber den korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäusen (siehe Abb. 23A). Am unteren Bildrand ist ein Lineal in cm abgebildet.

B: Dargestellt sind Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=8-9 Tieren, Mann-Whitney-U-Test

23A



23B

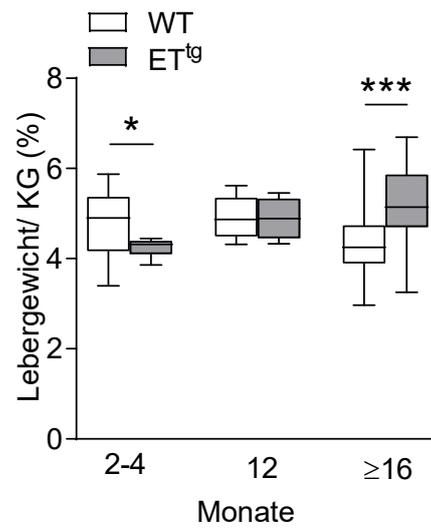


Abb. 23: Altersabhängiger Einfluss der Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf Milz- (A) und Lebergewicht (B) in Relation zum Körpergewicht (KG).

Analysiert wurden naive ET^{tg}-Mäuse und korrespondierende Wildtyp (WT)-Mäuse der Altersklassen 2-4 Monate (Mo), 12 Mo und ≥16 Mo. Dargestellt sind Median, erstes und drittes Quartil, sowie Minimum und Maximum von n=12-16 (2-4 Mo), n=8-9 (12 Mo) und n=36-41 (≥ 16 Mo). * p<0,05, *** p<0,001; Mann-Whitney-U-Test.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle des Endothelin-Systems in Bezug auf PAH-assoziierte pulmonale Gefäßveränderungen unter Einsatz zweier genmodifizierter Mausmodelle.

Hierfür kamen sowohl naive junge und naive gealterte Tiere, als auch Tiere im akuten T_H2-Modell zum Einsatz. Im Wesentlichen gliedert sich die Arbeit in drei Kapitel: Das erste Kapitel befasst sich mit den (altersabhängigen) Effekten der ETB-Defizienz auf PAH-assoziierte Veränderungen, das zweite mit der Rolle des ETB-Rezeptors in der pulmonalen T_H2-Inflammation und das dritte mit den altersabhängigen Effekten der Überexpression von Prepro-Endothelin-1 auf pulmonalvaskuläre Hämodynamik und Rechtsherzhypertrophie.

Die erhobenen Daten bestätigen die Hypothese, dass die Überexpression von Endothelin-1 pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität, pulmonale Hypertonie und rechtsventrikuläre Hypertrophie bedingt, während der ETB-Rezeptor eine protektive Rolle in der Entstehung der pulmonalen Hypertonie, Rechtsherzhypertrophie und pulmonalvaskulären Hyperreagibilität ausübt. Während die jungen ET^{tg}-Mäuse ausschließlich eine pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität aufwiesen, zeigten die gealterten ET^{tg}-Mäuse einen fixierten pulmonalen Hypertonus und eine Rechtsherzhypertrophie. Endothelin-1 ist als alleiniger Stimulus somit ausreichend, PAH-assoziierte Veränderungen in der Maus hervorzurufen. Dasselbe trifft für das Vorliegen einer ETB-Defizienz zu. Ferner konnte hier gezeigt werden, dass pulmonale T_H2-Inflammation als zweiter Stimulus („*second hit*“) die PAH-assoziierten Veränderungen infolge der ETB-Defizienz verstärkt.

Das Modell der pulmonalen T_H2-Inflammation stellt ein validiertes PAH-Modell dar, in dem es zu den PAH-typischen Gefäßveränderungen kommt (PABST und TSCHERNIG 2002, RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2005, WITZENRATH *et al.* 2006, DALEY *et al.* 2008, HABERBERGER *et al.* 2009). Das hier eingesetzte *ex vivo* Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML) ist eine gut etablierte und validierte Methode zur kontinuierlichen Messung funktioneller Parameter inklusive des pulmonalarteriellen Mitteldrucks und der dynamischen *Compliance*. Das Modell wurde von von Bethmann *et al.* im Jahre 1998 zum ersten Mal beschrieben (VON BETHMANN *et al.* 1998). Die Isolierung der Mauslunge bedarf großer chirurgischer Präzision. Indem die Lunge als intaktes Organ für diese Methode zum Einsatz kommt, können über den Lungenkreislauf verabreichte Vasokonstriktoren in Kürze ihre Wirkung in der Lunge entfalten. Im Folgenden kann die pulmonalvaskuläre Druckantwort grundlegend untersucht werden. Diese Untersuchungen erfolgen ohne den Einfluss metabolischer, humoraler oder vegetativer Faktoren. In diesem weitestgehend blutfreien System wird das Blut durch eine nicht rezirkulierende Elektrolytlösung ersetzt (VON BETHMANN *et al.* 1998, HELD *et al.* 1999, SEYBOLD *et al.*

2005, WITZENRATH *et al.* 2006, WITZENRATH *et al.* 2006). Ein Nachteil des IPML-Modells besteht in der fehlenden Möglichkeit, die Auswirkungen der Substanz-Applikationen auf die Herzfunktion zu untersuchen.

In experimentellen Untersuchungen zur Rolle des ETB-Rezeptors in der pulmonalen T_H2-Inflammation unter Einsatz ETB-defizienter Mäuse (ETB^{-/-}) und korrespondierender Wildtyp-Mäuse konnte gezeigt werden, dass signifikante Unterschiede in der Hämodynamik vorhanden sind. So zeigten die ETB-defizienten Mäuse eine pulmonale Hypertonie, eine Rechtsherzhypertrophie und eine pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität, wobei sowohl die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität als auch die Rechtsherzhypertrophie nach Induktion einer pulmonalen T_H2-Inflammation aggravierten.

Wie bereits von *Witzenrath et al.* und *Haberberger et al.* beschrieben, kommt es infolge pulmonaler T_H2-Inflammation zu einer ausgeprägten pulmonalvaskulären Hyperreagibilität (WITZENRATH *et al.* 2006, HABERBERGER *et al.* 2009). Auch in dieser Arbeit führte die pulmonale T_H2-Inflammation infolge der OVA/OVA-Behandlung sowohl in den Wildtyp-Tieren als auch in den ETB-defizienten Tieren zu einer ausgeprägten pulmonalvaskulären Hyperreagibilität auf die intravasal applizierten Vasokonstriktoren Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619 bzw. ET-1. Interessanterweise war diese Hyperreagibilität bei den ETB-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren deutlich stärker ausgeprägt. Infolge der pulmonalen T_H2-Inflammation kam es erwartungsgemäß zudem zu einer pulmonalvaskulären Hyperreagibilität auf den Stimulus Serotonin, wobei die Hyperreagibilität hier von der ETB-Defizienz unbeeinflusst blieb. Dies zeigt, dass ETB-Defizienz die T_H2-vermittelte pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität Stimulus-spezifisch moduliert.

Hinweise für eine T_H2-induzierte Hochregulation des ETA- oder des TXA₂-Rezeptors als mögliche Erklärung für die gesteigerte Reagibilität infolge der ETB-Defizienz fanden sich in den hier durchgeführten mRNS-Analysen nicht. Jedoch zeigten sich Hinweise für eine Modulation der ET-1-vermittelten intravaskulären Thromboxan-Freisetzung in den ETB^{-/-}-Mäusen. Wie bereits beschrieben vermittelt ET-1 die Freisetzung von Thromboxan A₂, das wiederum über TXA₂-Rezeptor-Aktivierung zur ET-1-vermittelten pulmonalvaskulären Druckantwort beiträgt (DE NUCCI *et al.* 1988, INOUE *et al.* 1989, HORGAN *et al.* 1991). Die hier durchgeführten Untersuchungen konnten nun nachweisen, dass ETB-Defizienz eine deutlich ausgeprägtere ET-1-induzierte Thromboxan-Freisetzung zur Folge hat. Somit könnte die verstärkte Thromboxan-Freisetzung in den ETB^{-/-}-Mäusen zur deutlich verstärkten pulmonalen Druckantwort auf ET-1 beitragen. Interessanterweise konnten verschiedene Arbeitsgruppen bei PAH-Patienten erhöhte Plasmaspiegel und eine erhöhte Freisetzung von Thromboxan B₂ nachweisen (CHRISTMAN *et al.* 1992, ADATIA *et al.* 1993, FUSE und KAMIYA 1994). Auch in Mäusen mit einer heterozygoten Mutation im *bone morphogenetic protein receptor* (BMPR^{+/-}) stellten *Song et al.* im Vergleich zu den korrespondierenden

Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Thromboxan-A₂-Produktion nach einer Behandlung mit 5-Lipoxygenase-überexprimierenden Adenoviren fest (SONG *et al.* 2005).

Darüber hinaus ist der ETB-Rezeptor für die ET-1-Clearance zuständig (FUKURODA *et al.* 1994, DUPUIS *et al.* 1996, HENRY 1999). Diese Funktion ist bei den ETB-defizienten Tieren eingeschränkt (BAGNALL *et al.* 2006). In den hier durchgeführten Analysen kam es in den ETB^{-/-}-Mäusen nach Induktion der T_H2-Inflammation zu einer erhöhten pulmonalen ET-1-Expression im Vergleich zu den Wildtypen, so dass, analog zu den ET^{tg}-Tieren, in den ETB^{-/-}-Mäusen eine Endothelin-1-vermittelte Hyperreagibilität möglich erscheint.

Wie bereits in vielen Arbeiten beschrieben, tritt infolge der Gefäßveränderungen im Laufe der PAH eine Rechtsherzhypertrophie ein (HUMBERT *et al.* 2004, RYAN und ARCHER 2014). Im weiteren Verlauf der Erkrankung führt die Erschöpfung der kompensatorischen Mechanismen zu einer Rechtsherzdilatation und zum Tode durch Rechtsherzversagen (PERROS *et al.* 2021). Der Fulton-Index ist ein gut etabliertes Maß für die rechtsventrikuläre Hypertrophie. Auch in anderen PAH-Modellen kommt es zu Veränderungen dieses Index (DALEY *et al.* 2008, WANG *et al.* 2013, KURAKULA *et al.* 2021). Die in dieser Arbeit untersuchten ETB^{-/-}-Mäuse wiesen im Vergleich zu den Wildtypen bereits in naivem Zustand einen erhöhten Fulton-Index auf. Interessanterweise führte die Induktion der pulmonalen T_H2-Inflammation zu einer weiteren Zunahme der rechtsventrikulären Hypertrophie in den ETB^{-/-}-Mäusen.

Bereits in einer früheren Arbeit von Park *et al.* an BMPR2-hypomorphen Mäusen konnte gezeigt werden, dass pulmonale T_H2-Inflammation als „second hit“ die Entstehung der pulmonalen Hypertonie triggert. Die BMPR2-hypomorphen Mäuse wiesen dazu einen erhöhten rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSD) auf (PARK *et al.* 2013). Inwiefern die in der vorliegenden Arbeit untersuchten genetisch modifizierten Mauslinien auch eine Veränderung des RVSD aufweisen, bedarf weiterer Studien.

Die experimentellen Beobachtungen von Park *et al.* stehen außerdem in Einklang mit neueren klinischen Erkenntnissen, dass PAH-Patienten ebenfalls erhöhte Level an T_H2-Zytokinen aufweisen (HUMBERT *et al.* 1995, SOON *et al.* 2010, PRICE *et al.* 2012, PARK *et al.* 2013, RABINOVITCH *et al.* 2014). In dieser Arbeit konnte infolge der Induktion der T_H2-Inflammation erwartungsgemäß ein pulmonaler Anstieg der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 nachgewiesen werden, wie auch bereits in anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt (HABERBERGER *et al.* 2009, TABELING *et al.* 2014). Interessanterweise zeigten sich trotz der deutlich ausgeprägteren pulmonalen Leukozyteninfiltrate in den ETB-defizienten Lungen im Vergleich zu den WT-Lungen keine Unterschiede in Bezug auf die pulmonalen T_H2-Zytokin-Level. Jedoch kam es infolge der OVA/OVA-Behandlung zu einem Anstieg des Zytokins IL-12p40, der in den ETB^{-/-}-Tieren deutlich stärker ausfiel als bei den WT-Tieren. Bemerkenswerterweise stellten Larsen *et al.* in humanen IPAH- und APAH-Patienten

erhöhte IL-12p40-Serumspiegel fest (LARSEN *et al.* 2011). Ebenfalls erhöhte IL-12p40-Serumspiegel fanden sie in Chemokin-Rezeptor CCR7-defizienten Mäusen, die einen pulmonalen Hypertonus und pulmonale perivaskuläre Leukozyteninfiltrate aufwiesen (LARSEN *et al.* 2011). *Huaux et al.* wiesen für IL-12p40 eine wichtige Rolle in der Entstehung der Lungenfibrose nach (HUAUX *et al.* 2002). Möglicherweise fördern die deutlich erhöhten IL-12p40-Spiegel in den OVA/OVA-behandelten ETB^{-/-}-Mäusen also sowohl die ausgeprägte perivaskuläre Inflammation als auch die Kollagendeposition in den Lungen.

Dorfmüller et al. wiesen einen Anstieg der mRNA-Expression des Chemokins RANTES in Lungenproben von Humanpatienten mit schwerer PAH nach (DORFMÜLLER *et al.* 2002). In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch kein Anstieg festgestellt werden. Dabei ist zu beachten, dass die Expression von RANTES bei *Dorfmüller et al.* vor allem in Endothelzellen von vom *Remodeling* betroffenen Lungenarterien nachgewiesen wurde (DORFMÜLLER *et al.* 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse jedoch in einem akuten Modell untersucht, bei dem zwar glattmuskuläre Proliferation, jedoch kein manifestes pulmonalarterielles *Remodeling* nachzuweisen ist (HABERBERGER *et al.* 2009). Inwiefern die Expression von RANTES zu einem späteren Zeitpunkt angestiegen wäre, kann nicht beantwortet werden.

Daley et al. konnten zeigen, dass IL-13 wesentlich zum T_H2-assoziierten pulmonalarteriellen *Remodeling* der Maus beiträgt (DALEY *et al.* 2008). *Park et al.* konnten in weiterführenden Analysen in einem OVA-Sensibilisierungsmodell, bei dem eine zusätzliche Exposition mit Feinstaub durchgeführt wurde, nachweisen, dass IL-17A eine protektive Rolle spielt, indem es PAH-assoziierte IL-13-evozierte Effekte inhibiert (PARK *et al.* 2014). Die simultane Neutralisation von IL-13 und IL-17A verminderte die Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Drucks, der zirkumferentiellen Muskularisation der Pulmonalarterien, sowie der Expression von Gehirn-natriuretischem Peptid (*brain natriuretic peptide*, BNP), einem Marker für rechtsventrikuläre Belastung beim Menschen (FRITZ *et al.* 2013, PARK *et al.* 2014).

Cho et al. zeigten, dass IL-13-überexprimierende Mäuse spontan pulmonalarterielles *Remodeling*, pulmonale Hypertonie und Rechtsherzhypertrophie entwickeln (CHO *et al.* 2013). Zudem scheint IL-13 die ET-1-Produktion der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen zu unterdrücken, sodass IL-13 indirekt das Wachstum von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen kontrollieren könnte, mit möglicher pathomechanistischer Relevanz für das pulmonalvaskuläre *Remodeling* bei PAH (HECKER *et al.* 2010).

ETB-Defizienz hatte in dieser Arbeit jedoch keine Unterschiede in Bezug auf die pulmonale IL-13-Expression zur Folge. Eine alterierte IL-13-Expression scheint somit nicht ursächlich für die hier beobachteten PAH-assoziierten Veränderungen zu sein.

Sowohl die BALF der naiven jungen ETB-defizienten Tiere als auch die BALF der naiven gealterten ET^{tg}-Tiere wiesen im Vergleich zu den jeweiligen WT-Kontrollen vermehrt Lymphozyten auf. Dieser Befund steht im Einklang mit früheren Untersuchungen an ET-1^{tg} Mäusen von *Hochoer et al.*, in denen eine erhöhte Anzahl an pulmonalen CD4⁺-Lymphozyten festgestellt wurden (HOCHER *et al.* 2000). Es könnte sich bei der hier beobachteten Lymphophilie daher um einen Endothelin-1-spezifischen Effekt handeln. Auch in anderen Arbeiten konnten proinflammatorische Effekte des ET-1 nachgewiesen werden. So aktiviert ET-1 die Transkription von TNF- α , IL-1 und IL-6 und fördert die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (KOWALCZYK *et al.* 2015).

Die T_H2-Inflammation führte zu einer Splenomegalie, die bei den ETB-defizienten Tieren im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen ausgeprägter war. Ebenfalls konnte infolge der ETB-Defizienz eine Vergrößerung der Milz im naiven Zustand der Tiere nachgewiesen werden. Diese Splenomegalie nahm zudem mit zunehmendem Alter der ETB-defizienten Tiere zu. Auch *Föller et al.* beschrieben bereits eine Splenomegalie bei naiven ETB^{-/-}-Tieren derselben Linie, die ebenfalls ein Dopamin- β -Hydroxylase-ETB-Transgen exprimiert (FÖLLER *et al.* 2010). Sie stellten fest, dass infolge der ETB-Defizienz im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen mehr Erythrozyten mit Phosphatidylserin-Exposition nachgewiesen werden konnten. Die Erythrozyten der ETB-defizienten Mäuse waren anfälliger für Eryptose durch oxidativen Stress und wurden schneller aus der Blutbahn entfernt (FÖLLER *et al.* 2010). Die exakten Ursachen der in der vorliegenden Arbeit beobachteten altersbedingten Zunahme der Splenomegalie erfordern jedoch weitere Untersuchungen. *Ivy et al.* fanden in ETB-defizienten Ratten einen erhöhten Hämatokrit und stellten die Vermutung auf, dass ETB-defiziente Ratten aufgrund eines erhöhten tubulären Sauerstoffverbrauchs, eine erhöhte Erythropoetin-Produktion aufweisen könnten (IVY *et al.* 2002). Eine erhöhte Erythropoetinproduktion mit konsekutiv erhöhtem Hämatokrit könnte eine Erklärung für die zunehmende Vergrößerung der Milz darstellen. Zu beachten ist jedoch, dass die Entstehung der Splenomegalie auch von der Expression des Dopamin- β -Hydroxylase-ETB-Transgens abhängen könnte, da für Endothelin-B-Rezeptor-defiziente Tiere ohne Dopamin- β -Hydroxylase-ETB-Transgen eine verkleinerte Milz beschrieben wurde (CHENG *et al.* 2011).

Rydell-Törmänen et al. konnten im T_H2-Modell bei Mäusen einen Anstieg der glattmuskulären α -Aktin-exprimierenden Zellen und eine verstärkte Expression von Prokollagen I und III nachweisen (RYDELL-TÖRMÄNEN *et al.* 2005). Die hier erfolgten histologischen Lungenanalysen zeigten, dass es bei den ETB-defizienten Mäusen infolge der pulmonalen T_H2-Inflammation zu ausgeprägteren pulmonalen Kollagenablagerungen als bei den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen kommt. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass ET-1 die Produktion und Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine in PASMC fördert (LAMBERS

et al. 2013). Darüber hinaus werden IL-12p40 profibrotische Effekte zugeschrieben (HUAUX *et al.* 2002). Die bei den ETB-defizienten Mäusen nachgewiesene Kollagendeposition könnte daher eine kombinierte Folge aus einer verminderten ET-1-Clearance und einem erhöhten IL-12p40 Spiegel sein.

Die ETB-Defizienz führt zu erhöhten ET-1-Spiegeln im Blut, da die auf den Endothelzellen exprimierten ETB-Rezeptoren für die Clearance des Endothelins zuständig sind (FUKURODA *et al.* 1994, DUPUIS *et al.* 1996, DUPUIS *et al.* 1996, KELLAND *et al.* 2010). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit zudem gezeigt werden, dass es bei ETB^{-/-}-Mäusen infolge pulmonaler T_H2-Inflammation zu einer vermehrten pulmonalen Expression von ET-1 kam. Eine Schwierigkeit in der Interpretation der Daten der ETB^{-/-}-Mäuse bestand darin, zwischen ETB-spezifischen und Endothelin-1-vermittelten Effekten zu differenzieren. Insbesondere blieb unbeantwortet, ob Endothelin-1 als alleiniger Stimulus ausreicht, PAH-assoziierte Veränderungen hervorzurufen oder ob dies ausschließlich in Kombination mit einer ETB-Defizienz der Fall ist.

Zu diesem Zweck wurden die Effekte einer dauerhaften Überexpression von humanem Prepro-Endothelin-1 auf pulmonalvaskuläres System und rechtes Herz untersucht. In der Tat zeigten sich bei den ET^{tg}-Tieren im fortgeschrittenen Alter ein pulmonaler Hypertonus und eine rechtsventrikuläre Hypertrophie. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Daten von PH-Patienten, bei denen erhöhte ET-1-Plasmaspiegel nachgewiesen wurden (STEWART *et al.* 1991). Ventetuolo *et al.* konnten zudem für Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose eine Korrelation zwischen erhöhtem ET-1-Spiegel und erhöhtem pulmonalarteriellem Mitteldruck nachweisen (VENTETUOLO *et al.* 2012).

Bei den jungen ET^{tg}-Tieren konnte im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eine pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität festgestellt werden, wohingegen sich bei den alten ET^{tg}-Tieren ein fixierter pulmonaler Hypertonus zeigte. Diese Daten korrelieren mit der pathogenetischen Vorstellung, dass die verstärkte pulmonale Vasokonstriktion eine zentrale Komponente insbesondere der frühen Phase der PAH beim Menschen darstellt (HUMBERT *et al.* 2004).

Migneault *et al.* führten bei Ratten eine ET-1-Langzeitapplikation über einen Zeitraum von sieben Tagen und 28 Tagen durch, wobei es zu keiner Rechtsherzhypertrophie kam (MIGNEAULT *et al.* 2005). Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den vorliegenden Beobachtungen an den jungen ET^{tg}-Mäusen. Untersuchungen 12-Monate alter ET^{tg}-Mäuse von Hocher *et al.* hatten einen moderaten, nicht-signifikanten Anstieg der rechtsventrikulären Masse in Relation zum Körpergewicht gezeigt, während 3-Monate alte Tiere eine fast identische rechtsventrikuläre Masse aufwiesen (HOCHER *et al.* 2000). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine rechtsventrikuläre Hypertrophie nur bei den 16-18 Monate alten, nicht jedoch bei den 2-6 Monate alten ET^{tg}-Tieren. In der Zusammenschau mit den vorher

genannten Untersuchungen ist daher anzunehmen, dass sich eine signifikante rechtsventrikuläre Hypertrophie erst in weit fortgeschrittenem Alter der ET^{tg}-Mäuse einstellt. Bereits bei den jungen 2-4 Monate alten ET^{tg}-Tieren war eine geringe, aber signifikante Splenomegalie im Vergleich zu den WT-Tieren nachzuweisen. Diese Splenomegalie nahm im Altersverlauf der Tiere deutlich zu. Eine altersabhängige Splenomegalie bei ET^{tg}-Tieren ist bislang nicht beschrieben worden. Die Ursache hierfür sollte daher weiter untersucht werden, beispielsweise durch histologische und durchflusszytometrische Analysen.

Bei der Analyse der BALF wurde bei den alten ET^{tg}-Tieren infolge der Überexpression von ET-1 eine Lymphophilie festgestellt, was sich im Einklang mit den Resultaten von *Hocher et al.* zeigt, die bei drei und zwölf Monate alten ET^{tg}-Tieren immunhistochemisch eine perivaskuläre Infiltration von CD4⁺-Lymphozyten nachweisen konnten (HOCHER *et al.* 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine protektive Rolle des ETB-Rezeptors in der pulmonalen Zirkulation. Es konnte gezeigt werden, dass die ETB-defizienten Tiere einen pulmonalen Hypertonus inklusive pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität und rechtsventrikulärer Hypertrophie aufweisen. Zudem zeigen sie eine erhöhte ET-1-vermittelte pulmonalvaskuläre Thromboxan-Freisetzung. Im T_H2-Modell führte die ETB-Defizienz im Vergleich zu den WT-Tieren zu einer gesteigerten pulmonalvaskulären Hyperreagibilität, einer aggravierten Rechtsherzhypertrophie sowie einer stärkeren perivaskulären Inflammation.

Die derzeit in der PAH eingesetzten Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten und die dualen ERAs bieten beide eine vorteilhafte Therapie und führen zu Verbesserungen der hämodynamischen Parameter, des 6-Minuten-Lauftests, sowie der Dyspnoe gemäß Borg-Skala (HUMBERT und SIMONNEAU 2005, GALIÈ *et al.* 2009, RYERSON *et al.* 2010, MANDRAS *et al.* 2020). Der ETB-Rezeptor kann jedoch nur bei einer selektiven Inhibierung von ETA seine protektive Wirkung weiterhin entfalten. Insbesondere der Erhalt seiner vasodilatatorischen Effekte und der *Clearance*-Funktion in den Endothelzellen könnte den Vorteil einer selektiven Inhibierung des ETA-Rezeptors darstellen (OPITZ und EWERT 2006, BARST 2007). Auch werden die profibrotischen Effekte des ET-1 primär über den ETA-Rezeptor, und nicht über den ETB-Rezeptor vermittelt (SHI-WEN *et al.* 2001).

Es gibt jedoch auch Argumente, die für eine duale Endothelin-Rezeptor-Inhibition sprechen. Durch eine Blockade beider Endothelin-Rezeptoren an den glatten Muskelzellen und den Fibroblasten der Pulmonalarterien ist ein vollständiges Aufheben der vasokonstriktorisches, proliferativen und profibrotischen Wirkung des Endothelins gegeben (SATO *et al.* 1995, DUPUIS 2001, SHI-WEN *et al.* 2007). Bei einer dualen Blockade kommt es daher zu einer effektiveren Inhibierung der vasokonstriktorisches Wirkung des ET-1 verglichen mit einer alleinigen Blockade des ETA-Rezeptors (SATO *et al.* 1995). Somit bleibt die Frage, ob eine

duale Endothelin-Rezeptor-Blockade oder die selektive Inhibierung des ETA-Rezeptors vorteilhafter ist, umstritten und kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt werden (JACOBS *et al.* 2006, BARST 2007).

Die Relevanz der in dieser Arbeit erhobenen Daten für die Klinik ist gegenwärtig unklar. Da es sich um Daten aus einem transgenen Tiermodell handelt, können mögliche Implikationen für die klinische Situation nur hypothetisch abstrahiert werden und bedürfen einer Reevaluation im humanen System. Ob der Erhalt der protektiven Funktion des ETB-Rezeptors mittels selektiver ETA-Inhibierung sich gegenüber der dualen Endothelin-Rezeptor-Blockade als vorteilhaft erweisen könnte, kann abschließend nur in weiteren experimentellen Analysen inklusive Einsatz von ETA- und/ oder ETB-Inhibitoren sowie in vergleichenden klinischen Studien beantwortet werden.

6. Zusammenfassung

Die pulmonalarterielle Hypertonie ist eine seltene, zum Tode führende Erkrankung, welche durch eine endotheliale Dysfunktion, pulmonale Vasokonstriktion, pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität und pulmonalarterielles *Remodeling* gekennzeichnet ist. Das Endothelinsystem spielt in der Pathogenese der PAH eine zentrale Rolle. Die Ziele dieser Arbeit lagen zum einen in der Untersuchung des Endothelin-Systems in der PAH-assoziierten pulmonalen T_H2-Inflammation und zum anderen in der Untersuchung altersabhängiger Endothelin-1-vermittelter Veränderungen von Herz und pulmonaler Zirkulation in der Maus. Die Induktion der pulmonalen T_H2-Inflammation erfolgte mittels systemischer Ovalbumin-Sensibilisierung und nachfolgender Ovalbumin-Atemwegsexposition (OVA/OVA). Mit Hilfe transgener Mäuse konnten unter anderem im *ex vivo* Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge die Effekte der ETB-Defizienz (ETB^{-/-}) und der humanen Prepro-Endothelin-1-Überexpression (ET^{tg}) auf pulmonalarteriellen Mitteldruck und pulmonalvaskuläre (Hyper-) Reagibilität untersucht werden. Zudem erfolgten vergleichende histologische Analysen in Bezug auf pulmonale Kollagendeposition und perivaskuläre Inflammation. Mittels Fulton-Index erfolgte die Untersuchung rechtsventrikulärer Hypertrophie. Zytokin-Analysen aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) und mRNA-Analysen aus dem Lungenhomogenat erlaubten eine genauere Charakterisierung der Inflammation und der Regulationsmechanismen in den einzelnen untersuchten Gruppen.

ETB-defiziente Mäuse wiesen einen pulmonalen Hypertonus inklusive pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität und rechtsventrikulärer Hypertrophie auf. Infolge der pulmonalen T_H2-Inflammation aggravierten sowohl die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität als auch die rechtsventrikuläre Hypertrophie. Die perivaskulären Leukozyteninfiltrate, die pulmonale Kollagendeposition, die pulmonale Endothelin-1-Expression und die IL-12p40-Spiegel der BAL zeigten sich in den OVA/OVA-behandelten ETB^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren deutlich verstärkt. Zudem konnte in den ETB^{-/-}-Mäusen eine deutliche Zunahme der Endothelin-1-vermittelten pulmonalvaskulären Thromboxan-Freisetzung nachgewiesen werden. Während die Prepro-Endothelin-1-Überexpression in den jungen ET^{tg}-Tieren mit einer pulmonalvaskulären Hyperreagibilität einherging, kam es in den stark gealterten ET^{tg}-Mäusen zu einem fixierten pulmonalen Hypertonus inklusive rechtsventrikulärer Hypertrophie.

Zusammenfassend führte die ETB-Defizienz infolge der pulmonalen T_H2-Inflammation zu einem vermehrten pulmonalen Leukozyteninflux mit deutlich erhöhten IL-12p40-Spiegeln und zu einer verstärkten Expression von Endothelin-1. Diese Veränderungen begünstigten möglicherweise die nach OVA/OVA-Behandlung detektierte Zunahme der

rechtsventrikulären Hypertrophie und pulmonalvaskulären Hyperreagibilität, an der auch eine vermehrte pulmonalvaskuläre Thromboxanfreisetzung beteiligt zu sein scheint. Die hier erhobenen Daten unterstützen die Hypothese der protektiven Rolle des ETB-Rezeptors im pulmonalen Gefäßsystem. Zudem zeigen sie, dass Endothelin-1 als alleiniger Stimulus ausreicht, PAH-assoziierte Veränderungen an Herz und pulmonaler Zirkulation zu induzieren. Um zu klären, ob in der Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie eine separate ETA-Inhibierung der dualen Endothelinrezeptor-Blockade überlegen sein könnte, sind jedoch weiterführende Analysen, inklusive separater und simultaner ETA- und/ oder ETB-Inhibierung, erforderlich.

7. Summary

The role of the endothelin B receptor in the pulmonary Th2 inflammation

Pulmonary arterial hypertension is a rare, deadly disease, which is characterized by endothelial dysfunction, pulmonary vasoconstriction, pulmonary vascular hyperresponsiveness and pulmonary arterial remodeling. The endothelin system plays a crucial role in the pathogenesis of PAH. Hence, the aims of this study were to examine the role of the endothelin system in Th2-induced PAH-associated pathologies as well as age-dependent endothelin-1-mediated alterations of the pulmonary vasculature. Pulmonary Th2 inflammation was induced in mice by systemic ovalbumin sensitization followed by ovalbumin airway exposure (OVA/OVA). Isolated perfused and ventilated lungs of transgenic mice were investigated to determine the effects of endothelin receptor B deficiency (ETB^{-/-}) and human prepro-endothelin-1 overexpression (ET^{tg}) on mean pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular (hyper-) responsiveness. In addition, pulmonary collagen deposition and perivascular inflammation were examined by comparative histological analyses. Right ventricular hypertrophy was determined by Fulton index. Cytokine analyses of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and messenger ribonucleic acid analyses of lung homogenate allowed a specific characterization of the inflammation and regulatory mechanisms in the respective groups.

ETB^{-/-} mice showed pulmonary hypertension, including pulmonary vascular hyperresponsiveness and right ventricular hypertrophy. Pulmonary vascular hyperresponsiveness and right ventricular hypertrophy aggravated following induction of pulmonary Th2 inflammation. OVA/OVA-treated ETB^{-/-} mice showed markedly increased perivascular leukocyte infiltration, pulmonary endothelin-1 expression and BALF IL-12p40 levels in comparison to their corresponding wildtype animals. In addition, the endothelin-1-mediated pulmonary vascular release of thromboxane was distinctly augmented in ETB^{-/-} mice. While prepro-endothelin-1 overexpression led to pulmonary vascular hyperresponsiveness in young ET^{tg} animals, highly aged ET^{tg} mice showed a fixed pulmonary hypertonus accompanied by right ventricular hypertrophy.

In summary, due to pulmonary Th2 inflammation, ETB deficiency led to an increased pulmonary leukocyte influx with markedly increased IL-12p40 levels and an enhanced expression of endothelin-1. These alterations as well as an increased pulmonary vascular release of thromboxane might have contributed to the increase in right ventricular hypertrophy and pulmonary vascular hyperresponsiveness, observed after OVA/OVA treatment. The results of this study support the hypothesis that endothelin receptor B plays a protective role in the pulmonary vascular system. Moreover, they show that endothelin-1 alone is sufficient to induce PAH-associated alterations in the heart and pulmonary

7. Summary

circulation. Further studies, including separate and simultaneous inhibition of endothelin receptor A and/ or ETB, are needed to determine whether separate inhibition of endothelin receptor A could be superior to dual blockade of both endothelin receptors in PAH therapy.

8. Literaturverzeichnis

Abraham, D. und O. Distler (2007). "How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis." *Arthritis Res Ther* **9 Suppl 2**: S2.

Adam, L. P. und D. R. Hathaway (1993). "Identification of mitogen-activated protein kinase phosphorylation sequences in mammalian h-Caldesmon." *FEBS Lett* **322**: 56-60.

Adatia, I., S. E. Barrow, P. D. Stratton, V. M. Miall-Allen, J. M. Ritter und S. G. Haworth (1993). "Thromboxane A2 and prostacyclin biosynthesis in children and adolescents with pulmonary vascular disease." *Circulation* **88**: 2117-2122.

Arai, H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo und S. Nakanishi (1990). "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor." *Nature* **348**: 730-732.

Arinami, T., M. Ishikawa, A. Inoue, M. Yanagisawa, T. Masaki, M. C. Yoshida und H. Hamaguchi (1991). "Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3." *Am J Hum Genet* **48**: 990-996.

Badlam, J. B. und T. M. Bull (2017). "Steps forward in the treatment of pulmonary arterial hypertension: latest developments and clinical opportunities." *Ther Adv Chronic Dis* **8**: 47-64.

Bagnall, A. J., N. F. Kelland, F. Gulliver-Sloan, A. P. Davenport, G. A. Gray, M. Yanagisawa, D. J. Webb und Y. V. Kotelevtsev (2006). "Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt." *Hypertension* **48**: 286-293.

Balabanian, K., A. Foussat, P. Dorfmueller, I. Durand-Gasselin, F. Capel, L. Bouchet-Delbos, A. Portier, A. Marfaing-Koka, R. Krzysiek, A. C. Rimaniol, G. Simonneau, D. Emilie und M. Humbert (2002). "CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension." *Am J Respir Crit Care Med* **165**: 1419-1425.

Barst, R. J. (2007). "A review of pulmonary arterial hypertension: role of ambrisentan." *Vasc Health Risk Manag* **3**: 11-22.

Barst, R. J. (2008). "Pulmonary hypertension: past, present and future." *Ann Thorac Med* **3**: 1-4.

Battistini, B., P. Chailier, P. D'Orléans-Juste, N. Brière und P. Sirois (1993). "Growth regulatory properties of endothelins." *Peptides* **14**: 385-399.

Black, S. M., E. Mata-Greenwood, R. W. Dettman, B. Ovadia, R. K. Fitzgerald, O. Reinhartz, S. Thelitz, R. H. Steinhorn, R. Gerrets, K. Hendricks-Munoz, G. A. Ross, J. M. Bekker, M. J. Johengen und J. R. Fineman (2003). "Emergence of smooth muscle cell endothelin B-mediated vasoconstriction in lambs with experimental congenital heart disease and increased pulmonary blood flow." *Circulation* **108**: 1646-1654.

Bloch, K. D., R. L. Eddy, T. B. Shows und T. Quertermous (1989). "cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3." *J Biol Chem* **264**: 18156-18161.

Bloch, K. D., S. P. Friedrich, M. E. Lee, R. L. Eddy, T. B. Shows und T. Quertermous (1989). "Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin." *J Biol Chem* **264**: 10851-10857.

8. Literaturverzeichnis

- Bobik, A., A. Grooms, J. A. Millar, A. Mitchell und S. Grinpukel (1990). "Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle." *Am J Physiol* **258**: C408-415.
- Brink, C., J. Cerrina, C. Labat, J. Verley und J. Benveniste (1988). "The effect of contractile agonists on isolated pulmonary arterial and venous muscle preparations derived from patients with primary pulmonary hypertension." *Am. Rev. Resp. Dis.* **137**: A106.
- Budhiraja, R., R. M. Tuder und P. M. Hassoun (2004). "Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension." *Circulation* **109**: 159-165.
- Burke, D. L., M. G. Frid, C. L. Kunrath, V. Karoor, A. Anwar, B. D. Wagner, D. Strassheim und K. R. Stenmark (2009). "Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**: L238-250.
- Chambers, C. D., S. Hernandez-Diaz, L. J. Van Marter, M. M. Werler, C. Louik, K. L. Jones und A. A. Mitchell (2006). "Selective serotonin-reuptake inhibitors and risk of persistent pulmonary hypertension of the newborn." *N Engl J Med* **354**: 579-587.
- Chanez, P., A. M. Vignola, B. Albat, D. R. Springall, J. M. Polak, P. Godard und J. Bousquet (1996). "Involvement of endothelin in mononuclear phagocyte inflammation in asthma." *J Allergy Clin Immunol* **98**: 412-420.
- Chen, Q. W., L. Edvinsson und C. B. Xu (2009). "Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells." *BMC Cell Biol* **10**: 52.
- Chen, Y., D. J. Abraham, X. Shi-Wen, J. D. Pearson, C. M. Black, K. M. Lyons und A. Leask (2004). "CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin." *Mol Biol Cell* **15**: 5635-5646.
- Cheng, Z., X. Wang, D. Dhall, L. Zhao, C. Bresee, T. M. Doherty und P. K. Frykman (2011). "Splenic lymphopenia in the endothelin receptor B-null mouse: implications for Hirschsprung associated enterocolitis." *Pediatr Surg Int* **27**: 145-150.
- Chiche, J. D., S. M. Schlutsmeier, D. B. Bloch, S. M. de la Monte, J. D. Roberts, Jr., G. Filippov, S. P. Janssens, A. Rosenzweig und K. D. Bloch (1998). "Adenovirus-mediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and pro-apoptotic effects of nitric oxide/cGMP." *J Biol Chem* **273**: 34263-34271.
- Cho, J. Y., M. Miller, K. J. Baek, J. W. Han, J. Nayar, S. Y. Lee, K. McElwain, S. McElwain, S. Friedman und D. H. Broide (2004). "Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice." *J Clin Invest* **113**: 551-560.
- Cho, W. K., C. M. Lee, M. J. Kang, Y. Huang, F. J. Giordano, P. J. Lee, T. K. Trow, R. J. Homer, W. C. Sessa, J. A. Elias und C. G. Lee (2013). "IL-13 receptor alpha2-arginase 2 pathway mediates IL-13-induced pulmonary hypertension." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **304**: L112-124.
- Christman, B. W., C. D. McPherson, J. H. Newman, G. A. King, G. R. Bernard, B. M. Groves und J. E. Loyd (1992). "An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension." *N Engl J Med* **327**: 70-75.

- Clozel, M., G. A. Gray, V. Breu, B. M. Löffler und R. Osterwalder (1992). "The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo." *Biochem Biophys Res Commun* **186**: 867-873.
- Cool, C. D., D. Kennedy, N. F. Voelkel und R. M. Tuder (1997). "Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection." *Hum Pathol* **28**: 434-442.
- Cool, C. D., J. S. Stewart, P. Werahera, G. J. Miller, R. L. Williams, N. F. Voelkel und R. M. Tuder (1999). "Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth." *Am J Pathol* **155**: 411-419.
- Corry, D. B., G. Grünig, H. Hadeiba, V. P. Kurup, M. L. Warnock, D. Sheppard, D. M. Rennick und R. M. Locksley (1998). "Requirements for allergen-induced airway hyperreactivity in T and B cell-deficient mice." *Mol Med* **4**: 344-355.
- Coyle, A. J., G. Le Gros, C. Bertrand, S. Tsuyuki, C. H. Heusser, M. Kopf und G. P. Anderson (1995). "Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity." *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**: 54-59.
- Daan de Boer, J., J. J. Roelofs, A. F. de Vos, R. de Beer, M. Schouten, T. J. Hommes, A. J. Hoogendijk, O. J. de Boer, I. Stroo, J. S. van der Zee, C. V. Veer und T. van der Poll (2013). "Lipopolysaccharide inhibits Th2 lung inflammation induced by house dust mite allergens in mice." *Am J Respir Cell Mol Biol* **48**: 382-389.
- Daley, E., C. Emson, C. Guignabert, R. de Waal Malefyt, J. Louten, V. P. Kurup, C. Hogaboam, L. Taraseviciene-Stewart, N. F. Voelkel, M. Rabinovitch, E. Grünig und G. Grünig (2008). "Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response." *J Exp Med* **205**: 361-372.
- Dalvi, P., K. Wang, J. Mermis, R. Zeng, M. Sanderson, S. Johnson, Y. Dai, G. Sharma, A. O. Ladner und N. K. Dhillon (2014). "HIV-1/cocaine induced oxidative stress disrupts tight junction protein-1 in human pulmonary microvascular endothelial cells: role of Ras/ERK1/2 pathway." *PLoS One* **9**: e85246.
- Davenport, A. P., G. O'Reilly und R. E. Kuc (1995). "Endothelin ETA and ETB mRNA and receptors expressed by smooth muscle in the human vasculature: majority of the ETA subtype." *Br J Pharmacol* **114**: 1110-1116.
- Davie, N., S. J. Haleen, P. D. Upton, J. M. Polak, M. H. Yacoub, N. W. Morrell und J. Wharton (2002). "ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells." *Am J Respir Crit Care Med* **165**: 398-405.
- de Nucci, G., R. Thomas, P. D'Orleans-Juste, E. Antunes, C. Walder, T. D. Warner und J. R. Vane (1988). "Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 9797-9800.
- Deacon, K. und A. J. Knox (2010). "Endothelin-1 (ET-1) increases the expression of remodeling genes in vascular smooth muscle through linked calcium and cAMP pathways: role of a phospholipase A(2)(cPLA(2))/cyclooxygenase-2 (COX-2)/prostacyclin receptor-dependent autocrine loop." *J Biol Chem* **285**: 25913-25927.

8. Literaturverzeichnis

- Delannoy, E., A. Courtois, V. Freund-Michel, V. Leblais, R. Marthan und B. Muller (2010). "Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors." *Cardiovasc Res* **85**: 582-592.
- Dorfmueller, P., F. Perros, K. Balabanian und M. Humbert (2003). "Inflammation in pulmonary arterial hypertension." *Eur Respir J* **22**: 358-363.
- Dorfmueller, P., V. Zarka, I. Durand-Gasselino, G. Monti, K. Balabanian, G. Garcia, F. Capron, A. Coulomb-Lherminé, A. Marfaing-Koka, G. Simonneau, D. Emilie und M. Humbert (2002). "Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension." *Am J Respir Crit Care Med* **165**: 534-539.
- Dupuis, J. (2001). "Endothelin-receptor antagonists in pulmonary hypertension." *Lancet* **358**: 1113-1114.
- Dupuis, J., C. A. Goresky und A. Fournier (1996). "Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors." *J Appl Physiol* (1985) **81**: 1510-1515.
- Dupuis, J. und M. M. Hoeper (2008). "Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension." *Eur Respir J* **31**: 407-415.
- Dupuis, J., D. J. Stewart, P. Cernacek und G. Gosselin (1996). "Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1." *Circulation* **94**: 1578-1584.
- El Chami, H. und P. M. Hassoun (2012). "Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension." *Prog Cardiovasc Dis* **55**: 218-228.
- Elinoff, J. M., J. E. Rame, P. R. Forfia, M. K. Hall, J. Sun, A. Gharib, K. Abd-Elmoniem, G. Graninger, B. Harper, R. L. Danner und M. A. Solomon (2013). "A pilot study of the effect of spironolactone therapy on exercise capacity and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: study protocol for a randomized controlled trial." *Trials* **14**: 91.
- Emoto, N. und M. Yanagisawa (1995). "Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum." *J Biol Chem* **270**: 15262-15268.
- Fartoukh, M., D. Emilie, C. Le Gall, G. Monti, G. Simonneau und M. Humbert (1998). "Chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha mRNA expression in lung biopsy specimens of primary pulmonary hypertension." *Chest* **114**: 50S-51S.
- Feng, L., S. Chen, G. E. Garcia, Y. Xia, M. A. Siani, P. Botti, C. B. Wilson, J. K. Harrison und K. B. Bacon (1999). "Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1 rapid communication." *Kidney Int* **56**: 612-620.
- Firth, A. L., I. W. Choi und W. S. Park (2012). "Animal models of pulmonary hypertension: Rho kinase inhibition." *Prog Biophys Mol Biol* **109**: 67-75.
- Fishman, A. P. (2001). "Clinical classification of pulmonary hypertension." *Clin Chest Med* **22**: 385-391, vii.
- Fishman, A. P. (2004). "Primary pulmonary arterial hypertension: a look back." *J Am Coll Cardiol* **43**: 2S-4S.

- Fitzgerald, L. W., T. C. Burn, B. S. Brown, J. P. Patterson, M. H. Corjay, P. A. Valentine, J. H. Sun, J. R. Link, I. Abbaszade, J. M. Hollis, B. L. Largent, P. R. Hartig, G. F. Hollis, P. C. Meunier, A. J. Robichaud und D. W. Robertson (2000). "Possible role of valvular serotonin 5-HT(2B) receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine." *Mol Pharmacol* **57**: 75-81.
- Föller, M., H. Mahmud, S. M. Qadri, S. Gu, M. Braun, D. Bobbala, B. Hocher und F. Lang (2010). "Endothelin B receptor stimulation inhibits suicidal erythrocyte death." *FASEB J* **24**: 3351-3359.
- Fong, A. M., L. A. Robinson, D. A. Steeber, T. F. Tedder, O. Yoshie, T. Imai und D. D. Patel (1998). "Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow." *J Exp Med* **188**: 1413-1419.
- Fonseca, C., D. Abraham und E. A. Renzoni (2011). "Endothelin in pulmonary fibrosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* **44**: 1-10.
- Frasch, H. F., C. Marshall und B. E. Marshall (1999). "Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension." *Am J Physiol* **276**: L304-310.
- Frid, M. G., J. A. Brunetti, D. L. Burke, T. C. Carpenter, N. J. Davie, J. T. Reeves, M. T. Roedersheimer, N. van Rooijen und K. R. Stenmark (2006). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage." *Am J Pathol* **168**: 659-669.
- Fritz, J. S., C. Blair, R. J. Oudiz, C. Dufton, H. Olschewski, D. Despain, H. Gillies und S. M. Kawut (2013). "Baseline and follow-up 6-min walk distance and brain natriuretic peptide predict 2-year mortality in pulmonary arterial hypertension." *Chest* **143**: 315-323.
- Fukuroda, T., T. Fujikawa, S. Ozaki, K. Ishikawa, M. Yano und M. Nishikibe (1994). "Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats." *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 1461-1465.
- Fukuroda, T., M. Kobayashi, S. Ozaki, M. Yano, T. Miyauchi, M. Onizuka, Y. Sugishita, K. Goto und M. Nishikibe (1994). "Endothelin receptor subtypes in human versus rabbit pulmonary arteries." *J Appl Physiol* (1985) **76**: 1976-1982.
- Fuse, S. und T. Kamiya (1994). "Plasma thromboxane B2 concentration in pulmonary hypertension associated with congenital heart disease." *Circulation* **90**: 2952-2955.
- Galiè, N., F. Grimminger, E. Grünig, M. M. Hoeper, M. Humbert, Z. C. Jing, A. M. Keogh, D. Langleben, L. J. Rubin, A. Fritsch, N. Davie und H. A. Ghofrani (2016). "Comparison of hemodynamic parameters in treatment-naive and pre-treated patients with pulmonary arterial hypertension in the randomized phase III PATENT-1 study." *J Heart Lung Transplant* **36**: 509-519.
- Galiè, N., A. Manes und A. Branzi (2004). "The endothelin system in pulmonary arterial hypertension." *Cardiovasc Res* **61**: 227-237.
- Galiè, N., A. Manes, L. Negro, M. Palazzini, M. L. Bacchi-Reggiani und A. Branzi (2009). "A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension." *Eur Heart J* **30**: 394-403.
- Gao, Y., T. Chen und J. U. Raj (2016). "Endothelial and Smooth Muscle Cell Interactions in the Pathobiology of Pulmonary Hypertension." *Am J Respir Cell Mol Biol* **54**: 451-460.

- Gavett, S. H., X. Chen, F. Finkelman und M. Wills-Karp (1994). "Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia." *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**: 587-593.
- Gavilanes, F., C. J. Fernandes und R. Souza (2016). "Pulmonary arterial hypertension in schistosomiasis." *Curr Opin Pulm Med* **22**: 408-414.
- Gerasimovskaya, E., A. Kratzer, A. Sidiakova, J. Salys, M. Zamora und L. Taraseviciene-Stewart (2012). "Interplay of macrophages and T cells in the lung vasculature." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**: L1014-1022.
- Ghofrani, H. A., E. Grünig, P. Jansa, D. Langleben, S. Rosenkranz, I. R. Preston, F. Rahaghi, N. Sood, D. Busse, C. Meier und M. Humbert (2020). "Efficacy and safety of riociguat in combination therapy for patients with pulmonary arterial hypertension (PATENT studies)." *Pulm Circ* **10**: 1-10.
- Giaid, A., M. Yanagisawa, D. Langleben, R. P. Michel, R. Levy, H. Shennib, S. Kimura, T. Masaki, W. P. Duguid und D. J. Stewart (1993). "Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension." *N Engl J Med* **328**: 1732-1739.
- Gillespie, M. N., S. E. Goldblum, D. A. Cohen und C. J. McClain (1988). "Interleukin 1 bioactivity in the lungs of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension." *Proc Soc Exp Biol Med* **187**: 26-32.
- Gillespie, M. N., J. W. Olson, C. N. Reinsel, W. N. O'Connor und R. J. Altieri (1986). "Vascular hyperresponsiveness in perfused lungs from monocrotaline-treated rats." *Am J Physiol* **251**: H109-114.
- Gomez-Arroyo, J., S. J. Saleem, S. Mizuno, A. A. Syed, H. J. Bogaard, A. Abbate, L. Taraseviciene-Stewart, Y. Sung, D. Kraskauskas, D. Farkas, D. H. Conrad, M. R. Nicolls und N. F. Voelkel (2012). "A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**: L977-991.
- Gomez-Arroyo, J. G., L. Farkas, A. A. Alhussaini, D. Farkas, D. Kraskauskas, N. F. Voelkel und H. J. Bogaard (2012). "The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**: L363-369.
- Gómez-Sánchez, M. A., M. J. Mestre de Juan, C. Gómez-Pajuelo, J. I. López, M. J. Díaz de Atauri und F. J. Martínez-Tello (1989). "Pulmonary hypertension due to toxic oil syndrome. A clinicopathologic study." *Chest* **95**: 325-331.
- Gratton, J. P., G. Cournoyer, B. M. Löffler, P. Sirois und P. D'Orléans-Juste (1997). "ET(B) receptor and nitric oxide synthase blockade induce BQ-123-sensitive pressor effects in the rabbit." *Hypertension* **30**: 1204-1209.
- Groth, A., B. Vrugt, M. Brock, R. Speich, S. Ulrich und L. C. Huber (2014). "Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension." *Respir Res* **15**: 47.
- Grünig, G., M. Warnock, A. E. Wakil, R. Venkayya, F. Brombacher, D. M. Rennick, D. Sheppard, M. Mohrs, D. D. Donaldson, R. M. Locksley und D. B. Corry (1998). "Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma." *Science* **282**: 2261-2263.
- Haberberger, R. V., C. Tabeling, S. Runciman, B. Gutbier, P. König, M. Andratsch, H. Schütte, N. Suttorp, I. Gibbins und M. Witznath (2009). "Role of sphingosine kinase 1 in

allergen-induced pulmonary vascular remodeling and hyperresponsiveness." *J Allergy Clin Immunol* **124**: 933-941

Hachulla, E., V. Gressin, L. Guillevin, P. Carpentier, E. Diot, J. Sibilia, A. Kahan, J. Cabane, C. Francès, D. Launay, L. Mouthon, Y. Allanore, K. P. Tiev, P. Clerson, P. de Groote und M. Humbert (2005). "Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study." *Arthritis Rheum* **52**: 3792-3800.

Hahn, A. W., S. Regenass, F. Kern, F. R. Buhler und T. J. Resink (1993). "Expression of soluble and insoluble fibronectin in rat aorta: effects of angiotensin II and endothelin-1." *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 189-197.

Haller, H., T. Schaberg, C. Lindschau, H. Lode und A. Distler (1991). "Endothelin increases $[Ca^{2+}]_i$, protein phosphorylation, and O_2^- production in human alveolar macrophages." *Am J Physiol* **261**: L478-484.

Hamaguchi, Y., T. Sumida, Y. Kawaguchi, H. Ihn, S. Tanaka, Y. Asano, S. I. Motegi, M. Kuwana, H. Endo und K. Takehara (2017). "Safety and tolerability of bosentan for digital ulcers in Japanese patients with systemic sclerosis: Prospective, multicenter, open-label study." *J Dermatol* **44**: 13-17.

Haskell, C. A., M. D. Cleary und I. F. Charo (1999). "Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation." *J Biol Chem* **274**: 10053-10058.

Hassoun, P. M., L. Mouthon, J. A. Barberà, S. Eddahibi, S. C. Flores, F. Grimminger, P. L. Jones, M. L. Maitland, E. D. Michelakis, N. W. Morrell, J. H. Newman, M. Rabinovitch, R. Schermuly, K. R. Stenmark, N. F. Voelkel, J. X. Yuan und M. Humbert (2009). "Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling." *J Am Coll Cardiol* **54**: S10-19.

Hecker, M., Z. Zaslona, G. Kwapiszewska, G. Niess, A. Zakrzewicz, E. Hergenreider, J. Wilhelm, L. M. Marsh, D. Sedding, W. Klepetko, J. Lohmeyer, S. Dimmeler, W. Seeger, N. Weissmann, R. T. Schermuly, N. Kneidinger, O. Eickelberg und R. E. Morty (2010). "Dysregulation of the IL-13 receptor system: a novel pathomechanism in pulmonary arterial hypertension." *Am J Respir Crit Care Med* **182**: 805-818.

Held, H. D., C. Martin und S. Uhlig (1999). "Characterization of airway and vascular responses in murine lungs." *Br J Pharmacol* **126**: 1191-1199.

Helset, E., T. Sildnes, R. Seljelid und Z. S. Konopski (1993). "Endothelin-1 stimulates human monocytes in vitro to release TNF-alpha, IL-1beta and IL-6." *Mediators Inflamm* **2**: 417-422.

Henry, P. J. (1999). "Endothelin receptor distribution and function in the airways." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**: 162-167.

Herve, P., M. Humbert, O. Sitbon, F. Parent, H. Nunes, C. Legal, G. Garcia und G. Simonneau (2001). "Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis." *Clin Chest Med* **22**: 451-458.

Hervé, P., J. M. Launay, M. L. Scrobohaci, F. Brenot, G. Simonneau, P. Petitpretz, P. Poubeau, J. Cerrina, P. Duroux und L. Drouet (1995). "Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension." *Am J Med* **99**: 249-254.

- Hishikawa, K., T. Nakaki, T. Marumo, M. Hayashi, H. Suzuki, R. Kato und T. Saruta (1994). "Pressure promotes DNA synthesis in rat cultured vascular smooth muscle cells." *J Clin Invest* **93**: 1975-1980.
- Hocher, B., A. Schwarz, K. A. Fagan, C. Thöne-Reineke, K. El-Hag, H. Kusserow, S. Elitok, C. Bauer, H. H. Neumayer, D. M. Rodman und F. Theuring (2000). "Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice." *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**: 19-26.
- Hocher, B., C. Thöne-Reineke, P. Rohmeiss, F. Schmager, T. Slowinski, V. Burst, F. Siegmund, T. Quertermous, C. Bauer, H. H. Neumayer, W. D. Schleuning und F. Theuring (1997). "Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension." *J Clin Invest* **99**: 1380-1389.
- Horgan, M. J., J. M. Pinheiro und A. B. Malik (1991). "Mechanism of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction." *Circ Res* **69**: 157-164.
- Horinouchi, T., K. Terada, T. Higashi und S. Miwa (2013). "Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms." *J Pharmacol Sci* **123**: 85-101.
- Hosoda, K., R. E. Hammer, J. A. Richardson, A. G. Baynash, J. C. Cheung, A. Giaid und M. Yanagisawa (1994). "Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice." *Cell* **79**: 1267-1276.
- Hosoda, K., K. Nakao, H. Arai, S. Suga, Y. Ogawa, M. Mukoyama, G. Shirakami, Y. Saito, S. Nakanishi und H. Imura (1991). "Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA." *FEBS Lett* **287**: 23-26.
- Huaux, F., M. Arras, D. Tomasi, V. Barbarin, M. Delos, J. P. Coutelier, A. Vink, S. H. Phan, J. C. Renaud und D. Lison (2002). "A profibrotic function of IL-12p40 in experimental pulmonary fibrosis." *J Immunol* **169**: 2653-2661.
- Huetsch, J. C., J. Walker, C. Udem, J. Lade, X. Yun, S. Baksh, H. Jiang, N. Lai und L. A. Shimoda (2018). "Rho kinase and Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger mediate endothelin-1-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and migration." *Physiol Rep* **6**: e13698.
- Humbert, M., E. M. Lau, D. Montani, X. Jaïs, O. Sitbon und G. Simonneau (2014). "Advances in therapeutic interventions for patients with pulmonary arterial hypertension." *Circulation* **130**: 2189-2208.
- Humbert, M., G. Monti, F. Brenot, O. Sitbon, A. Portier, L. Grangeot-Keros, P. Duroux, P. Galanaud, G. Simonneau und D. Emilie (1995). "Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension." *Am J Respir Crit Care Med* **151**: 1628-1631.
- Humbert, M., N. W. Morrell, S. L. Archer, K. R. Stenmark, M. R. MacLean, I. M. Lang, B. W. Christman, E. K. Weir, O. Eickelberg, N. F. Voelkel und M. Rabinovitch (2004). "Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension." *J Am Coll Cardiol* **43**: 13S-24S.
- Humbert, M. und G. Simonneau (2005). "Drug Insight: endothelin-receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension in systemic rheumatic diseases." *Nat Clin Pract Rheumatol* **1**: 93-101.
- Humbert, M., O. Sitbon und G. Simonneau (2004). "Treatment of pulmonary arterial hypertension." *N Engl J Med* **351**: 1425-1436.

- Ikegawa, R., Y. Matsumura, Y. Tsukahara, M. Takaoka und S. Morimoto (1990). "Phosphoramidon, a metalloproteinase inhibitor, suppresses the secretion of endothelin-1 from cultured endothelial cells by inhibiting a big endothelin-1 converting enzyme." *Biochem Biophys Res Commun* **171**: 669-675.
- Imai, T., Y. Hirata, T. Emori, M. Yanagisawa, T. Masaki und F. Marumo (1992). "Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells." *Hypertension* **19**: 753-757.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto und T. Masaki (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2863-2867.
- Irvin, C. G. und J. H. Bates (2003). "Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size." *Respir Res* **4**: 4.
- Itoh, T., N. Nagaya, H. Ishibashi-Ueda, S. Kyotani, H. Oya, F. Sakamaki, H. Kimura und N. Nakanishi (2006). "Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension." *Respirology* **11**: 158-163.
- Itoh, Y., M. Yanagisawa, S. Ohkubo, C. Kimura, T. Kosaka, A. Inoue, N. Ishida, Y. Mitsui, H. Onda, M. Fujino und T. Masaki (1988). "Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin." *FEBS Lett* **231**: 440-444.
- Ivy, D. D., M. Yanagisawa, C. E. Gariepy, S. A. Gebb, K. L. Colvin und I. F. McMurry (2002). "Exaggerated hypoxic pulmonary hypertension in endothelin B receptor-deficient rats." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **282**: L703-L712.
- Jacobs, A., I. R. Preston und M. Gombert-Maitland (2006). "Endothelin receptor antagonism in pulmonary arterial hypertension--a role for selective ET(A) inhibition?" *Curr Med Res Opin* **22**: 2567-2574.
- Janakidevi, K., M. A. Fisher, P. J. Del Vecchio, C. Tirupathi, J. Figge und A. B. Malik (1992). "Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells." *Am J Physiol* **263**: C1295-1301.
- Kay, J. M., P. M. Keane, K. L. Suyama und D. Gauthier (1982). "Angiotensin converting enzyme activity and evolution of pulmonary vascular disease in rats with monocrotaline pulmonary hypertension." *Thorax* **37**: 88-96.
- Kelland, N. F., A. J. Bagnall, I. Morecroft, F. H. Gulliver-Sloan, Y. Dempsie, M. Nilsen, M. Yanagisawa, M. R. Maclean, Y. V. Kotelevtsev und D. J. Webb (2010). "Endothelial ET(B) limits vascular remodelling and development of pulmonary hypertension during hypoxia." *J Vasc Res* **47**: 16-22.
- Kelland, N. F., R. E. Kuc, D. L. McLean, A. Azfer, A. J. Bagnall, G. A. Gray, F. H. Gulliver-Sloan, J. J. Maguire, A. P. Davenport, Y. V. Kotelevtsev und D. J. Webb (2010). "Endothelial cell-specific ETB receptor knockout: autoradiographic and histological characterisation and crucial role in the clearance of endothelin-1." *Can J Physiol Pharmacol* **88**: 644-651.
- Kelly, L. K., S. Wedgwood, R. H. Steinhorn und S. M. Black (2004). "Nitric oxide decreases endothelin-1 secretion through the activation of soluble guanylate cyclase." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**: L984-991.

8. Literaturverzeichnis

- Kloog, Y., I. Ambar, M. Sokolovsky, E. Kochva, Z. Wollberg und A. Bdolah (1988). "Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain." *Science* **242**: 268-270.
- Knighton, D. R., T. K. Hunt, H. Scheuenstuhl, B. J. Halliday, Z. Werb und M. J. Banda (1983). "Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages." *Science* **221**: 1283-1285.
- Kotake-Nara, E. und K. Saida (2006). "Endothelin-2/vasoactive intestinal contractor: regulation of expression via reactive oxygen species induced by CoCl₂, and Biological activities including neurite outgrowth in PC12 cells." *ScientificWorldJournal* **6**: 176-186.
- Kowalczyk, A., P. Kleniewska, M. Kolodziejczyk, B. Skibska und A. Goraca (2015). "The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **63**: 41-52.
- Krause-Relle, K. (2010). "Hämodynamische Charakterisierung und Beschreibung des kardialen Phänotyps eines Mausmodells mit eNOS-Knockout und gleichzeitiger Überexpression von human-Endothelin-1", Charité - Universitätsmedizin Berlin
- Kurakula, K., Q. A. J. Hagdom, D. E. van der Feen, A. Vonk Noordegraaf, P. Ten Dijke, R. A. de Boer, H. J. Bogaard, M. J. Goumans und R. M. F. Berger (2021). "Inhibition of the prolyl isomerase Pin1 improves endothelial function and attenuates vascular remodelling in pulmonary hypertension by inhibiting TGF-beta signalling." *Angiogenesis* **25**: 99-112.
- Lambers, C., M. Roth, J. Zhong, C. Campregher, P. Binder, B. Burian, V. Petkov und L. H. Block (2013). "The interaction of endothelin-1 and TGF-beta1 mediates vascular cell remodeling." *PLoS One* **8**: e73399.
- Landgraf, R. G. und S. Jancar (2008). "Endothelin A receptor antagonist modulates lymphocyte and eosinophil infiltration, hyperreactivity and mucus in murine asthma." *Int Immunopharmacol* **8**: 1748-1753.
- Larsen, K. O., A. Yndestad, I. Sjaastad, E. M. Løberg, I. L. Goverud, B. Halvorsen, J. Jia, A. K. Andreassen, C. Husberg, S. Jonasson, M. Lipp, G. Christensen, P. Aukrust und O. H. Skjøsberg (2011). "Lack of CCR7 induces pulmonary hypertension involving perivascular leukocyte infiltration and inflammation." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **301**: L50-59.
- Le Pavec, J., M. Humbert, L. Mouthon und P. M. Hassoun (2010). "Systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension." *Am J Respir Crit Care Med* **181**: 1285-1293.
- Le Ribeuz, H., V. Capuano, B. Girerd, M. Humbert, D. Montani und F. Antigny (2020). "Implication of Potassium Channels in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension." *Biomolecules* **10**: 1261.
- Lei, X. F., Y. Ohkawara, M. R. Stämpfli, J. Gauldie, K. Croitoru, M. Jordana und Z. Xing (1998). "Compartmentalized transgene expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in mouse lung enhances allergic airways inflammation." *Clin Exp Immunol* **113**: 157-165.
- Li, H., S. J. Chen, Y. F. Chen, Q. C. Meng, J. Durand, S. Oparil und T. S. Elton (1994). "Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia." *J Appl Physiol* (1985) **77**: 1451-1459.

- Liang, S., A. A. Desai, S. M. Black und H. Tang (2021). "Cytokines, Chemokines, and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension." *Adv Exp Med Biol* **1303**: 275-303.
- Liu, J. Q., E. M. Erbynn und R. J. Folz (2005). "Chronic hypoxia-enhanced murine pulmonary vasoconstriction: role of superoxide and gp91phox." *Chest* **128**: 594S-596S.
- Liu, S., R. T. Premont, C. D. Kontos, J. Huang und D. C. Rockey (2003). "Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt." *J Biol Chem* **278**: 49929-49935.
- Loscalzo, J. (1992). "Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension." *N Engl J Med* **327**: 117-119.
- Lüscher, T. F. und M. Barton (2000). "Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs." *Circulation* **102**: 2434-2440.
- Maemura, K., H. Kurihara, Y. Kurihara, H. Oda, T. Ishikawa, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins und Y. Yazaki (1996). "Sequence analysis, chromosomal location, and developmental expression of the mouse preproendothelin-1 gene." *Genomics* **31**: 177-184.
- Maki, H., T. Hara, M. Tsuji, A. Saito, S. Minatsuki, T. Inaba, E. Amiya, Y. Hosoya, M. Hatano, H. Morita, A. Yao, K. Kinugawa und I. Komuro (2020). "The Clinical Efficacy of Endothelin Receptor Antagonists in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension." *Int Heart J* **61**: 799-805.
- Mandegar, M., Y. C. B. Fung, W. Huang, C. V. Remillard, L. J. Rubin und J. X. Yuan (2004). "Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension." *Microvasc Res* **68**: 75-103.
- Mandras, S. A., H. S. Mehta und A. Vaidya (2020). "Pulmonary Hypertension: A Brief Guide for Clinicians." *Mayo Clin Proc* **95**: 1978-1988.
- Marini, M., S. Carpi, A. Bellini, F. Patalano und S. Mattoli (1996). "Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **220**: 896-899.
- Mazucca, M. Q. und R. A. Khalil (2012). "Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease." *Biochem Pharmacol* **84**: 147-162.
- McLaughlin, V. V., S. L. Archer, D. B. Badesch, R. J. Barst, H. W. Farber, J. R. Lindner, M. A. Mathier, M. D. McGoon, M. H. Park, R. S. Rosenson, L. J. Rubin, V. F. Tapson und J. Varga (2009). "ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association." *J Am Coll Cardiol* **53**: 1573-1619.
- Michael, J. R. und B. A. Markewitz (1996). "Endothelins and the lung." *Am J Respir Crit Care Med* **154**: 555-581.
- Migneault, A., S. Sauvageau, L. Villeneuve, E. Thorin, A. Fournier, N. Leblanc und J. Dupuis (2005). "Chronically elevated endothelin levels reduce pulmonary vascular reactivity to nitric oxide." *Am J Respir Crit Care Med* **171**: 506-513.

- Mizuguchi, T., M. Nishiyama, K. Moroi, H. Tanaka, T. Saito, Y. Masuda, T. Masaki, D. de Wit, M. Yanagisawa und S. Kimura (1997). "Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse." *Br J Pharmacol* **120**: 1427-1430.
- Mizuno, S., L. Farkas, A. Al Hussein, D. Farkas, J. Gomez-Arroyo, D. Kraskauskas, M. R. Nicolls, C. D. Cool, H. J. Bogaard und N. F. Voelkel (2012). "Severe pulmonary arterial hypertension induced by SU5416 and ovalbumin immunization." *Am J Respir Cell Mol Biol* **47**: 679-687.
- Molteni, A., W. F. Ward, C. H. Ts'ao, C. D. Port und N. H. Solliday (1984). "Monocrotaline-induced pulmonary endothelial dysfunction in rats." *Proc Soc Exp Biol Med* **176**: 88-94.
- Moncada, S. und E. A. Higgs (1991). "Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance." *Eur J Clin Invest* **21**: 361-374.
- Montani, D., A. Seferian, L. Savale, G. Simonneau und M. Humbert (2013). "Drug-induced pulmonary arterial hypertension: a recent outbreak." *Eur Respir Rev* **22**: 244-250.
- Morrell, N. W., S. Adnot, S. L. Archer, J. Dupuis, P. L. Jones, M. R. MacLean, I. F. McMurtry, K. R. Stenmark, P. A. Thistlethwaite, N. Weissmann, J. X. J. Yuan und E. K. Weir (2009). "Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension." *J Am Coll Cardiol* **54**: S20-31.
- Mukerjee, D., D. St. George, B. Coleiro, C. Knight, C. P. Denton, J. Davar, C. M. Black und J. G. Coghlan (2003). "Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach." *Ann Rheum Dis* **62**: 1088-1093.
- Mushaben, E. M., G. K. Hershey, M. W. Pauciulo, W. C. Nichols und T. D. Le Cras (2012). "Chronic allergic inflammation causes vascular remodeling and pulmonary hypertension in BMRP2 hypomorph and wild-type mice." *PLoS One* **7**: e32468.
- Nagase, T., H. Kurihara, Y. Kurihara, T. Aoki-Nagase, R. Nagai und Y. Ouchi (1999). "Disruption of ET-1 gene enhances pulmonary responses to methacholine via functional mechanism in knockout mice." *J Appl Physiol* **87**: 2020-2024.
- Nakamuta, M., R. Takayanagi, Y. Sakai, S. Sakamoto, H. Hagiwara, T. Mizuno, Y. Saito, S. Hirose, M. Yamamoto und H. Nawata (1991). "Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **177**: 34-39.
- Nakanishi, K., F. Tajima, Y. Nakata, H. Osada, S. Tachibana, T. Kawai, C. Torikata, T. Suga, K. Takishima, T. Aurues und T. Ikeda (1999). "Expression of endothelin-1 in rats developing hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension." *Lab Invest* **79**: 1347-1357.
- Nicolls, M. R., L. Taraseviciene-Stewart, P. R. Rai, D. B. Badesch und N. F. Voelkel (2005). "Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective." *Eur Respir J* **26**: 1110-1118.
- Nootens, M., E. Kaufmann, T. Rector, C. Toher, D. Judd, G. S. Francis und S. Rich (1995). "Neurohormonal activation in patients with right ventricular failure from pulmonary hypertension: relation to hemodynamic variables and endothelin levels." *J Am Coll Cardiol* **26**: 1581-1585.

- Ohuchi, T., T. Kuwaki, G. Y. Ling, D. Dewit, K. H. Ju, M. Onodera, W. H. Cao, M. Yanagisawa und M. Kumada (1999). "Elevation of blood pressure by genetic and pharmacological disruption of the ETB receptor in mice." *Am J Physiol* **276**: R1071-1077.
- Oka, M., N. Homma, L. Taraseviciene-Stewart, K. G. Morris, D. Kraskauskas, N. Burns, N. F. Voelkel und I. F. McMurtry (2007). "Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats." *Circ Res* **100**: 923-929.
- Oksche, A., G. Boese, A. Horstmeyer, J. Furkert, M. Beyermann, M. Bienert und W. Rosenthal (2000). "Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor." *Mol Pharmacol* **57**: 1104-1113.
- Opitz, C. F. und R. Ewert (2006). "Dual ET(A)/ET(B) vs. selective ET(A) endothelin receptor antagonism in patients with pulmonary hypertension." *Eur J Clin Invest* **36 Suppl 3**: 1-9.
- Ozaki, S., K. Ohwaki, M. Ihara, T. Fukuroda, K. Ishikawa und M. Yano (1995). "ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 483-489.
- Pabst, R. und T. Tschernig (2002). "Perivascular capillaries in the lung: an important but neglected vascular bed in immune reactions?" *J Allergy Clin Immunol* **110**: 209-214.
- Park, S. H., W. C. Chen, N. Esmaeil, B. Lucas, L. M. Marsh, J. Reibman und G. Grunig (2014). "Interleukin 13- and interleukin 17A-induced pulmonary hypertension phenotype due to inhalation of antigen and fine particles from air pollution." *Pulm Circ* **4**: 654-668.
- Park, S. H., W. C. Chen, C. Hoffman, L. M. Marsh, J. West und G. Grunig (2013). "Modification of hemodynamic and immune responses to exposure with a weak antigen by the expression of a hypomorphic BMPR2 gene." *PLoS One* **8**: e55180.
- Patra, A. L. (1986). "Comparative anatomy of mammalian respiratory tracts: the nasopharyngeal region and the tracheobronchial region." *J Toxicol Environ Health* **17**: 163-174.
- Perros, F., M. Humbert und P. Dorfmüller (2021). "Smouldering fire or conflagration? An illustrated update on the concept of inflammation in pulmonary arterial hypertension." *Eur Respir Rev* **30**: 210161.
- Pezzetti, F., L. Scapoli, M. Martinelli, F. Carinci, G. Brunelli, F. P. Carls, F. Palomba, F. Gombos, P. Carinci und M. Tognon (2000). "Linkage analysis of candidate endothelin pathway genes in nonsyndromic familial orofacial cleft." *Ann Hum Genet* **64**: 341-347.
- Pietra, G. G., W. D. Edwards, J. M. Kay, S. Rich, J. Kernis, B. Schloo, S. M. Ayres, E. H. Bergofsky, B. H. Brundage, K. M. Detre, A. P. Fishman, R. M. Goldring, B. M. Groves, P. S. Levy, L. M. Reid, C. E. Vreim und G. W. Williams (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.
- Polverini, P. J., R. S. Cotran, M. A. Gimbrone, Jr. und E. R. Unanue (1977). "Activated macrophages induce vascular proliferation." *Nature* **269**: 804-806.
- Price, L. C., S. J. Wort, F. Perros, P. Dorfmüller, A. Huertas, D. Montani, S. Cohen-Kaminsky und M. Humbert (2012). "Inflammation in pulmonary arterial hypertension." *Chest* **141**: 210-221.

Quarck, R., T. Nawrot, B. Meyns und M. Delcroix (2009). "C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension." *J Am Coll Cardiol* **53**: 1211-1218.

Quaschnig, T., B. Rebhan, C. Wunderlich, C. Wanner, C. M. Richter, T. Pfab, C. Bauer, A. Kraemer-Guth, J. Galle, M. Yanagisawa und B. Hoher (2005). "Endothelin B receptor-deficient mice develop endothelial dysfunction independently of salt loading." *J Hypertens* **23**: 979-985.

Rabinovitch, M. (1998). "Elastase and the pathobiology of unexplained pulmonary hypertension." *Chest* **114**: 213S-224S.

Rabinovitch, M. (2007). "Pathobiology of pulmonary hypertension." *Annu Rev Pathol* **2**: 369-399.

Rabinovitch, M., C. Guignabert, M. Humbert und M. R. Nicolls (2014). "Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension." *Circ Res* **115**: 165-175.

Remuzzi, G., N. Perico und A. Benigni (2002). "New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations." *Nat Rev Drug Discov* **1**: 986-1001.

Rich, S., K. Kieras, K. Hart, B. M. Groves, J. D. Stobo und B. H. Brundage (1986). "Antinuclear antibodies in primary pulmonary hypertension." *J Am Coll Cardiol* **8**: 1307-1311.

Rizvi, M. A., L. Katwa, D. P. Spadone und P. R. Myers (1996). "The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells." *J Mol Cell Cardiol* **28**: 243-252.

Rodriguez-Vita, J., M. Ruiz-Ortega, M. Rupérez, V. Esteban, E. Sanchez-López, J. J. Plaza und J. Egido (2005). "Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* **97**: 125-134.

Roix, J. J., A. Hagge-Greenberg, D. M. Bissonnette, S. Rodick, L. B. Russell und T. P. O'Brien (2001). "Molecular and functional mapping of the piebald deletion complex on mouse chromosome 14." *Genetics* **157**: 803-815.

Romberg, E. (1891): "Ueber Sklerose der Lungenarterie ".In: *Deutsches Archiv für klinische Medicin* **48**. Hrsg: Ziemsen H. und Zenker F. A.: 197-206. Leipzig Verlag von F. C. W. Vogel

Rosenkranz, S., R. Channick, K. M. Chin, B. Jenner, S. Gaine, N. Galiè, H. A. Ghofrani, M. M. Hoeper, V. V. McLaughlin, C. Du Roure, L. J. Rubin, O. Sitbon, V. Tapson und I. M. Lang (2021). "The impact of comorbidities on selexipag treatment effect in patients with pulmonary arterial hypertension: insights from the GRIPHON study." *Eur J Heart Fail* **24**: 205-214.

Ross, D. J., R. M. Strieter, M. C. Fishbein, A. Ardehali und J. A. Belperio (2012). "Type I immune response cytokine-chemokine cascade is associated with pulmonary arterial hypertension." *J Heart Lung Transplant* **31**: 865-873.

Rubin, L. J. (1997). "Primary pulmonary hypertension." *N Engl J Med* **336**: 111-117.

Rubin, L. J., D. B. Badesch, R. J. Barst, N. Galiè, C. M. Black, A. Keogh, T. Pulido, A. Frost, S. Roux, I. Leconte, M. Landzberg und G. Simonneau (2002). "Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension." *N Engl J Med* **346**: 896-903.

- Rubin, L. J., C. Dufton und M. J. Gerber (2005). "Ambrisentan for pulmonary arterial hypertension." *Future Cardiol* **1**: 425-432.
- Rubio-Rivas, M., N. A. Homs, D. Cuartero und X. Corbella (2021). "The prevalence and incidence rate of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: Systematic review and meta-analysis." *Autoimmun Rev* **20**: 102713.
- Ryan, J. J. und S. L. Archer (2014). "The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure." *Circ Res* **115**: 176-188.
- Rydell-Törmänen, K., J. R. Johnson, R. Fattouh, M. Jordana und J. S. Erjefält (2008). "Induction of vascular remodeling in the lung by chronic house dust mite exposure." *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**: 61-67.
- Rydell-Törmänen, K., L. Uller und J. S. Erjefält (2008). "Remodeling of extra-bronchial lung vasculature following allergic airway inflammation." *Respir Res* **9**: 18.
- Rydell-Törmänen, K., L. Uller und J. S. Erjefält (2009). "Allergic airway inflammation initiates long-term vascular remodeling of the pulmonary circulation." *Int Arch Allergy Immunol* **149**: 251-258.
- Rydell-Törmänen, K., L. Uller, C. G. Persson und J. S. Erjefält (2005). "Allergen exposure of mouse airways evokes remodeling of both bronchi and large pulmonary vessels." *Am J Respir Crit Care Med* **171**: 19-25.
- Ryerson, C. J., S. Nayar, J. R. Swiston und D. D. Sin (2010). "Pharmacotherapy in pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis." *Respir Res* **11**: 12.
- Saida, K., Y. Mitsui und N. Ishida (1989). "A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity." *J Biol Chem* **264**: 14613-14616.
- Sakurai, T., M. Yanagisawa, Y. Takuwa, H. Miyazaki, S. Kimura, K. Goto und T. Masaki (1990). "Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor." *Nature* **348**: 732-735.
- Sato, K., M. Oka, K. Hasunuma, M. Ohnishi, K. Sato und S. Kira (1995). "Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs." *Am J Physiol* **269**: L668-672.
- Schall, T. J., K. Bacon, R. D. Camp, J. W. Kaspari und D. V. Goeddel (1993). "Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes." *J Exp Med* **177**: 1821-1826.
- Seferian, A. und G. Simonneau (2013). "Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow?" *Eur Respir Rev* **22**: 217-226.
- Setola, V., M. Dukat, R. A. Glennon und B. L. Roth (2005). "Molecular determinants for the interaction of the valvulopathic anorexigen norfenfluramine with the 5-HT_{2B} receptor." *Mol Pharmacol* **68**: 20-33.
- Seybold, J., D. Thomas, M. Witzernath, S. Boral, A. C. Hocke, A. Bürger, A. Hatzelmann, H. Tenor, C. Schudt, M. Krüll, H. Schütte, S. Hippenstiel und N. Suttorp (2005). "Tumor necrosis

8. Literaturverzeichnis

factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability." *Blood* **105**: 3569-3576.

Shaw, A. F. B. und A. A. Ghareeb (1938). "The pathogenesis of pulmonary schistosomiasis in Egypt with special reference to Ayerza's disease." *J Pathol* **46**: 401-424.

Shi-Wen, X., Y. Chen, C. P. Denton, M. Eastwood, E. A. Renzoni, G. Bou-Gharios, J. D. Pearson, M. Dashwood, R. M. du Bois, C. M. Black, A. Leask und D. J. Abraham (2004). "Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts." *Mol Biol Cell* **15**: 2707-2719.

Shi-Wen, X., C. P. Denton, M. R. Dashwood, A. M. Holmes, G. Bou-Gharios, J. D. Pearson, C. M. Black und D. J. Abraham (2001). "Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1." *J Invest Dermatol* **116**: 417-425.

Shi-wen, X., S. L. Howat, E. A. Renzoni, A. Holmes, J. D. Pearson, M. R. Dashwood, G. Bou-Gharios, C. P. Denton, R. M. du Bois, C. M. Black, A. Leask und D. J. Abraham (2004). "Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK." *J Biol Chem* **279**: 23098-23103.

Shi-wen, X., L. Kennedy, E. A. Renzoni, G. Bou-Gharios, R. M. du Bois, C. M. Black, C. P. Denton, D. J. Abraham und A. Leask (2007). "Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts." *Arthritis Rheum* **56**: 4189-4194.

Shi-wen, X., L. A. Stanton, L. Kennedy, D. Pala, Y. Chen, S. L. Howat, E. A. Renzoni, D. E. Carter, G. Bou-Gharios, R. J. Stratton, J. D. Pearson, F. Beier, K. M. Lyons, C. M. Black, D. J. Abraham und A. Leask (2006). "CCN2 is necessary for adhesive responses to transforming growth factor-beta1 in embryonic fibroblasts." *J Biol Chem* **281**: 10715-10726.

Simonneau, G., N. Galiè, L. J. Rubin, D. Langleben, W. Seeger, G. Domenighetti, S. Gibbs, D. Lebecq, R. Speich, M. Beghetti, S. Rich und A. Fishman (2004). "Clinical classification of pulmonary hypertension." *J Am Coll Cardiol* **43**: 5S-12S.

Simonneau, G., D. Montani, D. S. Celermajer, C. P. Denton, M. A. Gatzoulis, M. Krowka, P. G. Williams und R. Souza (2019). "Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension." *Eur Respir J* **53**: 1801913.

Simonneau, G., I. M. Robbins, M. Beghetti, R. N. Channick, M. Delcroix, C. P. Denton, C. G. Elliott, S. P. Gaine, M. T. Gladwin, Z. C. Jing, M. J. Krowka, D. Langleben, N. Nakanishi und R. Souza (2009). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." *J Am Coll Cardiol* **54**: S43-54.

Simonson, M. S. und M. J. Dunn (1990). "Endothelin. Pathways of transmembrane signaling." *Hypertension* **15**: 15-12.

Simonson, M. S., Y. Wang und M. J. Dunn (1992). "Cellular signaling by endothelin peptides: pathways to the nucleus." *J Am Soc Nephrol* **2**: S116-125.

Song, Y., J. E. Jones, H. Beppu, J. F. Keaney, Jr., J. Loscalzo und Y. Y. Zhang (2005). "Increased susceptibility to pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice." *Circulation* **112**: 553-562.

- Soon, E., A. M. Holmes, C. M. Treacy, N. J. Doughty, L. Southgate, R. D. Machado, R. C. Trembath, S. Jennings, L. Barker, P. Nicklin, C. Walker, D. C. Budd, J. Pepke-Zaba und N. W. Morrell (2010). "Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension." *Circulation* **122**: 920-927.
- Stacher, E., B. B. Graham, J. M. Hunt, A. Gandjeva, S. D. Groshong, V. V. McLaughlin, M. Jessup, W. E. Grizzle, M. A. Aldred, C. D. Cool und R. M. Tuder (2012). "Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension." *Am J Respir Crit Care Med* **186**: 261-272.
- Stämpfli, M. R., R. E. Wiley, G. S. Neigh, B. U. Gajewska, X. F. Lei, D. P. Snider, Z. Xing und M. Jordana (1998). "GM-CSF transgene expression in the airway allows aerosolized ovalbumin to induce allergic sensitization in mice." *J Clin Invest* **102**: 1704-1714.
- Steen, V. und T. A. Medsger, Jr. (2003). "Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement." *Arthritis Rheum* **48**: 516-522.
- Stelzner, T. J., R. F. O'Brien, M. Yanagisawa, T. Sakurai, K. Sato, S. Webb, M. Zamora, I. F. McMurtry und J. H. Fisher (1992). "Increased lung endothelin-1 production in rats with idiopathic pulmonary hypertension." *Am J Physiol* **262**: L614-620.
- Stenmark, K. R., K. A. Fagan und M. G. Frid (2006). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms." *Circ Res* **99**: 675-691.
- Stenmark, K. R. und R. P. Mecham (1997). "Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling." *Annu Rev Physiol* **59**: 89-144.
- Stenmark, K. R., B. Meyrick, N. Galie, W. J. Mooi und I. F. McMurtry (2009). "Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**: L1013-1032.
- Steriade, A., A. Seferian, X. Jaïs, L. Savale, E. M. Jutant, F. Parent, O. Sitbon, M. Humbert, G. Simonneau und D. Montani (2014). "The potential for macitentan, a new dual endothelin receptor antagonist, in the treatment of pulmonary arterial hypertension." *Ther Adv Respir Dis* **8**: 84-92.
- Stewart, D. J., R. D. Levy, P. Cernacek und D. Langleben (1991). "Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?" *Ann Intern Med* **114**: 464-469.
- Stow, J. L., P. C. Low, C. Offenhäuser und D. Sangermani (2009). "Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators." *Immunobiology* **214**: 601-612.
- Suarez, C. J., S. M. Dintzis und C. W. Frevert (2012): "Respiratory". In: *Comparativ Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas* **1**. Hrsg: D Liggitt, P. Treuting, W. Frevert und S. Dintzis: 121-134. London: Elsevier Inc. - 978-0-12-381361-9
- Tabeling, C., H. Scheer, S. M. Schönrock, F. Runge, B. Gutbier, J. Lienau, E. Hamelmann, B. Opitz, N. Suttrop, K. Mayer, G. M. Behrens, T. Tschernig und M. Witzernath (2014). "Nucleotide oligomerization domain 1 ligation suppressed murine allergen-specific T-cell proliferation and airway hyperresponsiveness." *Am J Respir Cell Mol Biol* **50**: 903-911.
- Taillé, C., A. Guénéguou, A. Almolki, M. Piperaud, B. Leynaert, S. Vuillaumier, F. Neukirch, J. Boczkowski, M. Aubier, J. Benessiano und B. Crestani (2007). "ETB receptor polymorphism is associated with airway obstruction." *BMC Pulm Med* **7**: 5.

- Takayanagi, R., K. Kitazumi, C. Takasaki, K. Ohnaka, S. Aimoto, K. Tasaka, M. Ohashi und H. Nawata (1991). "Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular endothelium and its linkage to vasodilation." *FEBS Lett* **282**: 103-106.
- Takimoto, M., T. Inui, T. Okada und Y. Urade (1993). "Contraction of smooth muscle by activation of endothelin receptors on autonomic neurons." *FEBS Lett* **324**: 277-282.
- Takimoto, M., K. Oda, Y. Sasaki und T. Okada (1996). "Endothelin-A receptor-mediated prostanoid secretion via autocrine and deoxyribonucleic acid synthesis via paracrine signaling in human bronchial epithelial cells." *Endocrinology* **137**: 4542-4550.
- Takuwa, N., Y. Takuwa, M. Yanagisawa, K. Yamashita und T. Masaki (1989). "A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts." *J Biol Chem* **264**: 7856-7861.
- Thenappan, T., K. W. Prins, M. R. Pritzker, J. Scandurra, K. Volmers und E. K. Weir (2016). "The Critical Role of Pulmonary Arterial Compliance in Pulmonary Hypertension." *Ann Am Thorac Soc* **13**: 276-284.
- Thoua, N. M., E. C. Derrett-Smith, K. Khan, A. Dooley, X. Shi-Wen und C. P. Denton (2012). "Gut fibrosis with altered colonic contractility in a mouse model of scleroderma." *Rheumatology (Oxford)* **51**: 1989-1998.
- Tuder, R. M., S. L. Archer, P. Dorfmueller, S. C. Erzurum, C. Guignabert, E. Michelakis, M. Rabinovitch, R. Schermuly, K. R. Stenmark und N. W. Morrell (2013). "Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension." *J Am Coll Cardiol* **62**: D4-12.
- Tuder, R. M., B. Groves, D. B. Badesch und N. F. Voelkel (1994). "Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension." *Am J Pathol* **144**: 275-285.
- Tuder, R. M. und N. F. Voelkel (1998). "Pulmonary hypertension and inflammation." *J Lab Clin Med* **132**: 16-24.
- Ulrich, S., L. Taraseviciene-Stewart, L. C. Huber, R. Speich und N. Voelkel (2008). "Peripheral blood B lymphocytes derived from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension express a different RNA pattern compared with healthy controls: a cross sectional study." *Respir Res* **9**: 20.
- Udem, C., E. J. Rios, J. Maylor und L. A. Shimoda (2012). "Endothelin-1 augments Na(+)/H(+) exchange activity in murine pulmonary arterial smooth muscle cells via Rho kinase." *PLoS One* **7**: e46303.
- Van Oosterhout, A. J. M., I. Van Ark, G. Hofman, H. F. J. Savelkoul und F. P. Nijkamp (1993). "Recombinant interleukin-5 induces in vivo airway hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs." *Eur J Pharmacol* **236**: 379-383.
- Ventetuolo, C. E., S. M. Kawut und D. J. Lederer (2012). "Plasma endothelin-1 and vascular endothelial growth factor levels and their relationship to hemodynamics in idiopathic pulmonary fibrosis." *Respiration* **84**: 299-305.
- Voelkel, N. F., R. M. Tuder und E. K. Weir (1997): "Pathophysiology of primary pulmonary hypertension: from physiology to molecular mechanisms". In: *Primary pulmonary hypertension*. Hrsg: L. J. Rubin und S. Rich: 83-129. New York: Dekker- 0-8247-9505-9

- von Bethmann, A. N., F. Brasch, R. Nüsing, K. Vogt, H. D. Volk, K. M. Müller, A. Wendel und S. Uhlig (1998). "Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung." *Am J Respir Crit Care Med* **157**: 263-272.
- Wagenvoort, C. A. und N. Wagenvoort (1970). "Primary pulmonary hypertension. A pathologic study of the lung vessels in 156 clinically diagnosed cases." *Circulation* **42**: 1163-1184.
- Wang, Y., P. M. Rose, M. L. Webb und M. J. Dunn (1994). "Endothelins stimulate mitogen-activated protein kinase cascade through either ETA or ETB." *Am J Physiol* **267**: C1130-1135.
- Wang, Z., D. A. Schreier, T. A. Hacker und N. C. Chesler (2013). "Progressive right ventricular functional and structural changes in a mouse model of pulmonary arterial hypertension." *Physiol Rep* **1**: e00184.
- Watts, S. W. (2010). "Endothelin receptors: what's new and what do we need to know?" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**: R254-260.
- Waxman, A. B. und R. T. Zamanian (2013). "Pulmonary arterial hypertension: new insights into the optimal role of current and emerging prostacyclin therapies." *Am J Cardiol* **111**: 1A-16A; quiz 17A-19A.
- Weissberg, P. L., C. Witchell, A. P. Davenport, T. R. Hesketh und J. C. Metcalfe (1990). "The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells." *Atherosclerosis* **85**: 257-262.
- Weng, C. M., C. C. Yu, M. L. Kuo, B. C. Chen und C. H. Lin (2014). "Endothelin-1 induces connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts by ETAR-dependent JNK/AP-1 pathway." *Biochem Pharmacol* **88**: 402-411.
- Weng, M., D. M. Baron, K. D. Bloch, A. D. Luster, J. J. Lee und B. D. Medoff (2011). "Eosinophils are necessary for pulmonary arterial remodeling in a mouse model of eosinophilic inflammation-induced pulmonary hypertension." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **301**: L927-936.
- Williams, D. L., Jr., K. L. Jones, D. J. Pettibone, E. V. Lis und B. V. Clineschmidt (1991). "Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes." *Biochem Biophys Res Commun* **175**: 556-561.
- Williamson, C. M., E. R. Dutton, C. M. Abbott, C. V. Beechey, S. T. Ball und J. Peters (1995). "Thirteen genes (Cebpb, E2f1, Tcf4, Cyp24, Pck1, Acra4, Edn3, Kcnb1, Mc3r, Ntsr, Cd40, Plcg1 and Rcad) that probably lie in the distal imprinting region of mouse chromosome 2 are not monoallelically expressed." *Genet Res* **65**: 83-93.
- Wills-Karp, M. und S. L. Ewart (1997). "The genetics of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice." *Am J Respir Crit Care Med* **156**: S89-96.
- Witzenrath, M., B. Ahrens, S. M. Kube, A. Braun, H. G. Hoymann, A. C. Hocke, S. Rosseau, N. Suttrop, E. Hamelmann und H. Schütte (2006). "Detection of allergen-induced airway hyperresponsiveness in isolated mouse lungs." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**: L466-472.

Witzenrath, M., B. Ahrens, S. M. Kube, A. C. Hocke, S. Rosseau, E. Hamelmann, N. Suttrop und H. Schütte (2006). "Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness." *Eur Respir J* **28**: 370-377.

Wood, P. (1958). "Pulmonary hypertension with special reference to the vasoconstrictive factor." *Br Heart J* **20**: 557-570.

Wunder, C., R. W. Brock, S. Frantz, W. Göttlich, H. Morawietz, N. Roewer und O. Eichelbrönnner (2005). "Carbon monoxide, but not endothelin-1, plays a major role for the hepatic microcirculation in a murine model of early systemic inflammation." *Crit Care Med* **33**: 2323-2331.

Xu, D., N. Emoto, A. Giaid, C. Slaughter, S. Kaw, D. deWit und M. Yanagisawa (1994). "ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1." *Cell* **78**: 473-485.

Xu, J. und N. S. Zhong (1997). "The interaction of tumour necrosis factor alpha and endothelin-1 in pathogenetic models of asthma." *Clin Exp Allergy* **27**: 568-573.

Yanagisawa, M., A. Inoue, Y. Takawa, Y. Mitsui, M. Kobayashi und T. Masaki (1989). "The human preproendothelin-1 gene: possible regulation by endothelial phosphoinositide turnover signaling." *J Cardiovasc Pharmacol* **13 Suppl 5**: S13-17; discussion S18.

Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto und T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." *Nature* **332**: 411-415.

Yanagisawa, M. und T. Masaki (1989). "Molecular biology and biochemistry of the endothelins." *Trends Pharmacol Sci* **10**: 374-378.

Yang, Y., B. K. Zhang, D. Liu, W. Nie, J. M. Yuan, Z. Wang und Y. M. Guo (2012). "Sodium hydrosulfide prevents hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in broilers." *Br Poult Sci* **53**: 608-615.

Yeager, M. E., M. G. Frid und K. R. Stenmark (2011). "Progenitor cells in pulmonary vascular remodeling." *Pulm Circ* **1**: 3-16.

Yogi, A., G. E. Callera, A. C. Montezano, A. B. Aranha, R. C. Tostes, E. L. Schiffrin und R. M. Touyz (2007). "Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 1960-1967.

Yoshizumi, M., H. Kurihara, T. Sugiyama, F. Takaku, M. Yanagisawa, T. Masaki und Y. Yazaki (1989). "Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **161**: 859-864.

Zamora, M. A., E. C. Dempsey, S. J. Walchak und T. J. Stelzner (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, Y., G. R. Knutsen, M. D. Brown und L. B. Ruest (2013). "Control of endothelin-a receptor expression by progesterone is enhanced by synergy with Gata2." *Mol Endocrinol* **27**: 892-908.

Zucker, T. P., D. Bönisch, A. Hasse, T. Grosser, A. A. Weber und K. Schrör (1998). "Tolerance development to antimitogenic actions of prostacyclin but not of prostaglandin E1 in coronary artery smooth muscle cells." *Eur J Pharmacol* **345**: 213-220.

9. Publikationsverzeichnis

9.1. Originalarbeiten

- Endothelin B Receptor Immunodynamics in Pulmonary Arterial Hypertension
Tabeling, C, **González Calera CR**, Lienau J, Höppner J, Tschernig T, Kershaw O, Gutbier B, Naujoks J, Herbert J, Opitz B, Gruber AD, Hocher B, Suttorp N, Heidecke H, Burmester GR, Riemekasten G, Siegert E, Kuebler WM und Witzernath M (2022)
Front. Immunol.13:895501. doi: 10.3389/fimmu.2022.895501
- 25-hydroxyvitamin D3 promotes the long-term effect of specific immunotherapy in a murine allergy model.
Heine G, Tabeling C, Hartmann B, **González Calera CR**, Kühl AA, Lindner J, Radbruch A, Witzernath M, Worm M.
J Immunol. 2014 Aug 1;193(3):1017-23 DOI: 10.4049/jimmunol.1301656.

9.2. Vorträge und Poster

- 25-hydroxyvitamin D promotes the long-term effects of specific immunotherapy (SIT) in allergic airway inflammation in mice.
Tabeling C, Heine G, Hartmann B, **González Calera CR**, Kühl AA, Lindner J, Radbruch A, Witzernath M, Worm M
Eur Respir J Sep 2014, 44 (Suppl 58) P860
- Einfluss von 25-Hydroxyvitamin D auf die Typ I-Sensibilisierung und die spezifische Immuntherapie im Mausmodell.
Heine G, Tabeling C, Hartmann B, **González Calera CR**, Kühl AA, Lindner J, Radbruch A, Worm M
26. Mainzer Allergie Workshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) 2014.
Allergo J Int. 2014; 23(1): 35–53
- Additive Gabe von 25-Hydroxyvitamin D3 erhöht die protektiven Langzeiteffekte der spezifischen Immuntherapie bei allergischer Atemwegsinfammation.
Tabeling C, Heine G, Hartmann B, **González Calera CR**, Kühl AA, Lindner J, Radbruch A, Witzernath M, Worm M
Pneumologie 2014; 68 - V163 DOI: 10.1055/s-0034-1367780
- 25-Hydroxyvitamin D3 erhöht die protektiven Langzeiteffekte der spezifischen Immuntherapie bei allergischer Atemwegsinfammation.

Tabeling C, Heine G, Hartmann B, **González Calera CR**, Kühl AA, Lindner J, Radbruch A, Witzzenrath M, Worm M

Pneumologie 2014; 68 - A7 DOI: 10.1055/s-0033-1363100

- Role of endothelin B receptor in Th2-induced pulmonary vascular hyperresponsiveness.

Christoph Tabeling, **Carla R. González Calera**, Thomas Tschernig, Matthias W. Laschke, Berthold Hoher, Norbert Suttorp, Martin Witzzenrath

Eur Respir J Sep 2013, 42 (Suppl 57) P5164

- Altersabhängige Effekte der Überexpression von prepro-Endothelin-1 auf das pulmonalvaskuläre und respiratorische System.

C Tabeling, **CR González Calera**, O Kershaw, LE Sander, B Hoher, AD Gruber, N Suttorp, M Witzzenrath.

16. Workshop des Arbeitskreises Respiratorisches System der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) 2013.

Pneumologie 2013; 67: 344-348

- Rolle des Endothelin-B-Rezeptors bei T_H2-induzierter pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität.

C Tabeling, **CR González Calera**, T Tschernig, MW Laschke, B Hoher, N Suttorp, M Witzzenrath.

54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 2013.

Pneumologie 2013; DOI: 10.1055/s-0033-1334524

- Altersabhängige Effekte der Überexpression von prepro-Endothelin-1 auf das pulmonalvaskuläre und respiratorische System.

C Tabeling, **CR González Calera**, O Kershaw, LE Sander, B Hoher, AD Gruber, N Suttorp, M Witzzenrath.

54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 2013.

Pneumologie 2013; DOI:10.1055/s-0033-1334801

- Rolle des Endothelin-B-Rezeptors bei T_H2-induzierter pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität.

Tabeling C, **González Calera CR**, Tschernig T, Laschke MW, Hoher B, Suttorp N, Witzzenrath M.

Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 2012.

10. Danksagung

Mein erster Dank geht an meinen Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. Martin Witzzenrath, Stellvertretender Klinikdirektor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin für die Möglichkeit zur Promotion, zur beruflichen Weiterentwicklung und für seine fachliche Unterstützung und Expertise.

Zudem gilt ein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Aschenbach für die veterinärmedizinische Unterstützung und die Bereitschaft meine Dissertation über das Institut für Veterinär-Physiologie der Freien Universität Berlin einreichen zu können.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Christoph Tabeling für die Unterstützung während der Erarbeitung dieser Dissertation, sowie für dessen fachlichen Rat und für das Lehren so vieler Techniken.

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen aus dem Team der AG Witzzenrath, vor allem den Doktoranden und Frau Dr. Katrin Reppe, für eine wirklich unvergessliche Zeit bedanken.

Zudem gilt ein besonderer Dank an die, die mir mit Kenntnissen und Methoden in dieser Arbeit geholfen haben:

- Dr. Birgitt Gutbier/ AG Witzzenrath, danke, dass du immer Zeit hattest
- Katharina Hellwig/ AG Hocke
- Dr. Jasmin Lienau/ AG Witzzenrath
- Dr. Jan Naujoks/ AG Opitz
- Prof. Dr. Tschernig/ Universität des Saarlandes
- Prof. Dr. Doherr/ Freie Universität Berlin
- Dr. Julia Herbert
- PhD Elena Noe

Aus tiefstem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern Rosa und Federico, meiner Schwester Ximena und Jutta für deren Interesse an meiner Arbeit und die liebevolle Unterstützung, sie zu beenden, und meinen Freunden, deren Gespräche mir halfen, diesen langen Weg zu gehen, besonders euch, Alex und Kumi!

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann Christoph und unseren Kindern Benjamín und Violeta für die liebevolle, grenzenlose Unterstützung und das Verständnis beim Vollenden meiner Dissertation.

11. Finanzierungsquellen – *Funding Sources*

Diese Arbeiten wurden finanziell durch ein Promotionsstipendium der Charité - Universitätsmedizin Berlin gefördert. Zudem wurde diese Studie mitfinanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft e. V., Bonn und Actelion Pharmaceuticals Deutschland GmbH, Freiburg.

12. Interessenskonflikte – *Conflict of Interest*

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

13. Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, 25.05.2022, Carla Rosa González Calera



mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-166-7