

ANALYSE DER REEXPRESSION FETALER MOLEKÜLVARIANTEN  
VON FIBRONEKTIN UND TENASCIN-C IM RATTENMODELL DER  
MONOCROTALIN-INDUZIERTEN PULMONALEN HYPERTONIE:  
POTENTIELLE BEDEUTUNG ALS DIAGNOSTISCHE MARKER UND  
THERAPEUTISCHES TARGET

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät**

**der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Pamela Bendz**

**geboren am 09.12.1994 in Bad Mergentheim**

## **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. Marcus Franz, Universitätsklinikum Jena**
- 2. PD Dr. Alexander Pfeil, Universitätsklinikum Jena**
- 3. Prof. Dr. Christian Jung, Universitätsklinikum Düsseldorf**

**Tag der Verteidigung: 30.06.2020**

## Inhalt

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Anatomie und Physiologie des Lungenkreislaufs .....	1
1.2 Definition der pulmonalen Hypertonie .....	1
1.3 Epidemiologie .....	2
1.4 Klassifikation .....	2
1.5 Symptome.....	4
1.6 Diagnostik .....	4
1.7 Therapieoptionen.....	5
1.7.1 Der duale Endothelinrezeptor-Antagonist Macitentan.....	5
1.8 Pathophysiologie .....	6
1.8.1 Vasokonstriktion .....	7
1.8.2 Thrombosierung .....	7
1.8.3 Pulmonalvaskuläres <i>Remodelling</i> .....	7
1.8.4 Cor pulmonale .....	8
1.9 Die extrazelluläre Matrix .....	9
1.9.1 Fibronectin .....	9
1.9.2 Tenascin-C .....	11
1.9.3 Humane rekombinante Antikörper mit Spezifität gegen Fibronectin- und Tenascin-C-Spleißvarianten.....	12
1.10 Das Tiermodell der Monocrotalin-induzierten Pulmonalen Hypertonie.....	13
1.11 Ziele der Arbeit .....	14
<b>2. Materialien und Methoden.....</b>	<b>15</b>

2.1	Material .....	15
2.1.1	Versuchstiere .....	15
2.1.2	Antikörper .....	15
2.1.3	Primer .....	16
2.1.4	Kits und Assays .....	17
2.1.5	Reagenzien und Chemikalien .....	17
2.1.6	Puffer und Lösungen .....	18
2.1.7	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Softwares .....	19
2.2	Methoden .....	21
2.2.1	Tiermodell der Monocrotalin-induzierten Pulmonalen Hypertonie .....	21
2.2.2	Histologische Analyse der Gewebeschädigung in Lunge und Myokard .....	25
2.2.3	<i>Real-time</i> Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion .....	27
2.2.4	Immunfluoreszenz-Detektion von Adhäsionsproteinen der extrazellulären Matrix im Gewebe .....	31
2.2.5	Quantitative Analyse der Serumkonzentrationen von Fibronectin- und Tenascin-C-Spleißvarianten mittels ELISA .....	32
2.2.6	Statistische Auswertung .....	34
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Tiermodell der Monocrotalin-induzierten Pulmonalen Hypertonie .....	35
3.1.1	Klinische Untersuchung .....	35
3.1.2	Echokardiographische und hämodynamische Evaluation .....	36
3.2	Analyse der histopathologischen Gewebeschädigung nach Induktion der pulmonalen Hypertonie .....	38
3.2.1	Histologische Analyse der Lungengewebschädigung .....	38
3.2.2	Histologische Analyse der Gewebeschädigung im Myokard .....	39
3.3	Analyse der differentiellen Expression von Fibronectin- und Tenascin-C-Spleißvarianten im Modell der Monocrotalin-induzierten Pulmonalen Hypertonie .....	42

3.3.1 Differentielle Genexpressionsanalyse der Spleißvarianten von Fibronectin und Tenascin-C in Lunge, rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel.....	43
3.4 Immunfluoreszenz-Detektion von Fibronectin- und Tenascin-C-Varianten im Gewebe .....	47
3.4.1 Immunfluoreszenz-Detektion von B <sup>+</sup> Tn-C und ED-A <sup>+</sup> Fn in der Lunge.....	47
3.4.2 Immunfluoreszenz-Detektion von B <sup>+</sup> Tn-C und ED-A <sup>+</sup> Fn im rechten Ventrikel ...	49
3.4.3 Immunfluoreszenz-Detektion von B <sup>+</sup> Tn-C und ED-A <sup>+</sup> Fn im linken Ventrikel.....	51
3.4.4 Vergleich der Monocrotalin-Gruppen.....	52
3.5 Quantitative Analyse der Serumkonzentrationen von Fibronectin- und Tenascin-C-Spleißvarianten mittels ELISA .....	54
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>57</b>
<b>5. Schlussfolgerungen .....</b>	<b>69</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>79</b>
Tabellenverzeichnis .....	85
Abbildungsverzeichnis .....	86
Ehrenwörtliche Erklärung.....	88
Danksagung .....	89

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BNP	B-natriuretisches Peptid
Bp	Basenpaar
cDNA	Komplementäre DNA
cLSM	Konfokale Laser <i>Scanning</i> Mikroskopie
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CON	Kontrollen
CSS	<i>Clinical Severity Score</i> , klinischer Schweregrad <i>Score</i>
Cy3	Cyanin 3
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERA	Endothelinrezeptor-Antagonist
ET	Endothelin
Fn	Fibronektin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HKG	<i>Housekeeping Gen</i> , konstitutiv exprimiertes Gen
IF	Immunfluoreszenz
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
LV	Linker Ventrikel
MACI	Macitentan
MCT	Monocrotalin
mk	Monoklonal
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
NT-pro BNP	N-terminales pro BNP
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	Pulmonalarterieller Druck
PAPm	Mittlerer Pulmonalarteriendruck
PAWP	<i>Pulmonary capillary wedge pressure</i> , Wedge-Druck
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase

PH	Pulmonale Hypertonie
<i>p.i.</i>	<i>Post inductionem</i>
<i>p.o</i>	<i>Per os</i>
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RA	Rechtsatrial
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RHK	Rechtsherzkatheter
RINe-Wert	RNA <i>integrity number equivalent</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RV	Rechter Ventrikel
<i>s.c.</i>	<i>Sub cutan</i>
TAPSE	<i>Tricuspid annular plane systolic excursion</i>
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLV	Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz
Tn-C	Tenascin-C
TTE	transthorakale Echokardiographie
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## Zusammenfassung

Die Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine heterogene Erkrankung, welche anhand ihrer Ätiologie in fünf Gruppen eingeteilt wird. Trotz spezifischer Therapiemaßnahmen, die insbesondere für die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH, Gruppe 1) zur Verfügung stehen, sind die Mortalitätsraten hoch und die Lebensqualität der Patienten eingeschränkt. Der prognoselimitierende Faktor ist die Entwicklung einer Rechtsherzinsuffizienz aufgrund der PH-assoziierten Drucküberlastung. Eine optimale pharmakologische Therapie, welche auf die Progressionshemmung der Rechtsherzinsuffizienz abzielt, ist aktuell nicht etabliert. Pathophysiologisch kommt es zu einem pulmonalvaskulären und rechtsventrikulären *Remodelling*, welches im Rahmen der strukturellen und funktionellen Reorganisation der extrazellulären Matrix das Wiederauftreten sogenannter onkofetaler Varianten von Fibronectin (Fn) und Tenascin-C (Tn-C) beinhaltet. Letzteres konnte mit zahlreichen Erkrankungen aus dem kardiovaskulären Formenkreis assoziiert werden, so dass diese fetalen Fn- und Tn-C-Varianten als potentiell attraktive diagnostische Marker und therapeutische Zielstrukturen identifiziert werden konnten.

Vor diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Expression der fetalen Spleißvarianten von Fn und Tn-C im Rattenmodell der Monocrotalin (MCT)-induzierten PH differentiell im Lungengewebe und im konsekutiv belasteten rechten Ventrikel (RV) zu analysieren. Es erfolgte eine Analyse der mRNA-Expression und der Proteindeposition im Gewebe. Außerdem wurden die Serumkonzentrationen spezifischer Spleißvarianten mittels ELISA-Technik bestimmt. Des Weiteren wurden die Effekte des dualen Endothelinrezeptor-Antagonisten Macitentan (MACI) auf das Expressionsverhalten der Moleküle untersucht. Hierfür erfolgte die Einteilung der Tiere in drei Versuchsgruppen: gesunde Kontrolltiere (CON), Ratten mit MCT-induzierter PH (MCT), Ratten mit MCT-induzierter PH und zusätzlicher Macitentan-Behandlung (MCT+MACI).

Die Induktion der PH führte in der MCT-Gruppe zu einer relevanten Erhöhung des systolischen RV-Drucks (RV<sub>sys</sub>) sowie zu einer Abnahme der *Tricuspid annular plane systolic excursion* (TAPSE). Histopathologisch zeigte sich eine ausgeprägte Schädigung des Lungengewebes und des insbesondere rechtsventrikulären Myokards. Dies war assoziiert mit einer differentiell gesteigerten Expression onkofetaler Fn- und Tn-C-Spleißvarianten. Die quantitativen mRNA-Expressionsanalysen ergaben biologisch relevante Alterationen (*Fold change* > 2,5-fach) in der MCT-Gruppe im Vergleich zur CON-Gruppe für ED-A<sup>+</sup> Fn im RV (3,7-fach), für ED-B<sup>+</sup> Fn in der Lunge (2,76-fach) und im RV (7,34-fach), für B<sup>+</sup> Tn-C im RV

(10,75-fach), für C<sup>+</sup> Tn-C im RV (6,87-fach), für D<sup>+</sup> Tn-C im RV (6,79-fach) und für AD1<sup>+</sup> Tn-C im RV (5,53-fach). Nur für ED-B<sup>+</sup> Fn waren die Effekte im RV unter Macitentantherapie reversibel ( $p < 0,05$ ). Es zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen der histopathologisch nachgewiesenen entzündlichen Infiltration und Fibrose im RV und der ED-A<sup>+</sup> Fn-Expression ( $r = 0,653$ ,  $p = 0,002$  für entzündliche Infiltration;  $r = 0,464$ ,  $p = 0,045$  für Fibrose) und der ED-B<sup>+</sup> Fn-Expression ( $r = 0,723$ ,  $p < 0,001$  für entzündliche Infiltration;  $r = 0,530$ ,  $p = 0,019$  für Fibrose). Für die ED-B<sup>+</sup> Fn-Expression im RV konnten Korrelationen zum RVPsys ( $r = 0,473$ ,  $p = 0,047$ ) und der TAPSE ( $r = -0,503$ ,  $p = 0,028$ ) gefunden werden. Eine verstärkte Proteindeposition im Gewebe in der MCT-Gruppe im Vergleich zur CON-Gruppe konnte für ED-A<sup>+</sup> Fn sowohl in der Lunge als auch im RV ( $p < 0,05$ ) und für B<sup>+</sup> Tn-C im RV ( $p < 0,01$ ) aufgezeigt werden. Die Macitentantherapie dezimierte die Proteindepositionen für ED-A<sup>+</sup> Fn in der Lunge und für B<sup>+</sup> Tn-C im RV ( $p < 0,05$ ). Die Untersuchung der Serumspiegel zeigten eine signifikante Zunahme in der MCT-Gruppe im Vergleich zur CON-Gruppe sowohl für ED-A<sup>+</sup> Fn ( $p < 0,01$ ) als auch für B<sup>+</sup> Tn-C ( $p < 0,05$ ).

Das PH-assoziierte Wiederauftreten bestimmter fetaler Varianten von Fn und Tn-C zeigt unterscheidbare Expressionsmuster in pulmonalvaskulären und insbesondere rechtsventrikulären *Remodelling*-Prozessen. Insbesondere die Expression von ED-B<sup>+</sup> Fn im RV mit Korrelation zur hämodynamischen Beeinträchtigung sowie der B<sup>+</sup> Tn-C-Expression mit assoziierter Proteindeposition im RV lässt darauf schließen, dass diese Molekülvarianten an der Pathogenese der Rechtsherzinsuffizienz durch die PH beteiligt sein könnten. Die Effekte werden durch die Behandlung mit dem dualen Endothelinrezeptor-Antagonisten Macitentan teilweise abgeschwächt. Durch die Serumliberation von ED-A<sup>+</sup> Fn und insbesondere von B<sup>+</sup> Tn-C scheinen diese Molekülvarianten als Biomarker mit potentieller diagnostischer und therapeutischer Relevanz bei der PH-assoziierten Rechtsherzbelastung eine Rolle zu spielen. Weitere präklinische und später klinische Studien sind essentiell um die Erkenntnisse an großen Patientenkollektiven zu evaluieren.

# 1. Einleitung

## 1.1 Anatomie und Physiologie des Lungenkreislaufs

Der Lungenkreislauf, auch kleiner Körperkreislauf genannt, beginnt mit den beiden Pulmonalarterien, die dem *Truncus pulmonalis* entspringen und das mit Kohlendioxid angereicherte Blut aus dem rechten Ventrikel in die Lunge leiten. Gemäß der Aufzweigung des Bronchialbaums erfolgt eine Aufteilung in Lappen- und Segmentarterien. Im Kapillarnetz der Lungenalveolen findet der Gasaustausch durch Diffusion statt. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut gelangt, topographisch getrennt von den Arterien und Bronchien, über die *Venae pulmonales* zum linken Vorhof (Aumüller *et al.* 2016). Der Lungenkreislauf ist ein Niederdrucksystem. Der mittlere Druck in der *Arteria pulmonalis* beträgt circa 14 mmHg. Um eine Ruheperfusion von 5-6 Liter pro Minute zu ermöglichen sind sehr kleine Strömungswiderstände notwendig. Bei körperlicher Arbeit kann die Compliance des Gefäßsystems ansteigen und so die Perfusion vervierfacht werden. Der pulmonalarterielle Druck (PAP) nimmt dabei lediglich um den Faktor 2 zu. Die Reduktion des Strömungswiderstandes ist durch eine passive Vasodilatation und Eröffnung von Reservekapillaren möglich. Im Gegensatz dazu führt eine Abnahme des alveolären Sauerstoffpartialdruckes ( $pO_2$ ) zu einer Vasokonstriktion der Arteriolen und damit zu einer Abnahme der Durchblutung. Diese hypoxische Vasokonstriktion wird Euler-Liljestrand-Mechanismus genannt und dient dazu, schlecht ventilerte Areale weniger zu durchbluten und das Blut stattdessen in gut ventilerte Areale zu leiten (Schmidt *et al.* 2011).

## 1.2 Definition der pulmonalen Hypertonie

Die Pulmonale Hypertonie ist definiert als ein Anstieg des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (PAPm) auf größer gleich 25 mmHg in Ruhe (Galie *et al.* 2016). Anlässlich des 6. Weltsymposiums der Pulmonalen Hypertonie 2018 wurde eine Neudefinition ab 20 mmHg diskutiert (Simonneau *et al.* 2019). Die vorliegende Arbeit folgt jedoch der in der aktuellen Leitlinie geltenden Definition ab 25 mmHg. Die Druckmessung erfolgt invasiv mittels Rechtsherzkatheter (RHK). Der normale PAPm beträgt in Ruhe  $14 \pm 3$  mmHg. Die obere Normgrenze beträgt 20,6 mmHg (Galie *et al.* 2016, Kovacs *et al.* 2016). Die Bedeutung eines Anstieges des PAPm im Bereich zwischen 21 und 24 mmHg ist unklar, jedoch mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Heresi *et al.* 2013) und sollte bei Betroffenen überwacht

werden. Der Begriff einer belastungsabhängigen PH wird nicht mehr verwendet. Anhand hämodynamischer Kriterien kann eine präkapilläre PH von einer postkapillären PH unterschieden werden. Liegt ein PAPm  $\geq 25$  mmHg und ein pulmonalarterieller Wedge-Druck (PAWP)  $\leq 15$  mmHg vor spricht man von einer präkapillären PH (Galie *et al.* 2016). Der Wedge-Druck ist der Lungenkapillaren-Verschlussdruck und spiegelt die Druckverhältnisse im linken Vorhof wieder. Der PAWP liegt normwertig zwischen 5 und 12 mmHg (Roewer und Thiel 2010). Liegt eine präkapilläre PH sowie ein pulmonalvaskulärer Widerstand größer 3 Wood-Einheiten ( $\text{dyn} \times \text{sec} \times \text{cm}^{-5}$ ) vor und sind keine anderen Ursachen einer präkapillären PH bekannt, wie eine Lungenerkrankung oder eine chronisch thromboembolische PH, so spricht man von einer pulmonalarteriellen Hypertonie. Die postkapilläre PH entsteht infolge von Linksherzerkrankungen. Dabei steigt der PAWP auf größer 15 mmHg an (Galie *et al.* 2016).

### **1.3 Epidemiologie**

Die genaue Prävalenz der PH ist nicht bekannt (J. D. Rich & Rich, 2014). Schätzungsweise betrifft sie 1% der globalen Bevölkerung (Hoepfer *et al.* 2016b). In England wird über eine Prävalenz von 97 Fällen pro 1 Million Einwohner und einem Frauen- zu Männer-Verhältnis von 1,8 berichtet (Galie *et al.* 2016). Bei Menschen, die älter als 65 Jahre sind, wird die Prävalenz auf 10% geschätzt. Die häufigsten Ursachen der PH sind Linksherz- und Lungenerkrankungen (Hoepfer *et al.* 2016b). Die Angaben zur Inzidenz der PAH schwanken in den verschiedenen europäischen Ländern zwischen 1,1 und 7,6 Menschen pro 1 Million Einwohner pro Jahr, die Prävalenz zwischen 6,6 und 26 pro 1 Million Einwohner. In Deutschland wurden 2014 263 Patienten neu mit PAH diagnostiziert. Die geschätzte Inzidenz liegt bei 3,9 Fälle pro Million. 66% der Patienten waren weiblich mit einem mittleren Erkrankungsalter von 64 Jahren (Hoepfer *et al.* 2016a). Bis jetzt ist kein kurativer Therapieansatz der PAH etabliert. Die Prognose bei einer einjährigen Überlebensrate von 85% und einer 5-Jahres Überlebensrate von 57% als schlecht einzuschätzen (Benza *et al.* 2012).

### **1.4 Klassifikation**

1998 wurde erstmals eine Klassifikation nach klinischen, pathologischen, hämodynamischen und therapeutischen Aspekten in fünf Untergruppen vorgenommen (Simonneau *et al.* 2013, Foshat und Boroumand 2017). Während des 5. Weltsymposiums in Frankreich im Jahr 2013 wurde die Klassifikation aktualisiert (Simonneau *et al.* 2013) und in der 2015 veröffentlichten

Leitlinie modifiziert (*Tabelle 1*). Eine erneute Überarbeitung der Klassifikation erfolgte anlässlich des 6. Weltsymposiums der Pulmonalen Hypertonie 2018 (Simonneau *et al.* 2019).

**Tabelle 1: Klassifikation der pulmonalen Hypertonie. Übersetzt und modifiziert nach (Galie *et al.* 2016).**

<p><b>1. Pulmonalarterielle Hypertonie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>1.1. Idiopathisch</li> <li>1.2. Hereditär <ul style="list-style-type: none"> <li>1.2.1. BMPR2 (<i>bone-morphogenetic-protein-receptor-type-2</i>) Mutation</li> <li>1.2.2. Sonstige Mutationen</li> </ul> </li> <li>1.3. Drogen-/Medikamenteninduziert</li> <li>1.4. Assoziiert mit: <ul style="list-style-type: none"> <li>1.4.1. Bindegewebserkrankungen</li> <li>1.4.2. Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus</li> <li>1.4.3. portale Hypertension</li> <li>1.4.4. angeborene Herzfehler</li> <li>1.4.5. Schistosomiasis</li> </ul> </li> </ul> <p>1` pulmonale veno-okklusive Erkrankungen und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose</p> <p>1''persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen</p>
<p><b>2. Pulmonale Hypertonie infolge von Linksherzerkrankungen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>2.1. linksventrikuläre systolische Dysfunktion</li> <li>2.2. linksventrikuläre diastolische Dysfunktion</li> <li>2.3. Klappenerkrankung</li> <li>2.4. Angeborene Obstruktionen im linken Ausflusstrakt und angeborene Kardiomyopathien</li> <li>2.5. Angeborene Pulmonalvenenstenose</li> </ul>
<p><b>3. Pulmonale Hypertonie infolge Lungenerkrankungen und / oder Hypoxie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>3.1. chronisch obstruktive Lungenerkrankung</li> <li>3.2. Interstitielle Lungenerkrankungen</li> <li>3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiv/obstruktivem Mustern</li> <li>3.4. Schlafbezogene Atemstörung</li> <li>3.5. Alveoläre Hypoventilationssyndrome</li> <li>3.6. Chronischer Aufenthalt in großer Höhe</li> <li>3.7. Fehlentwicklungen der Lunge</li> </ul>
<p><b>4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie und andere Pulmonalarterienobstruktionen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>4.1. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie</li> <li>4.2. Andere Pulmonalarterienobstruktionen <ul style="list-style-type: none"> <li>4.2.1. Angiosarkom</li> <li>4.2.2. Andere intravaskuläre Tumore</li> <li>4.2.3. Arteritis</li> <li>4.2.4. Angeborene Pulmonalarterienstenose</li> <li>4.2.5. Parasiten</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren und / oder multifaktoriellen Mechanismen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>5.1. Hämatologische Erkrankungen: chronisch hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie</li> <li>5.2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose</li> <li>5.3. Metabolische Störungen: Glykogenspeichererkrankungen, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen</li> <li>5.4. Andere: pulmonale tumorbedingte thrombotische Mikroangiopathie, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz, segmentale pulmonale Hypertonie</li> </ul>

## 1.5 Symptome

Die PH verursacht unspezifische Symptome, welche hauptsächlich aus einer fortschreitenden Insuffizienz des rechten Herzens resultieren und im Anfangsstadium typischerweise bei Belastung auftreten. Es kommt zu einer progredienten Dyspnoe, begleitet von Angina pectoris, Müdigkeit und einer körperlichen Schwäche. Weniger häufig treten bei den Patienten Synkopen, ein trockener Husten und Übelkeit auf. Mit der Progression der rechtsventrikulären Dysfunktion kommt es zu klinischen Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz, unter anderem entsteht ein erhöhter Jugularvenendruck, Hepatomegalie, Aszites und periphere Ödeme (Galie *et al.* 2016).

## 1.6 Diagnostik

Die Diagnose der PH erfordert zunächst einen klinischen Verdacht auf der Grundlage von Symptomen. In der körperlichen Untersuchung können Zeichen einer Rechtsherzbelastung identifiziert werden. Das Elektrokardiogramm (EKG) kann differentialdiagnostisch zum Ischämienachweis herangezogen werden, aber auch Zeichen der Rechtsherzbelastung sowie Herzrhythmusstörungen detektieren. In der transthorakalen Echokardiographie (TTE) kann der systolische PAP anhand der Trikuspidalklappen-Regurgitationsgeschwindigkeit geschätzt werden (Galie *et al.* 2016). Die TTE gilt als zuverlässige Methode zur nichtinvasiven Detektion der PH (Greiner *et al.* 2014). Jedoch weisen 10 % der Patienten mit pulmonaler Hypertonie keine Trikuspidalklappeninsuffizienz auf und entgehen damit der Diagnostik durch die TTE. (Held *et al.* 2014). Trotz Fortschritte in den nicht-invasiven Messmethoden (D'Alto *et al.* 2013, Naeije *et al.* 2015) bleibt der Rechtsherzkatheter Goldstandard zur Diagnosesicherung, zur Beurteilung des Schweregrades, zur Prognoseabschätzung und Therapieoptimierung (Galie *et al.* 2016, Pagnamenta *et al.* 2017). Bei der RHK-Untersuchung wird darüber hinaus die Reaktionsfähigkeit der Lungenarterien auf Vasodilatoren getestet. Die weiterführende Diagnostik umfasst die Computertomographie, sowie einen Lungenfunktionstest und die Blutgasanalyse bei Verdacht auf eine Lungenparenchymerkrankung. Mit Hilfe der Ventilations-Perfusionsszintigraphie kann eine chronisch thromboembolische PH diagnostiziert oder ausgeschlossen werden (Galie *et al.* 2016). Trotz moderner Möglichkeiten wird die PH häufig erst Jahre nach Symptombeginn diagnostiziert. Dies führt unter anderem durch eine zu späte Therapieeinleitung zu einer schlechteren Prognose und damit, neben den dramatischen Folgen für den Patienten, zu einer relevanten Belastung des Gesundheitssystems (Studer *et al.* 2017). Daher ist es notwendig,

neuartige Biomarker zur Früherkennung und Prognoseabschätzung zu etablieren (Foris *et al.* 2013, Franz *et al.* 2016).

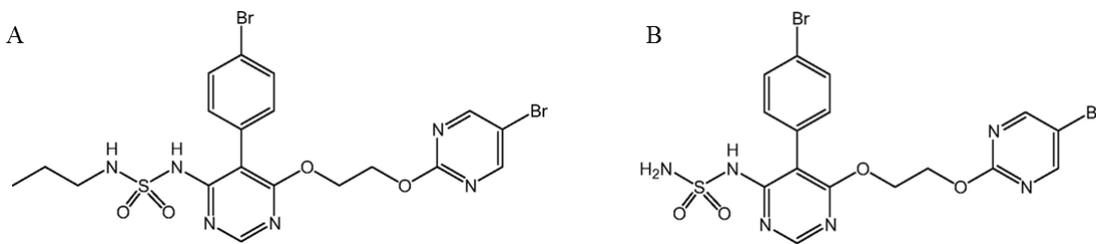
## 1.7 Therapieoptionen

Die allgemeinen Therapiemaßnahmen zielen auf Symptomlinderung ab und umfassen eine Sauerstoff-Langzeittherapie bei manifester Hypoxämie mit einem pO<sub>2</sub> kleiner 60 mmHg sowie eine Diuretikatherapie mittels Schleifendiuretika oder Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten bei Flüssigkeitsretention. Eine orale Antikoagulation ist bei Patienten mit idiopathischer, erblicher oder Appetitzügler-induzierten PAH sowie bei Patienten mit einer chronisch thromboembolischen PH indiziert (Galie *et al.* 2016). Darüber hinaus erhöhen Rehabilitationsmaßnahmen und Physiotherapie die körperliche Belastbarkeit und Lebensqualität von Patienten mit PH (Ehlken *et al.* 2014). Zu den spezifischen Therapieoptionen, die insbesondere für die PAH (Gruppe 1) zur Verfügung stehen, zählen unter anderem Endothelinrezeptor-Antagonisten (ERA), Phosphodiesterase (PDE)-5-Inhibitoren, Prostacyclin-Analoga sowie Stimulatoren der Guanylatcyclase, welche alle das Ziel haben die Vasokonstriktion abzuschwächen beziehungsweise die Vasodilatation zu fördern. Riociguat, ein Stimulator der Guanylatcyclase ist zusätzlich zur Therapie der chronisch thromboembolischen PH (Gruppe 4) zugelassen. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass eine spezifische Behandlung mit Sildenafil bei Patienten mit PH aufgrund einer Linksherzinsuffizienz (Gruppe 2) die klinischen sowie hämodynamischen Parameter verbessert (De Vecchis *et al.* 2017). Die Bedeutung einer initialen Kombinationstherapie aus einem ERA und einem PDE-5-Inhibitor wird in der Behandlung hoch eingestuft. Patienten, die mittels Vasoreagibilitätstestung als „Responder“ identifiziert wurden, werden mit Kalziumkanalblocker, zum Beispiel Amlodipin, behandelt. Dies ist indiziert, wenn der PAPm um mehr als 10 mmHg vom Ausgangswert auf unter 40 mmHg abfällt ohne Abfall des Herzzeitvolumens. Die Therapie mit Kalziumkanalblocker eignet sich nur für Patienten mit idiopathischer, hereditärer oder medikamentenassoziierter PAH (Galie *et al.* 2016). Jedoch profitieren davon nur 10% der Patienten (Sitbon *et al.* 2005). Bei einem unzureichenden Ansprechen der medikamentösen Therapien sollte die Eignung zur Lungentransplantation geprüft werden (Galie *et al.* 2016).

### 1.7.1 Der duale Endothelinrezeptor-Antagonist Macitentan

Endotheline (ET) sind endogene, vasoaktive Peptide. Die Hauptisoform im Herzkreislauf-System ist das ET-1. Die Produktion und Sezernierung erfolgt hauptsächlich durch vaskuläre

Endothelzellen, aber auch durch glatte Muskelzellen und Fibroblasten. Über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> Rezeptoren, löst ET-1 eine sehr potente Vasokonstriktion aus. Darüber hinaus verändert ET-1 die Gewebestruktur, induziert Fibrose, Zellproliferation und Inflammation (Clozel 2016, Iglarz *et al.* 2008). Eine Aktivierung des ET-1 Systems wurde sowohl im Plasma als auch im Lungengewebe von PAH Patienten nachgewiesen (Galie *et al.* 2004). Therapeutisch effektiv ist die Blockade von ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren. Hierfür wurde der duale Endothelinrezeptor-Antagonist Macitentan entwickelt. Macitentan, auch ACT-064992 genannt, und dessen aktiver Metabolit, ACT-132577, sind in Abbildung 1 dargestellt (Iglarz *et al.* 2008).



**Abbildung 1: Strukturformel von Macitentan und ACT-132577 übernommen aus (Iglarz *et al.* 2008)**

**A:** Macitentan (ACT-064992). **B:** Der aktive Metabolit ACT-132577 von Macitentan

Im Jahr 2013 erfolgte die Zulassung durch die Europäische Kommission für Macitentan unter dem Handelsnamen Opsumit (EMA). Die Gabe des Medikaments ist in der aktuellen Leitlinie mit einer Klasse 1 Empfehlung bei der medikamentösen Therapie der PAH versehen (Galie *et al.* 2016). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Macitentan die Morbidität und Mortalität von PAH-Patienten reduziert und deren Leistungsfähigkeit steigert (Pulido *et al.* 2013). Es ist bekannt, dass Macitentan im Rattenmodell der Monocrotalin-induzierten PH die hämodynamischen Parameter, das pulmonalvaskuläre *Remodelling* und die rechtsventrikuläre Funktion verbessert (Iglarz *et al.* 2008, Nadeau *et al.* 2018, Temple *et al.* 2014).

## 1.8 Pathophysiologie

Trotz Unterschieden in der Ätiologie treten bei allen Formen der PH ähnliche pathophysiologische Prozesse auf, die zu einer Erhöhung des pulmonalen Druckes führen. Die Erkrankung führt zu Dysfunktion des Endothels und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen mit nachfolgender Vasokonstriktion, Entzündung, Thrombose und einem *Remodelling* der Lungengefäße. Diese Veränderungen erhöhen den pulmonalen Gefäßwiderstand und damit die Nachlast des rechten Ventrikels, wodurch im Verlauf eine

Insuffizienz des rechten Herzens mit nachfolgender gesteigerter Mortalität auftreten kann (Huber *et al.* 2015, Lan *et al.* 2018, Rohm *et al.* 2019).

### **1.8.1 Vasokonstriktion**

Zu den komplexen Prozessen, die zur Entwicklung einer PH beitragen, gehört eine Dysfunktion der Endothelzellen. Endothelzellen sind für die Produktion von Wachstumsfaktoren und vasoaktiven Mediatoren verantwortlich. Hierbei fördert Endothelin-1 die Vasokonstriktion während Stickstoffmonoxid und Protacyclin eine Vasodilatation induzieren. Das Lungengefäßsystem weist normalerweise, aufgrund dieser Fähigkeit zur Vasodilatation, eine sehr hohe Compliance auf, sodass es trotz Anstieg des Herzzeitvolumens nur zu einem geringen Anstieg des PAP kommt. Bei einem Ungleichgewicht der Mediatoren erhöht sich der Gefäßtonus und der pulmonalvaskuläre Widerstand steigt an (Mandegar *et al.* 2004). Die Vasokonstriktion stellt ein frühes und potentiell reversibles Stadium der Erkrankung dar (Huber *et al.* 2015).

### **1.8.2 Thrombosierung**

Das Endothel hält die physiologische Gerinnungshomöostase durch die geordnete Wechselwirkung verschiedener Faktoren aufrecht. Bei einer Endotheldysfunktion kommt es zur vermehrten Ausschüttung koagulationsfördernder Substanzen, wie Thromboxan A<sub>2</sub>, Serotonin und dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Es resultieren intraluminale Thrombosen die zu Gefäßverengungen führen (Humbert *et al.* 2004, Mandegar *et al.* 2004). Unklar ist, ob die Thrombosen und Thrombozytendysfunktionen die Ursache der PAH oder die Folge bereits bestehender Gewebeschädigung ist (Humbert *et al.* 2004).

### **1.8.3 Pulmonalvaskuläres Remodelling**

Der strukturelle Umbau der pulmonalen Gefäße wird als *Remodelling* bezeichnet und ist gekennzeichnet durch eine unkontrollierte Proliferation, einen veränderten Stoffwechsel und die Resistenz gegenüber Apoptose als geordneten Zelltod. Das *Remodelling* betrifft arterielle und venöse Gefäße und ist charakterisiert durch eine ubiquitäre Aktivierung und Proliferation von Endothelzellen der Intima, glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Fibroblasten der Adventitia. Man geht davon aus, dass Wachstumsfaktoren, Zytokine, Neurotransmitter, Transkriptionsfaktoren und mitogene Faktoren das vaskuläre *Remodelling* fördern. In der Adventitia kommt es, neben der Proliferation von Fibroblasten zur Neusynthese von Matrixproteinen und zur Neovaskularisierung der *Vasa vasorum*. Aktivierte Myofibroblasten und extrazelluläre Matrixproteine gelangen in die Endothelzellschicht und bilden die

sogenannte Neointima (Huber *et al.* 2015). Diese befindet sich zwischen Endothel und der *Lamina elastica interna*, reduziert die Elastizität der Gefäßwand und trägt somit zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes bei (Humbert *et al.* 2004). Als Konsequenz der Endothelzellproliferation entstehen plexiforme Läsionen. Dies sind Ansammlungen von dünnwandig erweiterten Gefäßen in den Lungenarterien und stellen spezifische, histologische Veränderungen der PAH dar (Tuder 2017, Huber *et al.* 2015). Die plexiformen Läsionen produzieren Transkriptions- und Wachstumsfaktoren (VEGF, Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$ ), welche typischerweise bei der Angiogenese beobachtet werden können (Tuder *et al.* 2001, Archer *et al.* 2010). Innerhalb der Media werden glatte Gefäßmuskelzellen aktiviert. Es kommt zu einer distalen Ausdehnung der glatten Gefäßmuskelzellen in normalerweise nichtmuskuläre, präkapilläre Arteriolen. Die glatten Gefäßmuskelzellen transmigrieren zusammen mit den Myofibroblasten aus der Adventitia in Richtung Endothel und damit in das Gefäßlumen (Huber *et al.* 2015). Durch diese Prozesse entsteht eine sogenannte konzentrische Hyperplasie des Endothels. Dies führt im Laufe der Zeit zu einer Gefäßverdickung mit luminaler Okklusion. Der Blutstrom ist stark eingeschränkt und die Fähigkeit zur Vasodilatation vermindert (Jeffery und Morrell 2002).

#### **1.8.4 Cor pulmonale**

Die Funktion des rechten Ventrikels ist bei der pulmonalen Hypertonie von großer klinischer Bedeutung, da sie den Verlauf und die Prognose der Erkrankung bestimmt (Vonk Noordegraaf *et al.* 2019). Durch den erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand steigt die Nachlast des rechten Ventrikels (Nogueira-Ferreira *et al.* 2015). Der rechte Ventrikel hat eine schlechte Toleranz gegenüber einer anhaltenden Druckbelastung. Die Kontraktionskraft nimmt ab und es kann durch myokardiale Umbauprozesse zur Dilation und Fibrosierung kommen. Die erhöhte Wandspannung, welche durch die erhöhte Nachlast entsteht, erhöht den myokardialen Sauerstoffverbrauch und reduziert gleichzeitig die rechtsventrikuläre Perfusion. Dies führt wiederum zu einer reduzierten Kontraktilität. Neurohormonale Signale, reaktive Sauerstoffspezies sowie Entzündungsreaktionen können die Entwicklung eines Rechtsherzversagens weiter beschleunigen (Bogaard *et al.* 2009). Die rechtsventrikuläre Dysfunktion durch die pulmonale Hypertonie ist prognoseentscheidend (Ryan und Archer 2014). Das Herz produziert als Reaktion auf eine erhöhte mechanische Belastung und Wanddehnung das B-natriuretische Peptid (BNP). Dies fördert die Diurese und Natriurese, hemmt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und schützt das Herz so vor weiterer Belastung. Sowohl das BNP als auch das N-terminale Fragment von Pro-BNP (NT-

proBNP), welche beide aus dem proBNP abgespalten werden, dienen als Biomarker der Herzfunktionsstörung (Vuolteenaho *et al.* 2005). Das NT-pro-BNP zeigt eine starke Korrelation zum PAPm (Kolditz *et al.* 2015). Die Behandlung ist die der systemischen hypertensiven Herzerkrankung mittels Hemmung des RAAS-Systems, der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren und der Calciumkanäle. Es gibt keine optimale pharmakologische Therapie gegen die PH-assoziierte rechtsventrikuläre Hypertrophie und –insuffizienz (Imoto *et al.* 2017).

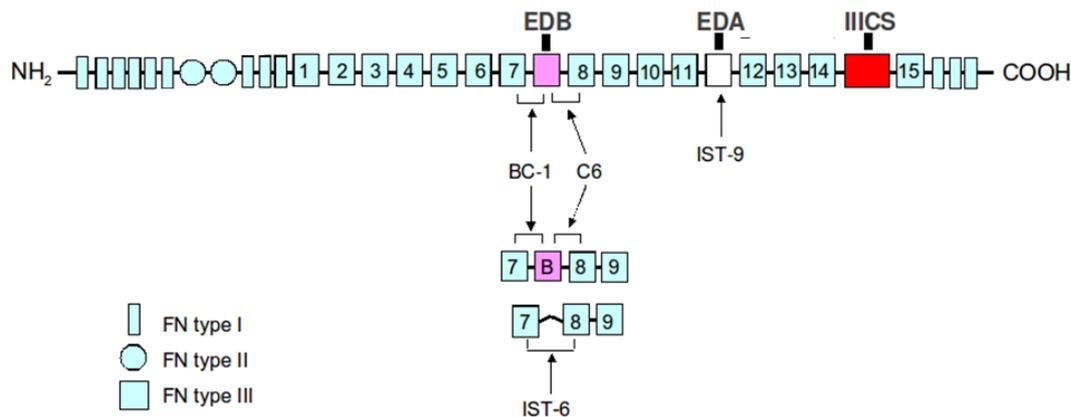
## 1.9 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist eine nicht-zelluläre, dynamische Struktur und essentiell für die Aufrechterhaltung der Form, Stabilität und Struktur der Gewebe. Bestandteile sind Kollagene, Glykosaminoglykane, Elastin, Laminine und andere Glykoproteine. Die ECM interagiert über Zelloberflächenrezeptoren mit den eingebetteten Zellen, um so die Proliferation, Migration, Apoptose und Differenzierung der Zellen zu regulieren. Eine dysregulierte Struktur und Funktion der ECM ist mit der Entwicklung und Progression verschiedener Krankheiten verbunden (Theocharis *et al.* 2016, Bonnans *et al.* 2014, Bowers *et al.* 2010). Die zelladhäsionsmodulierenden Moleküle Fibronectin und Tenascin-C beeinflussen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und spielen eine wichtige Rolle für das Zellwachstum, die Adhäsion, Migration und Proliferation (Imanaka-Yoshida *et al.* 2004, Farhadian *et al.* 1995). Onkofetale Spleißvarianten beider Moleküle werden während der Herzentwicklung exprimiert. In der gesunden adulten kardialen Matrix sind diese Molekülvarianten nahezu nicht nachweisbar. Im Rahmen des pathologischen *Remodellings* kommt es zu einer Reexpression dieser onkofetalen Varianten mit auffälliger extrazellulärer Deposition im Gewebe (Gabler *et al.* 1996, Morimoto *et al.* 2005, Golledge *et al.* 2011, Astrof und Hynes 2009).

### 1.9.1 Fibronectin

Fibronectin ist ein dimeres Glykoprotein der ECM und besitzt Bindungsstellen für Kollagen, Heparin und Fibrinogen. Fibronectin interagiert mit den umliegenden Zellen über Integrine und andere Rezeptoren und reguliert die Zelladhäsion, -migration und -differenzierung (Schwarzbauer, Singh *et al.* 2010, Schwarzbauer 1991b). Ein Monomer besteht aus drei unterschiedlichen, sich wiederholenden Bausteinen, die als Typ I, II oder III bezeichnet werden (Schwarzbauer 1991b). Die Fn-Dimere, verbunden durch Disulfidbrücken, werden von verschiedenen Zellen, wie Fibroblasten, Endothelzellen, Chondrozyten und Myozyten sezerniert (To und Midwood 2011). Durch Spleißen der prä-mRNA entstehen bis zu 20

verschiedene Molekülvarianten beim Menschen (White *et al.* 2008). Die hier insbesondere interessierenden alternativen Spleißvarianten von Fibronectin, welche die Extradomäne A (ED-A) und die Extradomäne B (ED-B) enthalten, entstehen innerhalb der sogenannten Typ-III-*Repeats* und sind in Abbildung 2 dargestellt (Schwarzbauer 1991b, White *et al.* 2008, Schwarzbauer 1991a).



**Abbildung 2: Aufbau von Fibronectin adaptiert nach (Biotech 2018)**

Dargestellt ist die Struktur von Fibronectin mit der EDB-Domäne zwischen dem 7. und 8. Fn Typ III-*Repeat* sowie die Bindungsstellen der Antikörper BC-1, C6, IST-6 und IST-9.

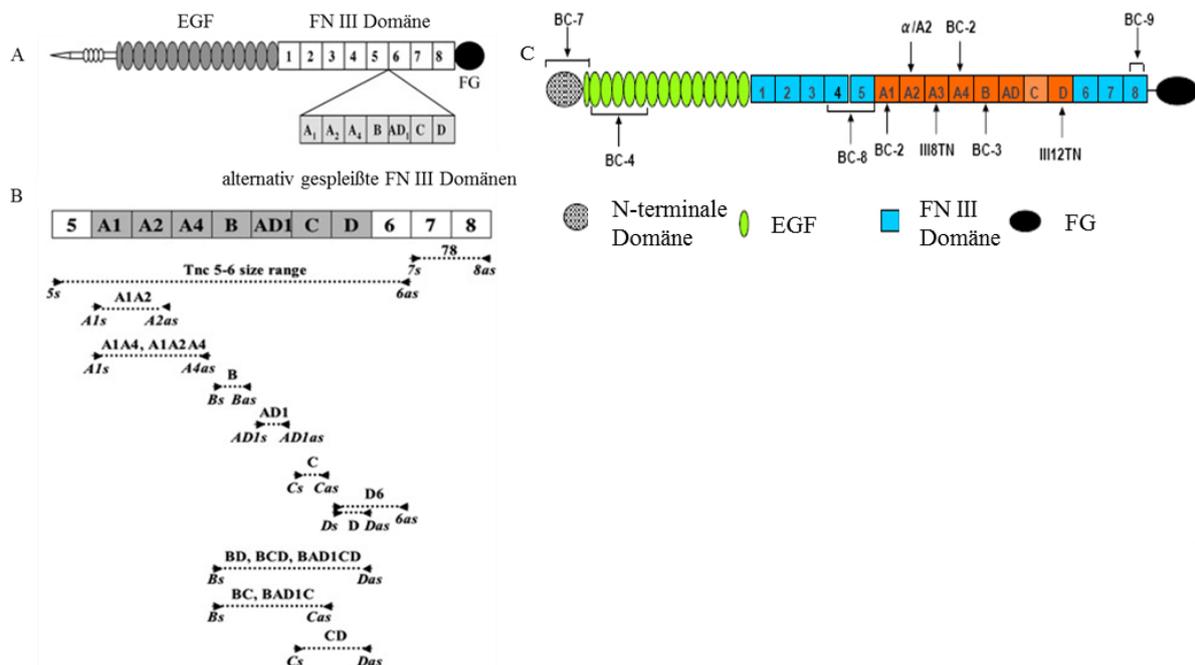
Verwendete Abkürzungen: Fn: Fibronectin

Man unterscheidet zwischen zellulärem Fibronectin und Plasmafibronectin. Letzteres wird in der Leber synthetisiert und enthält keine Extradomänen A oder B (Pankov und Yamada 2002). Varianten mit Inklusion von ED-A<sup>+</sup> Fn und ED-B<sup>+</sup> Fn sind im embryonalen Gewebe höher (White *et al.* 2008, Peters und Hynes 1996). Fibronectin spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Wirbeltieren. Eine Inaktivierung des Fibronectin-Gens hat letale Auswirkungen in der frühen Embryogenese von Mäusen (George, Georges-Labouesse, Patel-King, Rayburn, & Hynes, 1993). Die Abwesenheit von ED-A und ED-B Exons führt bei Mäusen zu verschiedenen embryonalen kardiovaskulären Defekten (Astrof *et al.* 2007). Im adulten Gewebe kommen die Spleißvarianten nahezu nicht vor, können aber im Rahmen von pathologischen Umbauprozessen, wie Neoplasien oder chronischen Entzündungsprozessen, reexprimiert werden und werden daher als onkofetale Varianten bezeichnet (Schwarzbauer 1991b). Bei gesunden Erwachsenen gibt es wenig oder keine nachweisbare Expression von ED-A<sup>+</sup> Fn und ED-B<sup>+</sup> Fn im ruhenden Gefäßsystem. Unter pathologischen Zuständen, einschließlich des vaskulären *Remodellings* und im Rahmen von Fibrosierung und Angiogenese kommt es zur Expressionssteigerung (Astrof *et al.* 2007, Astrof und Hynes

2009, Petrini *et al.* 2017). ED-A<sup>+</sup> Fn ist beteiligt an der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und an der Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen in der Tunica media (Astrof und Hynes 2009, Booth *et al.* 2012, Franz *et al.* 2016, Franz *et al.* 2012, Glukhova *et al.* 1989). Während der Angiogenese exprimieren Fibroblasten und Endothelzellen ED-B<sup>+</sup> Fn (Petrini *et al.* 2017).

## 1.9.2 Tenascin-C

Tenascin-C ist als zelluläres Adhäsionsprotein ebenfalls integraler Bestandteil der ECM. Es besteht aus sechs ähnlichen Untereinheiten, welche über Disulfidbrücken am N-terminalen Ende zum sogenannten Hexabrachion verknüpft sind (Erickson und Inglesias 1984, Borsi *et al.* 1995, Erickson und Bourdon 1989). Jede Untereinheit besteht aus drei Strukturen: einer repetitorischen Sequenz des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), mehreren Fibronektin Typ-III-*Repeats* sowie einer globulären Domäne aus Teilen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette des Fibrinogens. Tn-C wird durch ein einziges Gen codiert. Die unterschiedlichen Tn-C-Varianten entstehen durch alternatives Spleißen zwischen der 5. und 6. Domäne der Fibronektin-Typ-III *Repeats* (**Abbildung 3**). Somit können durch alternativen Ein- oder Ausschluss der Domänen A1-D eine Vielzahl von Molekülvarianten generiert werden (Borsi *et al.* 1995, Chiquet-Ehrismann und Chiquet 2003).



**Abbildung 3: Aufbau von Tenascin-C adaptiert nach (Dobbertin *et al.* 2010) und (Biotech 2018)**

**A:** Schematische Darstellung des Tn-C Monomers. Zwischen der 5. und 6. Domäne der konstanten Fn-Typ-III-*Repeats* entstehen durch Insertion von alternativ gespleißten FNIII-Domänen größere

Isoformen von Tn-C. **B:** Darstellung der Primerpaare, welche spezifische Spleißvarianten flankieren. **C:** Darstellung der Antikörper, welche im Bereich der Spleißvarianten binden.

Verwendete Abkürzungen: EGF: epidermaler Wachstumsfaktor, Fn: Fibronectin, FG: globuläre Domäne aus Teilen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette des Fibrinogens, Tn: Tenascin

Durch die Insertion von alternativ gespleißten Fn-Typ-III-*Repeats* entstehen Tn-C-Isoformen mit höherem Molekulargewicht (Dobbertin *et al.* 2010). Diese sind für die Entwicklung des Myokards, der Herzklappen und der Herzkranzgefäße im Frühstadium der Embryogenese entscheidend, im gesunden adulten Myokard jedoch kaum nachweisbar (Franz *et al.* 2009, Imanaka-Yoshida *et al.* 2003). Als Reaktion auf verschiedene pathophysiologische Stimuli kommt es im Rahmen des kardiovaskulären *Remodellings* zur Reexpression (Jones und Jones 2000, Golledge *et al.* 2011, Franz *et al.* 2010, Tamaoki *et al.* 2005, Imanaka-Yoshida *et al.* 2001, Franz *et al.* 2015a). Es konnte gezeigt werden, dass das *Remodelling* durch Induktion von Matrix-Metalloproteinasen, die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Ihida-Stansbury *et al.* 2006) und die Aktivierung, Migration und Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten gefördert wird (Imanaka-Yoshida *et al.* 2004, Imanaka-Yoshida *et al.* 2003, Tamaoki *et al.* 2005). Das krankheitsassoziierte Wiederauftreten von Tn-C-Varianten konnte bei einer Reihe verschiedener kardialer Erkrankungen nachgewiesen werden, darunter im Serum von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (Terasaki *et al.* 2007) und nach Myokardinfarkt (Sato *et al.* 2006). Das myokardiale *Remodelling* geht mit erhöhten Serumwerten von B<sup>+</sup> Tn-C und C<sup>+</sup> Tn-C bei Patienten mit arterieller Hypertonie sowie nach einem Myokardinfarkt einher (Franz *et al.* 2009). Die fetale Spleißvariante A1<sup>+</sup> Tn-C konnte im rechten Vorhofohr bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung detektiert werden (Franz *et al.* 2010). Rohm *et al.* wiesen erhöhte Serumwerte der Spleißvarianten B<sup>+</sup> Tn-C und C<sup>+</sup> Tn-C bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie nach (Rohm *et al.* 2017).

### **1.9.3 Humane rekombinante Antikörper mit Spezifität gegen Fibronectin- und Tenascin-C-Spleißvarianten**

Da die fetalen Varianten von Fibronectin und Tenascin-C stabil extrazellulär deponiert werden stellen sie exzellente Zielstrukturen für antikörperbasierte Diagnose- und Therapiestrategien dar. So können an diese Antikörper diagnostische Agenzien (zum Beispiel Radionuklide) oder therapeutisch wirksame Substanzen (zum Beispiel Zytokine) gekoppelt werden. Da die genannten Fn- beziehungsweise Tn-C-Spleißvarianten nur im pathologischen Gewebe exprimiert werden und im gesunden Gewebe nahezu nicht vorkommen, gelangen die diagnostischen oder therapeutischen Agenzien auch nur gezielt an den Ort des pathologischen

*Remodellings*. Somit wird das Problem der unerwünschten Nebenwirkungen in gesunden Gewebestrukturen minimiert (Bootz und Neri 2016, Franz *et al.* 2015b).

## **1.10 Das Tiermodell der Monocrotalin-induzierten Pulmonalen Hypertonie**

Die pulmonale Hypertonie zeichnet sich durch einen erhöhten pulmonalen Widerstand, entzündliche Zellinfiltrate, vaskuläres *Remodelling* und die Okklusion von Gefäßen mit konsekutiver Entwicklung einer Rechts Herzinsuffizienz aus. Um die Komplexität besser zu verstehen und neue therapeutische Strategien zu entwickeln sind viele präklinische Tiermodelle entstanden (Nogueira-Ferreira *et al.* 2015). Neben Modellen der Hypoxie-induzierten PH ist auch das Modell der Monocrotalin-induzierten PH wissenschaftlich gut etabliert und wird häufig eingesetzt (Campian *et al.* 2006, Stenmark *et al.* 2009). Es bietet den Vorteil, dass es mehrere pathophysiologische und histopathologische Aspekte der humanen PAH gut imitiert, einschließlich des vaskulären *Remodellings*, der endothelialen Dysfunktion (Hoorn *et al.* 1993), der Induktion entzündlicher Zytokine und das Rechts Herzversagen (Nogueira-Ferreira *et al.* 2015). Monocrotalin ist ein giftiges Pyrrolizidin-Alkaloid und stammt aus den Samen der Pflanze *Crotalaria spectabilis* (Chesney und Allen 1973, Meyrick *et al.* 1980). Das MCT-Alkaloid erlangt seine Toxizität durch Metabolisierung in der Leber zu Dehydromonocrotalin oder Monocrotalinpyrol. Die Reaktion ist stark abhängig von Cytochrom P450, speziell von dem Isoenzym 3A (Gomez-Arroyo *et al.* 2012). Die Toxizität von MCT ist im Wesentlichen hepatisch und kardiopulmonal und betrifft sowohl Tiere als auch Menschen (Nogueira-Ferreira *et al.* 2015). 1961 beschrieben Merkow und Lalich erstmals eine Entzündung in den Pulmonalarterien von Ratten nach Fütterung der Samen von *Crotalaria spectabilis* (Lalich und Merkow 1961). Eine einzige Injektion von üblicherweise 60 mg pro Kilogramm Körpergewicht (KG) MCT, intraperitoneal oder subkutan injiziert, führt nach drei bis vier Wochen zur Entwicklung einer PH. Der aktive Metabolit Monocrotalinpyrol hat in wässrigen Lösungen wie Plasma nur eine Halbwertszeit von drei bis vier Sekunden, jedoch kommt es in Erythrozyten zu einer Akkumulation. Dies erklärt die Interaktion mit dem Lungengewebe auch noch Wochen nach Exposition (Nogueira-Ferreira *et al.* 2015). Im zeitlichen Verlauf werden innerhalb von Stunden Anzeichen einer pulmonalen vaskulären Endothelschädigung deutlich. Nach einer Woche kommt es zu einer Zunahme der endothelialen Schädigung, zu entzündlichen Infiltraten und einer ödematösen Verdickung des Lungengewebes. Es kommt zur Muskularisierung von Arterien in normalerweise nicht muskularisierten Abschnitten. Nach zwei Wochen steigt der PAP an. In der dritten Woche

kann eine rechtsventrikuläre Hypertrophie beobachtet werden. Die Veränderungen nehmen bis zu Tag 35 zu, nach fünf bis sechs Wochen beträgt die Mortalität der induzierten Ratten nahezu 50 % (Meyrick *et al.* 1980, Nogueira-Ferreira *et al.* 2015).

## 1.11 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ausgewählte fetale Spleißvarianten von Fibronectin und Tenascin-C hinsichtlich ihrer Reexpression im Myokard und in der Lunge im Tiermodell der Monocortalin-induzierten Pulmonalen Hypertonie zu untersuchen. Der Schwerpunkt liegt in der vergleichenden Analyse zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel und der Lunge. Hierbei gilt es, folgende Versuchsgruppen zu vergleichen: gesunde Kontrolltiere (CON), Ratten mit MCT-induzierter PH (MCT), Ratten mit MCT-induzierter PH, welche zusätzlich Macitentan als spezifische Therapie erhielten (MCT+MACI).

Um dies zu erreichen, werden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- 1) Mit Hilfe der quantitativen *real-time* Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) soll eine Genexpressionsanalyse spezifischer Spleißvarianten (ED-A<sup>+</sup> Fn, ED-B<sup>+</sup> Fn, B<sup>+</sup> Tn-C, C<sup>+</sup> Tn-C, D<sup>+</sup> Tn-C und AD1<sup>+</sup> Tn-C) im Myokard (rechter Ventrikel (RV) und linker Ventrikel (LV)) und in der Lunge durchgeführt werden.
- 2) Mit spezifischen Antikörpern gegen ED-A<sup>+</sup> Fn und B<sup>+</sup> Tn-C soll eine Immunfluoreszenzdetektion in Gewebeschnitten (RV, LV, Lunge) stattfinden. Weitere, bislang nicht im murinen System etablierte, Antikörper gegen ED-B<sup>+</sup> Fn, D<sup>+</sup> Tn-C und A1/A4<sup>+</sup> Tn-C sollen getestet werden.
- 3) Die Serumkonzentration von ED-A<sup>+</sup> Fn, B<sup>+</sup> Tn-C und C<sup>+</sup> Tn-C, basierend auf Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe, sollen mittels ELISA-Technik bestimmt werden.
- 4) Der Zusammenhang zu hämodynamischen und histopathologischen Befunden sowie die Frage nach potentiellen Biomarkern und therapeutischen Optionen soll beobachtet und diskutiert werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere waren männliche, 10-12 Wochen alte, circa 300 Gramm schwere Sprague-Dawley-Ratten aus der Zucht von Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Die Ratten wurden nach Ankunft einer Akklimatisierungsphase mit kontrolliertem Tag-/Nachtrhythmus und konstanter Temperatur zugeführt. Während der gesamten Studienlaufzeit bestand uneingeschränkter Zugang zu Futter und Trinkwasser und eine Versorgung durch erfahrenes Personal war kontinuierlich gewährleistet. Die Genehmigung des Tierversuchs erfolgte regelkonform durch das zuständige Landesamt für Verbraucherschutz Thüringen (TLV, Bad Langensalza, Deutschland, lokale Registrationsnummer: 02-004/14). Die Experimente wurden nach den Richtlinien der Labortierhaltung (*National Research Council Committee for the Update of the Guide for the and Use of Laboratory* 2011), der aktuellen Version des Deutschen Gesetzes für Tierschutz und der Richtlinien für Tierhaltung durchgeführt.

#### 2.1.2 Antikörper

**Tabelle 2: Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz**

Antikörper	Spezies	Herstellerfirma	Verdünnung und Inkubation
IST-9 (ED-A <sup>+</sup> Fn)	Maus (mk)	Santa Cruz <i>Biotechnology</i> , Inc., Texas, USA	Myokard: 1:150, 1,5 Stunden bei Raumtemperatur Lunge: 1:20, 4°C über Nacht
C6 (ED-B <sup>+</sup> Fn)	Maus (mk)	Sirius Biotech, Genoa, Italien	1:150, 4°C über Nacht
BC1 (ED-B <sup>+</sup> Fn)	Maus (mk)	Sirius Biotech, Genoa, Italien	1:150, 4°C über Nacht
4C8MS (B <sup>+</sup> Tn-C)	Maus (mk)	IBL-International GmbH, Hamburg, Deutschland	1:20, 4°C über Nacht
III12TN (D <sup>+</sup> Tn-C)	Maus (mk)	Sirius Biotech, Genoa, Italien	1:150, 4°C über Nacht
BC-2 (A1/A4 <sup>+</sup> Tn-C)	Maus (mk)	Sirius Biotech, Genoa, Italien	1:50, 4°C über Nacht

Verwendete Abkürzungen: Fn: Fibronectin, mk: monoklonal, Tn-C: Tenascin-C

**Tabelle 3: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz**

Antikörper	Herstellerfirma	Verdünnung
AffiniPure Esel anti-Maus, Cy3-konjugiert	Jackson <i>Immunoresearch Laboratories</i> , Inc., Pennsylvania, USA	1:400

Antikörper	Herstellerfirma	Verdünnung
AffiniPure Esel-anti-Maus-Biotin	Jackson <i>Immunoresearch Laboratories, Inc.</i> , Pennsylvania, USA	1:200
Streptavidin, Cy3-konjugiert	SouthernBiotech, Birmingham, USA	1:200

Verwendete Abkürzungen: Cy3: Cyanin

**Tabelle 4: Antikörper und Enzyme für ELISA**

Antikörper	Herstellerfirma	Verdünnung ELISA
IST-9 (ED-A <sup>+</sup> Fn)	Santa Cruz <i>Biotechnology, Inc.</i> , Texas, USA	1:200
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase	Jackson <i>Immunoresearch Laboratories, Inc.</i> , Pennsylvania, USA	1:330
AffiniPure Esel-anti-Maus-Biotin	Jackson <i>Immunoresearch Laboratories, Inc.</i> , Pennsylvania, USA	1:10.000

Verwendete Abkürzungen: Fn: Fibronectin

### 2.1.3 Primer

**Tabelle 5: Primer für die qRT-PCR**

Gen	Nukleotidsequenz	Annealing-Temperatur	
Rat ED-A <sup>+</sup> Fn	F: 5'-ACT GCA GTG ACC AAC ATT GAC C-3'	56°C	
	R: 5'-CAC CCT GTA CCT GGA AAC TTG C-3'		
Rat ED-B <sup>+</sup> Fn	F: 5'-AGT TAG TTG CGG CAG GAG AAG-3'	54 °C	(Xu <i>et al.</i> 2008)
	R: 5'-CCG CCA TTA ATG AGA GTG AT-3'		
Rat LDH 2	F: 5'-TTAAGGAAGAACAGGTCCCCCA-3'	56 °C	
	R: 5'-GCTCATCAGCCAAGTCCTTCAT-3'		
Rat B <sup>+</sup> Tn-C	F: 5'-GCC AGA GAA CCT GAA ATT GG -3'	55 °C	(Dobbertin <i>et al.</i> 2010)
	R: 5'-TGT GGT AGC CGT GGT ACT G -3'		
Rat C <sup>+</sup> Tn-C	F: 5'-GAG GCC TTG CCC CTT CTG G-3'	62°C	(Dobbertin <i>et al.</i> 2010)
	R: 5'-GGT TCC TGA AAG TGT GAA TTC C-3'		
Rat D <sup>+</sup> Tn-C	F: 5'- GAA GCT GAA CCG GAA GTT G-3'	56°C	(Dobbertin <i>et al.</i> 2010)
	R: 5'-TGT TGT TGC TAT GGC ACT G-3'		
Rat AD1 <sup>+</sup> Tn-C	F: 5'-GTT GGG CAT GCT AAT CTT TAG C-3'	61°C	(Dobbertin <i>et al.</i> 2010)
	R: 5'-ACC AAG CCT GTG ATG TGA GCT T-3'		

Verwendete Abkürzungen: Fn: Fibronectin, LDH: Laktatdehydrogenase, Tn-C: Tenascin-C

## 2.1.4 Kits und Assays

**Tabelle 6: Kits**

Name	Herstellerfirma
<i>Agilent RNA Screen Tape System</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
<i>D1000 Sample Buffer</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
<i>D1000 Screen Tape</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
<i>Dako-Biotin-Blocking-System</i>	Dako, Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>gDNA Removal Kit</i>	Jena Biosciences, Jena, Deutschland
<i>Human Tenascin-C Large (FNIII-C) Assay Kit</i>	IBL-International GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>Maxwell®16 LEV simplyRNA Tissue Kit</i>	SABiosciences, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<i>RNA Screen Tape Sample Buffer</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
<i>SensiFAST SYBR No-ROX One-Step-Kit</i>	Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany
<i>Tenascin-C Large (FNIII-B) Assay Kit</i>	IBL-International GmbH, Hamburg, Deutschland

Verwendete Abkürzungen: DNA: Desoxyribonukleinsäure, Fn: Fibronectin, RNA: Ribonukleinsäure

## 2.1.5 Reagenzien und Chemikalien

**Tabelle 7: Reagenzien und Chemikalien**

Reagenz/Chemikalie	Herstellerfirma
Aceton	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Ampuwa® Water</i>	Fresenius Kabi, Deutschland GmbH, Bad Homburg
Antikörperverdünnungslösung mit Hintergrund-reduzierenden Komponenten	Dako, Deutschland GmbH
Baytril (2,5 % Enrofloxacin)	WDT, Garbsen, Germany
DAKO Pen	DAKO Denmark, Glostrup, Dänemark
Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ )	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Eisen (III)-chlorid ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Forene (Isofluran-CP, 2,5 V%, FiO <sub>2</sub> 1.0, O <sub>2</sub> pro Inhalationsflussdosis)	Abbvie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Formalin, gepuffert (3,5%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCL)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

<b>Reagenz/Chemikalie</b>	<b>Herstellerfirma</b>
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Macitentan	Actelion Pharma Schweiz AG, Baden, Schweiz
Methanol	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Monocrotalin (C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Stickstoff (N <sub>2</sub> , flüssig)	Linde AG, München, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Nagellack, klar	Essence, Frankfurt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland/
Pertex	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Roti® - <i>Liquid Barrier Marker</i>	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure (0,5Mol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Tissue-Tek</i> Einbettmedium	Sakura Finetek USA Inc, Torrance, USA
TMB <i>One</i>	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dänemark
Trizma® Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trizma® Base	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>VECTASHIELD</i> Eindeckmedium mit DAPI	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylazin (2%)	Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland
Xylol	Vector Laboratories, Burlingame, USA

## 2.1.6 Puffer und Lösungen

**Tabelle 8: Puffer und Lösungen**

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Eisenhämatoxylin-Lösung	Lösung A: 1 g Hämatoxylin 100 ml 96 % Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)  Lösung B:

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
	2,48 g Eisen (III)-chlorid ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) 100 ml destilliertes Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 1 ml konzentrierte Salzsäure (HCl) Die Arbeitslösung besteht aus Lösung A und B im Verhältnis 1:1.
TBS	2,25 g Trizma <sup>®</sup> Base 17,125 g Trizma <sup>®</sup> Hydrochlorid 21,95 g Natriumchlorid (NaCl) 2,5 l destilliertes Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ )
TBS-Tween (0,001%)	2,5 l TBS 2,5 ml Tween
PBS	80 g Salzsäure (NaCl) 11,1 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 2g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2g Kaliumchlorid (KCL) 1 l destilliertes Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ )

Verwendete Abkürzungen: TBS: trisgepufferte Salzlösung, PBS: phosphatgepufferte Salzlösung

## 2.1.7 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Softwares

**Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
96 Well ELISA Microplate, PS, Microlon	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen 24 x 50 mm; 24 x 60 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
<i>Loading Tips</i>	Agilent Technologies, Waldbraun, Deutschland
Pasteurpipetten (3 ml)	Brand GmBh + Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Brand GmBh + Co KG
Pistills	Brand GmbH + Co KG
Polysine-beschichtete Objektträger	Gerhard Menzel GmbH
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serum-Monovetten (Lithium-Heparin; 4ml)	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Sicherheitskanülen	Sarstedt AG und Co.
Superfrost-Plus Objektträger	Gerhard Menzel GmbH

**Tabelle 10: Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
1.4F <i>micro conductance pressure-volume</i> Katheter, Model SPR-839	Millar Instruments Inc., Powerlab system, ADInstruments Ltd., Oxford, UK
Agilent 2200 <i>Tape Station</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Axioplan 2 <i>Imaging</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axio <i>Imager A2</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Eppendorf-Pipetten (2,5µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
HM 340 E Rotationsmikrotom	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Konfokales Laserscanningmikroskop cLSM, LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Leica CM3050S Kryostat	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
Maxwell16 Instrument	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
ND-1000 Spektrophotometer, NanoDrop	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
RNA <i>Screen Tape System</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
<i>Rotor-Gene Q Cyclor</i>	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Tecan Infinite Pro Microplate Reader</i>	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
Vevo 770 <i>Rodent-Ultrasound-System</i> , 17MHz probe RMV176	Visual Sonic, Toronto, Kanada
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

Verwendete Abkürzungen: RNA: Ribonukleinsäure

**Tabelle 11: Verwendete Softwares**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Agilent RNA <i>Screen Tape System</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
LSM 510 Software Rel. 3.2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Magellan 5 Software	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond USA
ND 1000.3.8.1	Peqlab Biotechnologie GmbH
PowerLab System	ADInstruments Ltd., Oxford, UK
Rotor-Gene Q Series Software 2.0	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SPSS	IBM Deutschland GmbH

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
ZEN 2.3	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Verwendete Abkürzungen: RNA: Ribonukleinsäure

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Tiermodell der Monocrotalin-induzierten Pulmonalen Hypertonie**

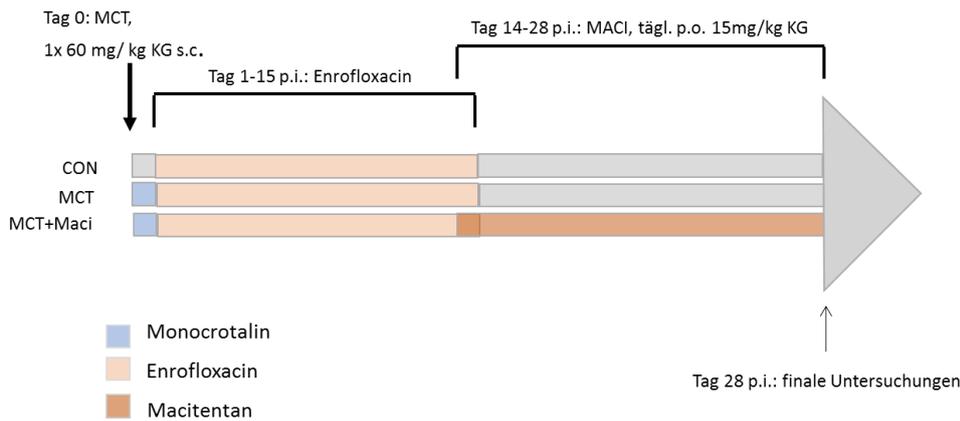
#### **2.2.1.1 Versuchsgruppen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 26 Tiere verwendet:

- Gesunde Kontrolltiere (CON, n = 6)
- Ratten mit MCT-induzierter PH (MCT, n = 10)
- Ratten mit MCT-induzierter PH und zusätzlicher Macitentan-Behandlung (MCT+MACI, n = 10)

#### **2.2.1.1 Induktion der pulmonalen Hypertonie durch Monocrotalin**

Eine zusammenfassende Übersicht des Studienprotokolls ist in Abbildung 4 grafisch dargestellt. Die Induktion der PH erfolgte zu Versuchsbeginn durch die einmalige Gabe von Monocrotalin (MCT; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in einer Dosierung von 60 mg pro kg Körpergewicht in maximal 10 ml/kg KG in der MCT- sowie in der MCT+MACI-Gruppe. Zur Herstellung der Injektionslösung wurde 250 mg Monocrotalin mit 3 ml 1N HCl (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Um die Injektionslösung auf einen pH von 7,4 einzustellen, wurden 2 ml 1 N NaOH (Sigma Aldrich) hinzugefügt und die Lösung steril filtriert. Pro Tier wurde ein Gesamtvolumen von 300 µl injiziert. Die Ratten der Kontrollgruppe erhielten eine sterile, 300 µl NaCl-Injektionen (tierärztliche Hausapotheke).



**Abbildung 4: Studienprotokoll des Tiermodells der MCT-induzierten PH in der Ratte**

Es erfolgte eine einmalige subkutane Injektion von 60 mg/kg KG Monocrotalin in der MCT- und MCT+MACI-Gruppe zur Induktion der PH an Tag 0, eine antibiotische Behandlung mit 2,5% Enrofloxacin von Tag 1 bis 15 *p.i.* in allen drei Versuchsgruppen, von Tag 14 bis 28 *p.i.*, therapeutische Behandlung der MCT+MACI-Gruppe mit 15 mg/kg KG Macitentan *p.o.*, finale Untersuchungen an Tag 28 *p.i.*

Verwendete Abkürzungen: KG: Körpergewicht, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, *p.i.*: *post inductionem*, *p.o.*: *per os*, *s.c.*: *sub cutan*

### 2.2.1.2 Behandlung mit Macitentan

Die MCT+MACI-Gruppe erhielt von Tag 14 bis Tag 28 Macitentan *per os* in einer Dosierung von 15 mg/kg KG in maximal 10 ml/kg KG.

### 2.2.1.3 Antibiotische Behandlung und Gesundheitskontrolle

Zur Vermeidung von opportunistischen Begleitinfektionen und inflammatorischen Lungenveränderungen erhielten alle Ratten von Tag 1 bis Tag 14 *p.i.* 2,5% Enrofloxacin (Baytril, WDT, Germany) über das Trinkwasser. Der Induktionsverlauf wurde engmaschig kontrolliert, das Körpergewicht der Tiere wurde zweimal wöchentlich ermittelt und der Gesundheitszustand durch einen *Score* geschätzt. Der *Clinical Severity Score* (klinischer Schweregrad *Score*, CSS) bewertet die Körperhaltung, die Reaktion auf exogene Stimuli und die spontane Aktivität von 1-5 (**Tabelle 12**).

**Tabelle 12: Clinical Severity Score (CSS) des Gesundheitszustands**

Grad	Qualität	Spontane Aktivität	Reaktion auf exogene Stimuli	Körperhaltung
1	Keine Krankheitsanzeichen	aktiv, stark	neugierig, schnelle Bewegungen	normal
2	geringer Grad	weniger aktiv mit gelegentlichen Bewegungsunterbrechungen	reduzierte Aufmerksamkeit aber adäquate	leicht gekrümmt

Grad	Qualität	Spontane Aktivität	Reaktion auf exogene Stimuli	Körperhaltung
			Reaktion	
3	mittlerer Grad	langsam, schläfrig, Bewegungsschwierigkeiten	eingeschränkt und verzögert	gekrümmt
4	hoher Grad	lethargisch, regungslos, keine Bewegung	keine	stark gekrümmt
5	Tot			

#### 2.2.1.4 Hämodynamische Messungen

Sowohl invasive als auch nicht-invasive Untersuchungen wurden am Ende der Versuchslaufzeit an den Ratten durchgeführt.

##### *Transthorakale Echokardiographie*

Jede Ratte erhielt an Tag 27 *p.i.* unter volatiler Anästhesie durch Isofluran (Forene, Abbvie, Deutschland GmbH&Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) eine Echokardiographie (Vevo 770 *Rodent-Ultrasound-System*, 17MHz probe RMV176; Visual Sonic, Toronto, Kanada). Ermittelt wurde die rechtsatriale (RA-) Fläche sowie die *tricuspid annular plane systolic excursion* (TAPSE). Die RA-Fläche ist ein morphologischer Parameter und zeigt die Größe des rechten Vorhofs an. Die PH führt zu einer RA- und RV-Dilatation mit schlechtem klinischen Outcome (Grapsa *et al.* 2012). Ein vergrößerter rechter Vorhof spiegelt die Schwere der Rechtsherzinsuffizienz wieder (Raymond *et al.* 2002). Die TAPSE ist ein funktioneller Parameter und beschreibt die Bewegung des Trikuspidalklappenannulus in Richtung Herzspitze während der Herzaktion. Die TAPSE korreliert eng mit der rechtsventrikulären Auswurfraction (Kaul *et al.* 1984) und ist ein hochspezifischer Parameter der globalen rechtsventrikulären Funktion (Schmid *et al.* 2015).

##### *Rechtsherzkatheter*

Die Rechtsherzkatheteruntersuchung (1.4F *micro conductance pressure-volume catheter*, Model SPR-839; Millar Instruments Inc; Powerlab system, ADInstruments Ltd., Oxford, UK) zur Ermittlung des rechtsventrikulären systolischen Blutdrucks (RV<sub>Psys</sub>) erfolgte an Tag 28 nach MCT-Injektion. Die Anästhesieeinleitung erfolgte mit 100 mg/kg KG Ketamin (Zoetis, Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) und 10 mg/kg KG Xylazin (Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) in einer Konzentration von 0,1 ml/kg KG. Die zur anschließenden Präparation ausreichend tiefe Narkose wurde durch den Ausfall des Corneal-, Lid- und

Zwischenzehenreflex sichergestellt. Nach Fixierung der Ratten wurde die rechte *Vena jugularis interna* frei präpariert. Der Katheter wurde über die *Vena cava superior* in den rechten Ventrikel vorgeschoben und die Druckverläufe über eine Minute registriert (PowerLab System, ADInstruments Ltd., Oxford, UK).

#### **2.2.1.5 Euthanasierung der Tiere**

Im Anschluss an die Rechtsherzkatheteruntersuchung erfolgte, nach Euthanasierung der Ratten in tiefer Anästhesie und Analgesie, die Entnahme von Blutproben sowie der interessierenden Organe.

#### **2.2.1.6 Asservierung der Organe**

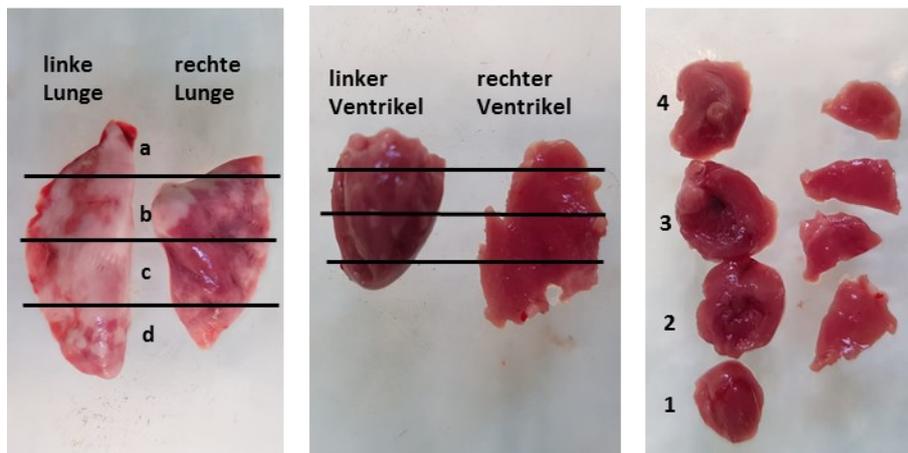
Nach der Euthanasierung und Organentnahme wurden diese mit je 10 ml NaCl vorsichtig unter gleichbleibendem Perfusionsdruck gespült. Es erfolgte die separierende Präparation von Herz und Lunge in jeweils rechten und linken Organteil. Nach dem Wiegen der Organpräparate wurden diese nach einem vorab festgelegten Algorithmus geteilt und so für weiterführende molekularbiologische Analyseverfahren vorbereitet (**Abbildung 5**). Die in Flüssigstickstoff schockgefrorenen Organe wurden bei -80°C gelagert, die in Formalin (Merck KGaA) fixierten Organpräparate bei Raumtemperatur.

##### *Rechte und linke Lunge*

Jeweils die rechte beziehungsweise linke Lunge wurde in vier Teile separiert. Für die Genexpressionsanalyse wurden jeweils die Gewebekompartimente *a* und *d* in Flüssigstickstoff schockgefroren, für die Immunfluoreszenz jeweils das Gewebekompartiment *b* in *Tissue Tek* (Satura Finetek USA Inc., Torrance, USA) eingebettet und in Flüssigstickstoff schockgefroren und für die histologischen Analysen jeweils das Gewebekompartiment *c* in Formalin fixiert (**Abbildung 5**).

##### *Rechter und linker Ventrikel*

Für die Genexpressionsanalyse wurden jeweils der *Apex* (1) und die Basis (4) des Myokards in Flüssigstickstoff schockgefroren und für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen die Klappenebene (3) in *Tissue Tek* eingebettet und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Das an den *Apex* angrenzende Myokardgewebe (2) wurde für die histologische Analyse in Formalin eingebettet und bei Raumtemperatur gelagert (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5: Darstellung der Organaufteilung von Lunge und Herz**

**Links:** Unterteilung in linke und rechte Lunge sowie jeweils in vier Gewebeteile (a-d). **Mitte und rechts:** Unterteilung des Herzens in den linken und rechten Ventrikel sowie in vier Gewebeteile von Apex (1) bis zur Basis (4).

### *Blut*

Das direkt aus dem Herzen entnommene Blut wurde in eine Serum-Monovette Lithium-Heparin (4 ml; Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland) gefüllt und zentrifugiert. Der Überstand des Vollblutes nach Zentrifugation wurde als Serum separiert umgefüllt und bis zur weiteren Verwendung für die quantitativen Konzentrationsanalysen mittels ELISA bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **2.2.2 Histologische Analyse der Gewebeschädigung in Lunge und Myokard**

### **2.2.2.1 Fixierung, Infiltration, Paraffinschneiden**

Die Organe wurden nach der Formalin-Fixierung der aufsteigenden Ethanol-Reihe, 50-100% Ethanol (Sigma Aldrich), unterzogen. Nach der Entwässerung wurden die gehärteten Organe mit Xylol (Vector Laboratories, Burlingame, USA) getränkt und in erwärmtes, flüssiges Paraffin (Sigma Aldrich) eingebettet. Mit dem Rotationsmikrotom (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) wurden  $4\text{ }\mu\text{m}$  dicke Schnitte hergestellt, auf Superfrost-Plus-Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) gezogen und für 1-2 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Die Schnitte wurden zur Entfernung des Paraffins für circa 30 Minuten bei  $56^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dann bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

An Gewebeschnitten von Myokard und Lunge wurden Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte der absteigenden Ethanol-Reihe von 100-50% Ethanol unterzogen. Dann für 20 Minuten in Hämatoxylin (Merck KgaA), für 10 Minuten in Leitungswasser und für 1-3 Minuten in Eosin (Sigma Aldrich) inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden der aufsteigenden Ethanol-Reihe von 50-100% unterzogen und mit Pertex (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) eingedeckt.

### 2.2.2.3 Histologische Auswertung der Lungengewebsschädigung

Die histopathologische Schädigungen des Lungengewebes wurde anhand eines in der Arbeitsgruppe etablierten und validierten *Scoring Systems* beurteilt (Franz *et al.* 2016). Die einzelnen Parameter sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Beurteilung erfolgte an HE-gefärbten Lungengewebsschnitten, welche zuvor in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Die histologische Auswertung der Lungengewebsschädigung erfolgte durch Prof. Dr. Marcus Franz und Dr. Katja Grün. Die Bildaufnahmen wurden am *Axio Imager A2* (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einer 20-fachen Vergrößerung mithilfe der Software *ZEN 2.3* (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen.

**Tabelle 13: Semiquantitative Bewertung der Lungengewebsschädigung anhand des Summenscores aus fünf histopathologischen Parametern**

<b>Histopathologischer Parameter</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Semiquantitative Bewertung</b>
Atektasebereich	Prozentuale Fläche der Atektase bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebeschnitts	0 Punkte = nicht nachweisbar, 1 Punkt < 30% 2 Punkte $\geq$ 30 %
Emphysembereich	Prozentuale Fläche des Emphysems bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebeschnitts	0 Punkte = nicht nachweisbar, 1 Punkt < 30% 2 Punkte $\geq$ 30 %
Mediahypertrophie der peribronchialen Arterien	Zelluläre Hypertrophie der <i>Tunica media</i> von Arterien, die räumlich mit Bronchialstrukturen assoziiert sind	0 Punkte = nicht nachweisbar, 1 Punkt = schwach nachweisbar, 2 Punkte = mäßig nachweisbar, 3 Punkte = stark nachweisbar
Perivaskuläre zelluläre Ödeme der peribronchialen Arterien	Zellödem im perivaskulären Bereich um die Peribronchialarterien	0 Punkte = nicht nachweisbar, 2 Punkte = nachweisbar
Mediahypertrophie der kleinen Arterien	Zellhypertrophie der <i>Tunica media</i> kleiner Arterien ohne räumliche Assoziation zu Bronchialstrukturen	0 Punkte = nicht nachweisbar, 1 Punkt = schwach nachweisbar, 2 Punkte = mäßig nachweisbar,

Histopathologischer Parameter	Beschreibung	Semiquantitative Bewertung
		3 Punkte = stark nachweisbar
<b>Summen-Score</b>		<b>Maximum 12 Punkte</b>

#### 2.2.2.4 Histologische Bewertung der Gewebeschädigung im Myokard

Als Surrogatmarker der Gewebeschädigung im Myokard erfolgte die lichtmikroskopiebasierte semiquantitative Bewertung von entzündlicher Infiltration und Fibrose (*Tabelle 14*). Die histologische Auswertung erfolgte durch Prof. Dr. Marcus Franz und Dr. Katja Grün an HE-gefärbten Gewebeschnitten des rechten und linken Ventrikels. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden am Axio *Imager* A2 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einer 20-fachen Vergrößerung mithilfe der Software ZEN 2.3 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen.

**Tabelle 14: Semiquantitative Bewertung der Myokardschädigung anhand von entzündlicher Infiltration und Fibrose**

Entzündliche Infiltration	Fibrose	Semiquantitative Bewertung
Nicht nachweisbar		0
Schwach nachweisbar		1
Mäßig nachweisbar		2
Stark nachweisbar		3

#### 2.2.3 Real-time Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Bei der quantitativen *real-time* Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wird die Quantität der amplifizierten Matrizen direkt abgelesen. Die Detektion der Amplifikationsmenge findet mittels Fluoreszenzmessung, zum Beispiel mit dem Cyanin-Farbstoff SYBR *Green*, statt. Da sich RNA nicht direkt durch den Einsatz der PCR amplifizieren lässt, muss diese vorab mittels Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Müller und Prange 2015).

##### 2.2.3.1 RNA Isolation

Die RNA-Isolation aus dem Herz- und Lungengewebe erfolgte mittels Maxwell 16 LEV *simplyRNA Tissue Kit* (SABiosciences, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) und dem Maxwell®16 Instrument (Promega Corporation, Madison, USA). Zuvor wurde das Gewebe

mit einem Pistill (Brand GmbH + Co KG) in Flüssigstickstoff mazeriert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zu Beginn der RNA-Isolation erfolgte die Homogenisierung der Gewebeproben in 400 µl 1-Thioglycerol/Homogenisierungspuffer-Lösung durch kurzes Vortexen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 400 µl Lysis-Puffer. Nach erneutem Vortexen der Proben wurden diese, bis zur Überführung in das Maxwell®16 Instrument, auf Eis gelagert. Nach Anpassung der Programmkonfiguration entsprechend der RNA-Isolation wurde pro Probe eine im Kit enthaltene 8-Well-Kartusche eingelegt. Daraufhin wurden 800 µl aus der zu extrahierenden Probe in das *Well* 1 pipettiert und 5 µl einer mit BlueDy versetzten DNase I in das *Well* 4 pipettiert. Es erfolgte das Einlegen eines 0,5 ml *Elution Tube*, gefüllt mit 50 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O, in die Front. Nach Beendigung der RNA-Isolierung mit dem Maxwell®16 Instrument wurden die Proben zentrifugiert, in ein neues Tube (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und bei -80°C gelagert.

#### *Qualitäts-und Quantitätskontrolle RNA*

Unter Verwendung des NanoDrop ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und der Programmsoftware ND 1000.3.8.1 (Peqlab, Biotechnologie, GmbH) erfolgte die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA.

An der Agilent 2200 *Tape Station* (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) erfolgte mit Hilfe des Agilent RNA *ScreenTape System* (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle der isolierten RNA. 5 µl des Puffers (RNA *Screen Tape Sample Buffer*, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) wurden mit 1 µl der RNA-Probe versetzt. Anschließend wurde die Probe kurz zentrifugiert und 3 Minuten bei 72°C erhitzt. Nach kurzer Lagerung auf Eis erfolgte die Überführung in die *Tape Station*.

#### *Eliminierung genomischer DNA*

Zur Vorbereitung auf die nachfolgende qRT-PCR wurde jede Probe mit dem gDNA *Removal Kit* (Jena Biosciences, Jena, Deutschland) behandelt. Hierbei erfolgte die Inkubation von 17 µl der Probe mit 2 µl *Reaction Buffer* und 1 µl gDNA *Remover* für 10 Minuten bei 37 °C und im Anschluss für 5 Minuten bei 58°C.

### **2.2.3.2 qRT-PCR**

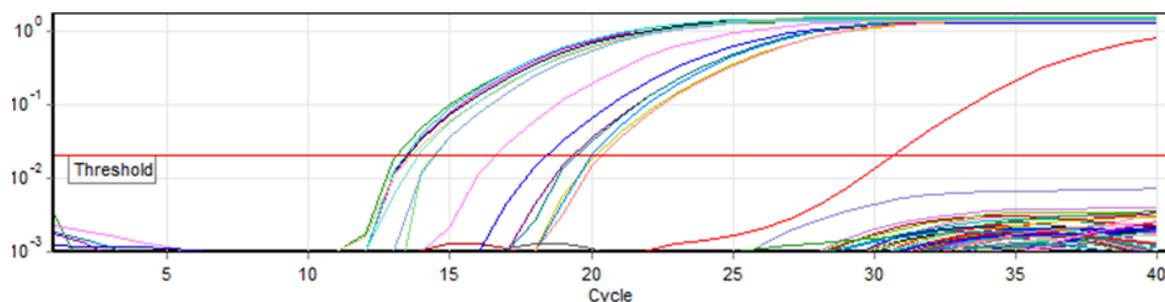
Die Synthesereaktion erfolgte mit dem SensiFAST SYBR No-ROX *One-Step Kit* (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany) gemäß den Herstelleranweisungen. Pro Tube wurden 5 µl

SensiFAST, je 0,3 µl *forward* und *reverse* Primer, 0,1 µl *reverse transcriptase*, 0,2 µl Ribosafe RNase Inhibitor und 3,1 µl H<sub>2</sub>O zu einer Gesamtmenge von 9 µl gemischt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 µl der zu messenden Probe. Es entstand ein Gesamtvolumen von 10 µl pro Tube. Zusätzlich erfolgte in jedem Durchgang die Herstellung einer *no template* Kontrolle. Dabei wurde anstelle 1 µl Probe 1 µl H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Bei jedem Primer erfolgte zusätzlich die Durchführung einer *no reverse transcription* Kontrolle (Ersatz der *reverse transcriptase* durch H<sub>2</sub>O) und einer *no primer* Kontrolle (Ersatz der Primer durch H<sub>2</sub>O). Zur Durchführung der PCR erfolgte die Einlage der Tubes in den Rotor-Gene Q Cycler (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Der Ablauf der PCR ist in Tabelle 15 dargestellt. Die *Annealing* Temperatur ist von dem jeweils verwendeten Primer abhängig (**Tabelle 5**).

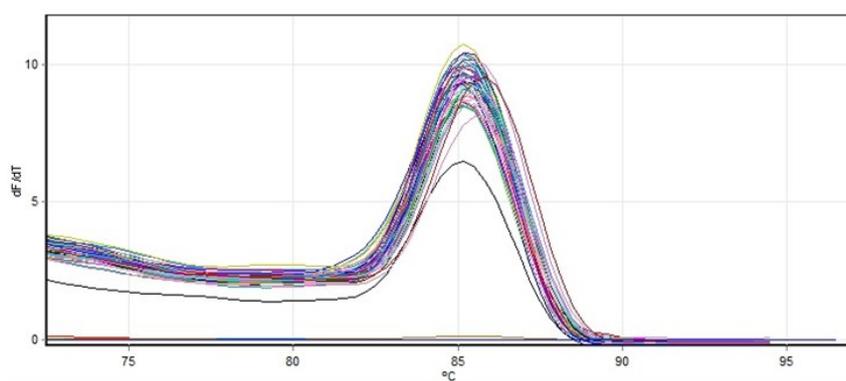
**Tabelle 15: qRT-PCR Protokoll**

Zyklus	Temperatur	Zeit	
1	45°C	10 Minuten	Reverse Transkriptase
1	95°C	2 Minuten	Polymerase Aktivierung
40	95°C	5 Sekunden	Denaturierung
	54°C (variabel)	10 Sekunden	<i>Annealing</i>
	72°C	5 Sekunden	Extension

Die SYBR *Green* Fluoreszenz wurde in jedem *Well* während des *Annealing*-Schrittes aufgezeichnet (exemplarisch **Abbildung 6**). Am Ende der qRT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse der Primer erstellt (exemplarisch **Abbildung 7**).



**Abbildung 6: SYBR-Green Fluoreszenz Grafik, erstellt während der qRT-PCR mit dem B<sup>+</sup> Tn-C Primer, *threshold* bei 0,02**



**Abbildung 7: Schmelzkurvenanalyse der qRT-PCR mit dem AD1<sup>+</sup> Tn-C Primer**

Darstellung der Schmelzkurvenanalyse des AD1<sup>+</sup> Tn-C Primer. Auf der y-Achse ist das Fluoreszenzsignal, auf der x-Achse die Temperatur, bei welcher der Primer aufschmilzt, aufgetragen.

### *Qualitätskontrolle der Primer*

Die Qualitätskontrolle der Primer erfolgte an der Agilent 2200 *Tape Station*. 1,5 µl der Probe wurden hierfür mit 3 µl Puffer (D1000 *Sample Buffer*, Agilent Technologies, Waldbraun, Deutschland) gemischt, auf Eis gestellt und anschließend in die *Tape Station* überführt.

### **2.2.3.3 Auswertung**

Die Datenanalyse der qRT-PCR erfolgte mit Hilfe der *Cycle threshold* (Ct) Werte. Diese wurden mittels der Software Rotor-Gene Q Series Software 2.0 (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) generiert. Um die Expressionsergebnisse zu normalisieren wurde mit den Ct-Werten des *housekeeping* Gens (HKG) Laktatdehydrogenase (LDH) 2 der Delta-Ct-Wert ermittelt.

$$\Delta Ct = Ct(\text{Gen}) - Ct(\text{HKG})$$

Um einen Vergleich der Genexpression zwischen den Versuchsgruppen zu erhalten, wurde der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert berechnet. Der Mittelwert des  $\Delta Ct$ -Werts der Kontrolltiere wurde von den  $\Delta Ct$ -Werten der MCT bzw. der MCT+ MACI - Gruppen subtrahiert.

$$\Delta\Delta Ct_{(\text{MCT-CON})} = \Delta Ct_{(\text{MCT})} - \Delta Ct_{(\text{CON})}$$

$$\Delta\Delta Ct_{(\text{MCT+MACI-CON})} = \Delta Ct_{(\text{MCT+MACI})} - \Delta Ct_{(\text{CON})}$$

Nun wurden die *Fold changes* mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Man geht davon aus, dass in jedem Zyklus die DNA verdoppelt wird. Die *Fold changes* geben Auskunft darüber um wie viel die Gene in ihrer Expression gesteigert (>1) oder vermindert (0-1) werden. Bei einem *Fold change*  $\geq 2,5$  wird in dieser Arbeit von biologischer Relevanz ausgegangen.

Insgesamt werden jeweils 40 PCR-Zyklen durchgeführt. Berechnet man den  $40\text{-}\Delta\text{Ct}$ -Wert so ist eine stärkere Expression mit einem höheren  $40\text{-}\Delta\text{Ct}$ -Wert assoziiert (niedriger Ct-Wert = hoher  $40\text{-}\Delta\text{Ct}$ -Wert = verstärkte Expression).

## **2.2.4 Immunfluoreszenz-Detektion von Adhäsionsproteinen der extrazellulären Matrix im Gewebe**

Bei der Analysemethode der Immunfluoreszenz werden Antigene mittels Antikörper, an welche ein fluoreszierender Farbstoff gebunden ist, markiert und somit sichtbar gemacht (Lang 2012). Im Folgenden wurde die *Labelled* (Strept-)Avidin-Biotin-Methode angewendet. Der primäre Antikörper (AK) bindet an das Antigen im Gewebeschnitt, der sekundäre biotinylierte AK bindet als Brückenantikörper an den primären AK. Enzymmarkiertes (Strept) Avidin bindet an das Biotin des Brückenantikörpers (Lang 2012). Der Nachweis der Fluoreszenz, zum Beispiel Cyanin 3, erfolgt durch ein Fluoreszenzmikroskop. Dabei wird der Farbstoff durch ein Licht mit spezifischer Wellenlänge angeregt. Die Zellkerne werden zusätzlich durch den im Eindeckmedium enthaltenen Farbstoff DAPI visualisiert.

### **2.2.4.1 Herstellung von Kryoschnitten**

Mittels Kryostat (Leica Biosystem, Nußloch, Deutschland) erfolgte die Anfertigung von je 4  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten aus der Lunge, dem rechten und linken Ventrikel. Diese wurden auf Polysine-beschichtete Objektträger (G.Menzel GmbH) gezogen, eine Stunde luftgetrocknet und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.4.2 Immunfluoreszenz-Detektion von Spleißvarianten im Gewebe**

Zuerst wurden die Kryoschnitte 20 Sekunden in  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Methanol (Sigma Aldrich) und anschließend 9 Minuten in  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Aceton (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Im Anschluss erfolgte der Auftrag der hydrophoben Barriere mittels Dako *Pen* (DAKO Denmark, Glostrup, Dänemark) um auf demselben Schnitt eine Negativkontrolle (Ersatz des primären AK) zum Spezifitätsnachweis des AK durchzuführen. Es wurde drei Mal mit trisgepufferter Salzlösung (TBS)-Tween gespült und ein Biotinblock zur Blockade endogenen Biotins mit dem *Dako-Biotin-Blocking-System* (Dako, Deutschland

GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde ein Tropfen Avidin gefolgt von einem Tropfen Biotin jeweils für 30 Minuten inkubiert. Dazwischen sowie im Anschluss wurden die Objektträger drei Mal mit TBS-Tween gespült. Für den Nachweis des primären AK wurden je Schnitt 100 µl aufgetragen. Die Inkubationszeiten und die Verdünnungen des primären AK mit Antikörperverdünnungslösung mit Hintergrund-reduzierender Komponente (Dako, Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) ist in Tabelle 2 dargestellt. Nach dreimaligem Spülen mit TBS-Tween wurden 100 µl des sekundären Antikörpers AffiniPure Esel-anti-Maus-Biotin (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Pennsylvania, USA) aufgetragen und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (**Tabelle 3**). Nach dreimaligem spülen in TBS-Tween erfolgte die 45-minütige Inkubation von 100 µl Streptavidin-Cy3 (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Pennsylvania, USA) bei Raumtemperatur. Es wurde zweimal mit TBS-Tween und einmal mit destilliertem H<sub>2</sub>O gespült. Mit dem Vectashield Eindeckmedium mit DAPI (Merck KGaA) wurden die Schnitte eingedeckt, mit Nagellack (Essence, Frankfurt) fixiert und bis zur Auswertung am konfokalen Laserscanningmikroskop (cLSM 510, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) in Dunkelheit bei -20°C gelagert.

#### **2.2.4.3 Auswertung am Mikroskop**

Zur Quantifizierung der Immunfluoreszenzmarkierung von ED-A<sup>+</sup> Fn beziehungsweise B<sup>+</sup> Tn-C wurden von jedem Schnitt sechs nicht überlappende, repräsentative Bilder mit dem Laserscanningmikroskop (cLSM 510, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) erzeugt. Unter Verwendung der LSM 510 Software Rel.3.2 wurde die Anzahl roter (Cy3) Pixel ermittelt und der relative Anteil der angefärbten Fläche in Prozent berechnet. Ein Mittelwert der sechs Bilder, welche als Surrogat für die Proteindepositions-Quantität pro Gewebeschnitt diente, wurde bestimmt. Um die unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu eliminieren, wurden zwei Bilder der Negativkontrolle (ohne primären Antikörper) jeder Probe erstellt. Der Mittelwert der Negativkontrollen wurde von den jeweiligen Ergebnissen (Mittelwerte) der Schnitte subtrahiert. Die repräsentativen Aufnahmen wurden mittels Axioplan 2 *Imaging* der Version Axio *Vision Rel 4.8* (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) erzeugt.

#### **2.2.5 Quantitative Analyse der Serumkonzentrationen von Fibronectin- und Tenascin-C-Spleißvarianten mittels ELISA**

Bei der im Anschluss zu beschreibenden *enzyme-linked-immunosorbent-assay* (ELISA)-Methode handelt es sich um ein antikörperbasiertes Verfahren in Sandwich-Technik. Dabei

werden zwei Antikörper verwendet. Der erste Antikörper dient zur Detektion des gesuchten Antigens, während der sekundäre Antikörper an den primären Antikörper bindet. An den sekundären Antikörper ist ein Detektionsenzym, zum Beispiel die Meerrettichperoxidase oder die alkalische Phosphatase, gebunden. Nach Zugabe eines Chromogens kommt es zu einem Farbumschlag, wenn das Substrat durch das Enzym umgesetzt wird. Die Konzentrationsänderungen des entstandenen Farbstoffs können mit einem Photometer verfolgt werden und einen quantitativen Nachweis der Antigenkonzentration in der Probe erbringen (Berg *et al.* 2017). Um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal zu erhalten, muss eine Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen erstellt werden. Um die statistische Auswertbarkeit zu erhöhen wurden zusätzliche Proben aus einem anderen Tierversuch, welcher unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, hinzugenommen.

#### *ED-A<sup>+</sup> Fn*

Die quantitative Analyse von ED-A<sup>+</sup> Fn im Serum der drei Versuchsgruppen erfolgte mittels ELISA. Zuerst wurde die ELISA-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit 0,5% Gelatine (Merck KGaA) gelöst in 1x PBS, beschichtet und über Nacht in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Es erfolgte der Auftrag von 50 µl der Negativkontrolle, des Standards und der zu messenden Probe je in Doppelbestimmung auf die Platte mit einer Inkubationszeit von einer Stunde. Der zur Detektion verwendete Primärantikörper ist der monoklonale Antikörper IST-9 (Santa Cruz Biotechnology), welcher spezifisch an ED-A<sup>+</sup> Fn bindet. Dieser wurde 1:200 in PBS verdünnt, je 100 µl pro *Well* aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl des sekundären Antikörpers AffiniPure Esel-anti-Maus-Biotin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Pennsylvania, USA, **Tabelle 4**) mit anschließender Inkubation für eine Stunde. Der endgültige Nachweis des biotinylierten Antikörpers hängt von einer enzymatischen Reaktion ab. Streptavidin-Horseradish-Peroxidase wurde 1:330 verdünnt, je 100 µl pro *Well* aufgetragen und 40 Minuten inkubiert. Dann wurden 100 µl TMB *One Ready to use* Substrat (Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dänemark) aufgetragen und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mittels 100 µl Schwefelsäure (0,5 Mol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Carl Roth) gestoppt. Die Extinktion der resultierenden Farben wurde mit dem *Tecan Infinite Pro Microplate Reader* (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 450 Nanometer gemessen. Die Durchführung des gesamten Verfahrens erfolgte bei Raumtemperatur. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die *Wells* mit einer Mehrkanalpipette dreimal mit je 300 µl PBS-Tween gespült.

### *C<sup>+</sup> Tn-C und B<sup>+</sup> Tn-C*

Die quantitative Analyse von C<sup>+</sup> Tn-C im Serum wurde mit dem Human Tenascin-C *Large (FNIII-C) Assay Kit* (IBL-International GmbH, Hamburg, Deutschland,), die Analyse von B<sup>+</sup> Tn-C mit dem Tenascin-C *Large (FNIIIB) Assay Kit* (IBL-International GmbH, Hamburg, Deutschland), gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt. Bei dem jeweiligen Kit handelt es sich um ein Enzymimmunoassay, welcher auf der Sandwichtechnik basiert. Die *Wells* der Mikrotiterplatten sind mit dem monoklonalen AK 19C4MS (C<sup>+</sup> Tn-C) beziehungsweise 4C8MS (B<sup>+</sup> Tn-C) beschichtet. Je 100 µl des Standards und der Proben wurden auf die Platte pipettiert und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde in jedes *Well* 100 µl des konjugierten Anti-Tn-C-Antikörpers pipettiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die *Wells* mit dem Waschpuffer gründlich gespült. Im nächsten Schritt wurden je 100 µl Chromogen hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor die Platte bei 450 Nanometer im *Reader* gemessen wurde, wurden je 100 µl *Stop solution* in jedes *Well* pipettiert.

### **2.2.6 Statistische Auswertung**

Ausgehend von den ermittelten Stichproben erfolgt die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen mit dem Computerprogramm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Da die Anzahl der untersuchten Stichproben begrenzt ist, kann nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden, sodass ein nicht parametrischer Test zur Anwendung kommen musste (Mann-Whitney-U-Testes). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wird als signifikant betrachtet. Bivariate Korrelationen zwischen parametrischen Variablen wurden anhand des Korrelationskoeffizienten nach Paerson getestet. Zur Berechnung wurde die Computersoftware SPSS (SPSS IBM, Deutschland GmbH) verwendet.

### 3. Ergebnisse

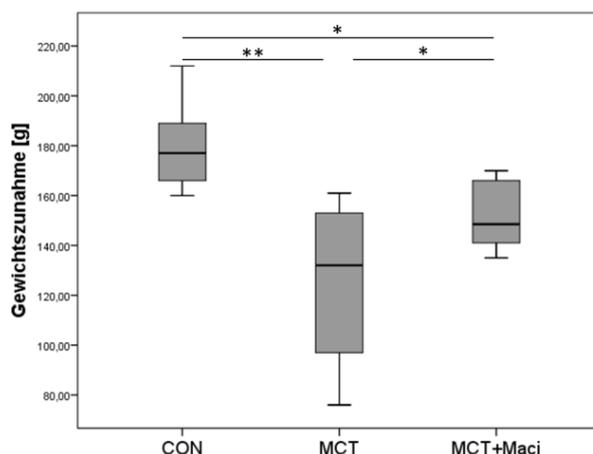
Die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte sowie additive, hier nicht im Detail aufgeführte Daten, sind im Anhang in *Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19 und Tabelle 20* dargestellt.

#### 3.1 Tiermodell der Monocrotalin-induzierten Pulmonalen Hypertonie

Zu Beginn des Versuchs wurden die Tiere, wie bereits erwähnt, in die drei Versuchsgruppen unterteilt: CON (n=6), MCT (n=10), MCT+MACI (n=10). Der *Score* zur klinischen Beurteilung des Wohlbefindens der Tiere sowie das Körpergewicht wurden regelmäßig ermittelt und dokumentiert. Zum Ende der Versuchslaufzeit erfolgten die Untersuchungen zur Erhebung der echokardiographischen und hämodynamischen Parameter.

##### 3.1.1 Klinische Untersuchung

Das Körpergewicht der Ratten wurde zweimal pro Woche erhoben und die Gewichtsänderung von Tag 0 bis 28 *p.i.* berechnet. Alle Ratten nahmen im Verlauf des Experimentes an Körpergewicht zu. Zwischen den Gruppen bestehen jedoch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Gewichtszunahme. In der MCT-Gruppe (126 g  $\pm$  29,35 g,  $p < 0,01$ ) und in der MCT+MACI-Gruppe (152,7 g  $\pm$  12,54 g,  $p < 0,05$ ) fällt die Gewichtszunahme im Vergleich zur CON-Gruppe (180,17 g  $\pm$  16,94 g) geringer aus, wobei die Gewichtszunahme in der MCT+MACI-Gruppe im Vergleich zur MCT-Gruppe signifikant höher ist ( $p < 0,05$ , Abbildung 8).

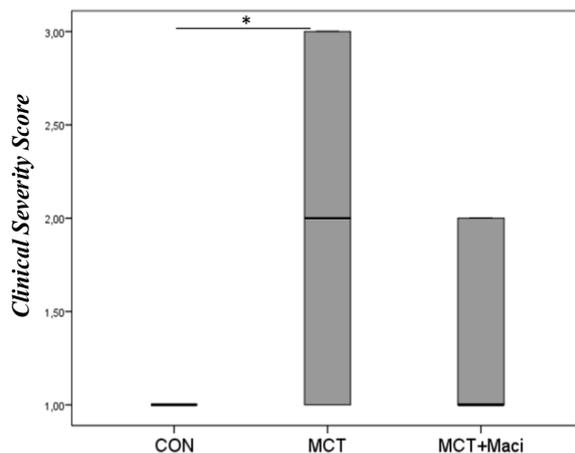


**Abbildung 8: Gewichtsänderung der Versuchstiere von Tag 0 bis Tag 28 *p.i.***

Darstellung der Gewichtszunahme im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin

Das Monitoring des Gesundheitszustandes erfolgte zweimal wöchentlich mit Hilfe des *Clinical Severity Scores* (CSS). Zu Beginn des Experiments zeigten die Tiere aller Versuchsgruppen keine Krankheitszeichen (Tag 0, CSS 1,0). Die Tiere der MCT-Gruppe entwickelten in etwa ab Tag 14 *p.i.* erste Anzeichen einer klinischen Verschlechterung, unter anderem eine Dyspnoe und eine reduzierte körperliche Aktivität. Der an Tag 28 *p.i.* ermittelte CSS-Wert der MCT-Gruppe ( $2,1 \pm 0,83$ ) ist im Vergleich zur CON-Gruppe ( $1,0 \pm 0$ ) signifikant höher ( $p < 0,05$ , Abbildung 9). Der CSS-Wert der MCT+MACI-Gruppe ( $1,4 \pm 0,49$ ) liegt zwischen der CON-Gruppe und der MCT-Gruppe.



**Abbildung 9: *Clinical Severity Score* (CSS) an Tag 28 *p.i.***

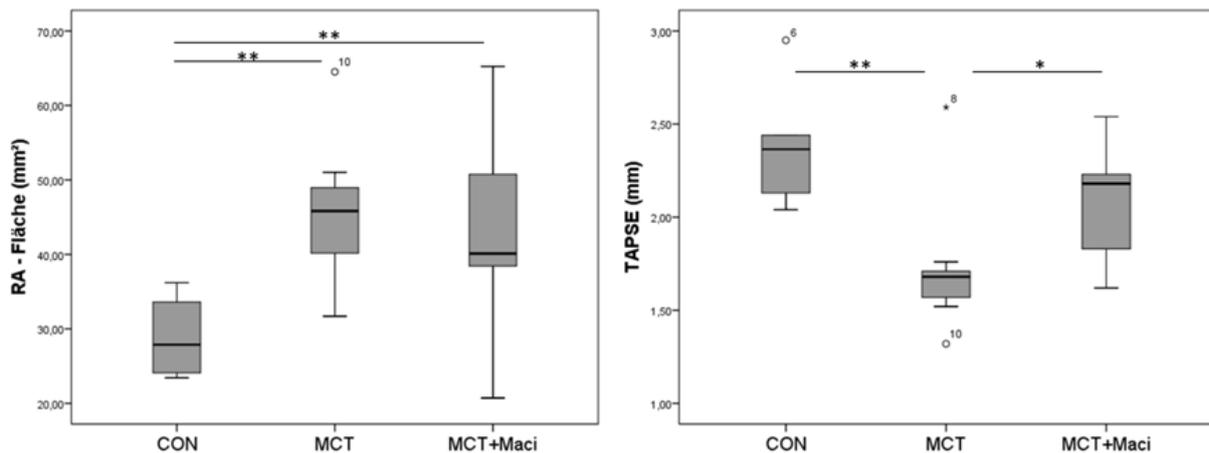
Darstellung des CSS im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*,  $p < 0,05$ ).

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin

### 3.1.2 Echokardiographische und hämodynamische Evaluation

#### *Echokardiographie*

Hinsichtlich der RA-Fläche zeigen sich signifikante Unterschiede. Im Vergleich zur CON-Gruppe ( $28,85 \text{ mm}^2 \pm 4,67 \text{ mm}^2$ ) ist die RA-Fläche in der MCT-Gruppe ( $45,11 \text{ mm}^2 \pm 9,06 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0,01$ ) und in der MCT+MACI-Gruppe ( $42,8 \text{ mm}^2 \pm 11,1 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0,01$ ) größer. Zwischen der unbehandelten MCT-Gruppe und der MCT+MACI-Gruppe besteht kein Unterschied. Die TAPSE ist in der MCT-Gruppe ( $1,71 \text{ mm} \pm 0,32 \text{ mm}$ ) im Vergleich zur CON-Gruppe ( $2,38 \text{ mm} \pm 0,29 \text{ mm}$ ,  $p < 0,01$ ) und zur MCT+MACI-Gruppe ( $2,08 \text{ mm} \pm 0,28 \text{ mm}$ ,  $p < 0,05$ ) signifikant geringer (**Abbildung 10**).



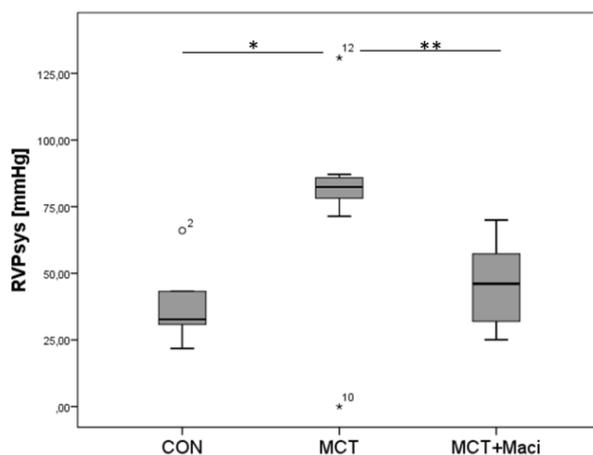
**Abbildung 10: Echokardiographische Ergebnisse**

Darstellung der RA-Fläche (**links**) und der TAPSE (**rechts**) im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, RA, rechtsatrial, TAPSE: *tricuspid annular plane systolic excursion*

### Rechtsherzkatheter

Bei der Rechtsherzkatheter-Untersuchung an Tag 28 *p.i.* (siehe 2.2.1.5) wurde der rechtsventrikuläre systolische Blutdruck (RVpsys) ermittelt. Ausgehend von dem gemessenen RVpsys der Tiere der CON-Gruppe ( $37,87 \text{ mmHg} \pm 14,04 \text{ mmHg}$ ) lässt sich durch PH-Induktion eine signifikante Erhöhung des RVpsys in der MCT-Gruppe ( $77,91 \text{ mmHg} \pm 31,86 \text{ mmHg}$ ,  $p < 0,05$ ) feststellen. Im Vergleich zur MCT-Gruppe zeigen sich erheblich niedrigere Werte in der therapierten MCT+MACI-Gruppe ( $45,62 \text{ mmHg} \pm 13,43 \text{ mmHg}$ ,  $p < 0,01$ ; Abbildung 11).



**Abbildung 11: Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck**

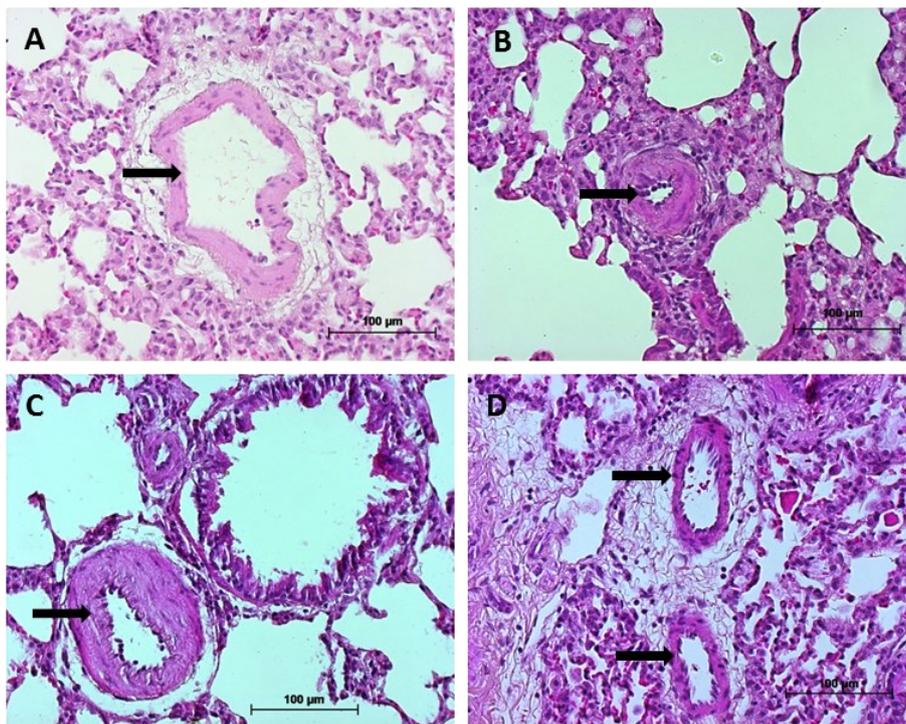
Darstellung des RVpsys im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, RVpsys: rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck

## 3.2 Analyse der histopathologischen Gewebeschädigung nach Induktion der pulmonalen Hypertonie

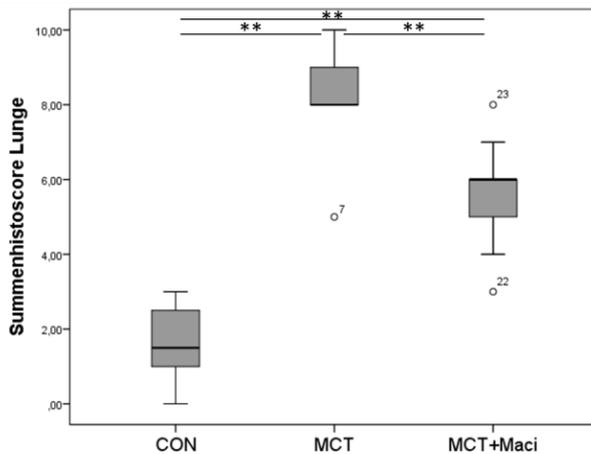
### 3.2.1 Histologische Analyse der Lungengewebsschädigung

Bei den erkrankten Tieren zeigt sich eine ausgeprägte Mediahypertrophie der peribronchialen und kleinen Arterien. Dies wird in den repräsentativ erstellten lichtmikroskopischen Aufnahmen der drei Versuchsgruppen in Abbildung 12 deutlich. Der aus den einzelnen Parametern errechnete Summenscore erreicht einen Maximalwert von 12. Der Summen-Score-Wert ist in der MCT-Gruppe ( $8,33 \pm 1,41$ ) und in der MCT+MACI-Gruppe ( $5,6 \pm 1,36$ ) im Vergleich zur CON-Gruppe ( $1,58 \pm 1,02$ ) signifikant höher ( $p_{\text{CON-MCT}} < 0,01$ ;  $p_{\text{CON-MCT+MACI}} < 0,01$ ). Ebenso ist ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Gewebeschädigung zwischen der MCT-Gruppe und der MCT+MACI-Gruppe ( $p < 0,01$ ) erkennbar (*Abbildung 13*).



**Abbildung 12: Histopathologische Veränderungen im erkrankten Lungengewebe**

Hämatoxylin-Eosin- (HE-) gefärbte Gewebeschnitte der Lunge. **A:** Kontrollgruppe, **B:** MCT-Gruppe, Mediahypertrophie einer kleinen Arterie, **C:** MCT-Gruppe, Mediahypertrophie einer peribronchialen Arterie, **D:** MCT+MACI-Gruppe. Die Pfeile zeigen jeweils auf die Gefäße. Vergrößerung: x 20.



**Abbildung 13: Summenscore der histopathologischen Gewebeschädigung der Lunge**

Darstellung des Summenscore der histopathologischen Gewebeschädigung in der Lunge im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*\*,  $p < 0,01$ ).

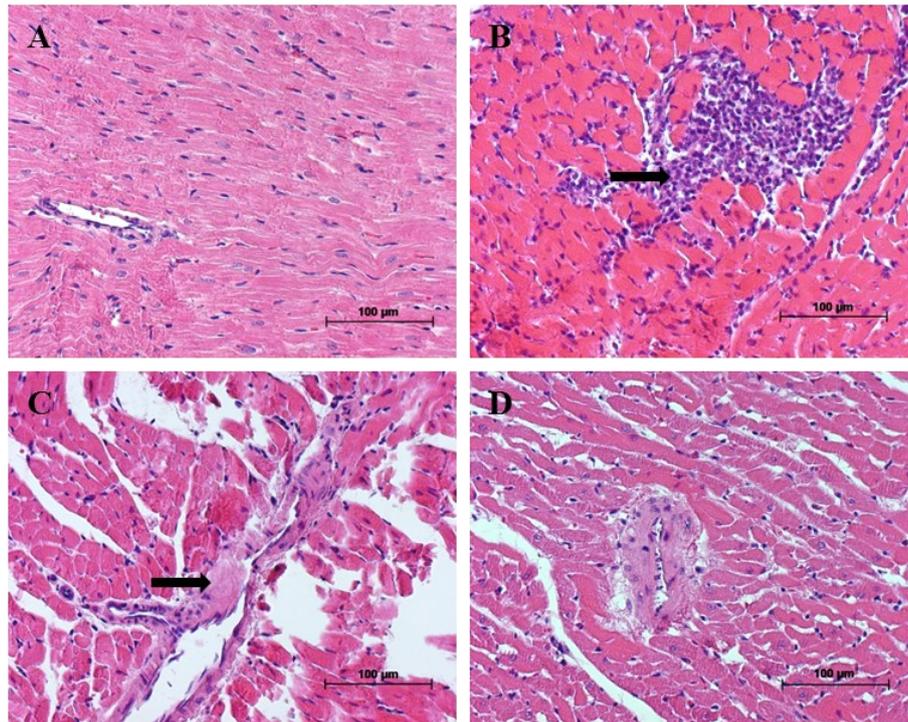
Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin

### 3.2.2 Histologische Analyse der Gewebeschädigung im Myokard

Die HE-gefärbten Paraffinschnitte aus dem Myokard wurden anhand der entzündlichen Infiltration und der Fibrose semiquantitativ (0 = keine Fibrose / entzündliche Infiltration bis 3 = starke Fibrose / entzündliche Infiltration; siehe 2.2.2.4) bewertet. Der rechte und linke Ventrikel wurden separat untersucht und analysiert.

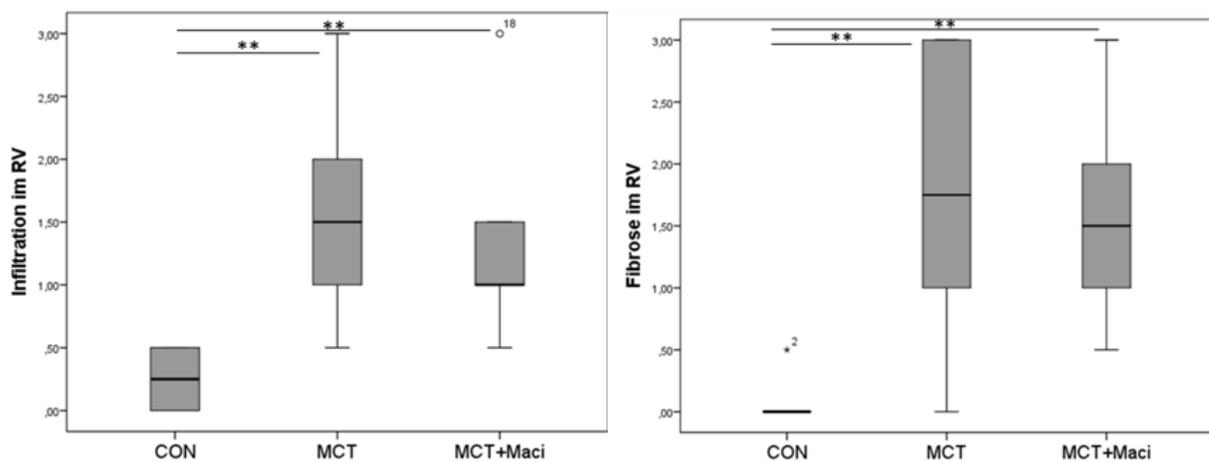
#### *Gewebeschädigung im rechten Ventrikel*

Die Myokardgewebeschnitte von Ratten aus der CON-Gruppe zeigen eine geringe entzündliche Infiltration ( $0,25 \pm 0,25$ ) und Fibrose ( $0,08 \pm 0,19$ ). In der MCT-Gruppe kommt es zu einer Zunahme entzündlicher Infiltration und Fibrose. Dies wird in den repräsentativ erstellten lichtmikroskopischen Aufnahmen der drei Versuchsgruppen in Abbildung 14 deutlich. Semiquantitativ zeigt sich im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Verstärkung der entzündlichen Infiltration ( $1,6 \pm 0,86$ ,  $p < 0,01$ ) und Fibrose ( $1,7 \pm 1,08$ ,  $p < 0,01$ ) in der MCT-Gruppe. In der MCT+MACI-Gruppe ist die Zunahme von entzündlicher Infiltration ( $1,28 \pm 0,67$ ,  $p < 0,01$ ) und Fibrose ( $1,67 \pm 0,75$ ,  $p < 0,01$ ) im Vergleich zur CON-Gruppe ebenfalls signifikant. Jedoch zeigt sich die entzündliche Infiltration und Fibrose im Vergleich zur MCT-Gruppe abgeschwächer, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (**Abbildung 15**).



**Abbildung 14: Histopathologische Gewebeschädigung des rechtsventrikulären Myokards**

Hämatoxylin-Eosin- (HE-) gefärbte Gewebeschnitte des rechtsventrikulären Myokards. **A:** Kontrollgruppe, **B:** MCT-Gruppe, Pfeil zeigt auf entzündliche Infiltration **C:** MCT-Gruppe, Pfeil zeigt auf fibrotisches Areal, **D:** MCT+MACI-Gruppe. Vergrößerung: x 20.



**Abbildung 15: Gewebeschädigung im RV: entzündliche Infiltration und Fibrose**

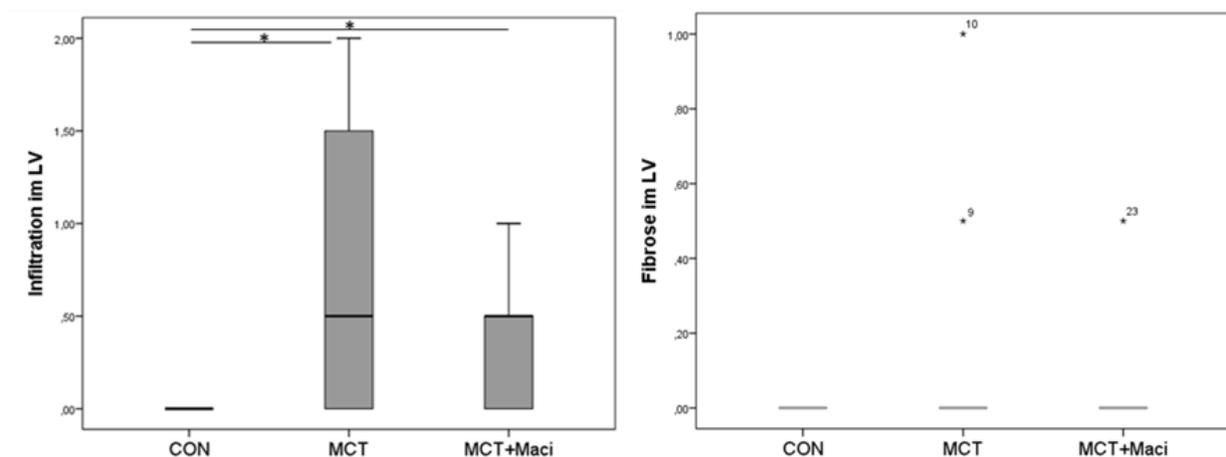
Darstellung der entzündlichen Infiltration (**links**) und der Fibrose (**rechts**) im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*\*,  $p < 0,01$ ).

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin

## Gewebeschädigung im linken Ventrikel

Um mögliche systemische (extrapulmonale) proinflammatorische Effekte des Monocrotalins auf den, primär nicht durch die PH belasteten linken Ventrikel auszuschließen beziehungsweise zu detektieren, wurde dieser in der vorliegenden Arbeit analysiert.

Die untersuchten Myokardgewebeschnitte von Ratten aus der CON-Gruppe zeigen weder eine entzündliche Infiltration noch Fibrose im LV. Weder in der MCT-Gruppe noch in der MCT+MACI-Gruppe sind fibrotische Areale sichtbar. Im Hinblick auf die entzündliche Infiltration zeigt sich ein signifikanter Anstieg in der MCT-Gruppe ( $0,7 \pm 0,71$ ,  $p < 0,05$ ) und in der MCT+MACI-Gruppe ( $0,4 \pm 0,37$ ,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur CON-Gruppe (**Abbildung 16**). Insgesamt sind diese Veränderungen im Vergleich zum rechten Ventrikel aber als biologisch marginal zu bewerten.



**Abbildung 16: Gewebeschädigung im LV: entzündliche Infiltration und Fibrose**

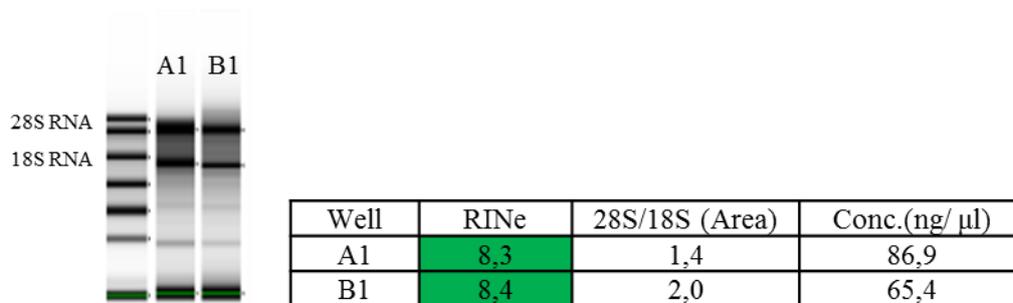
Darstellung der entzündlichen Infiltration (**links**) und der Fibrose (**rechts**) im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*,  $p < 0,05$ ).

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, MCT: Monocrotalin, MACI: Macitentan

Zusammenfassend zeigen die histologischen Analysen der Gewebeschnitte, dass die Induktion der PH durch Monocrotalin eine Zunahme der entzündlichen Infiltration und Fibrose im rechten Ventrikel verursacht, während im linken Ventrikel lediglich eine leichte biologisch marginale Zunahme der entzündlichen Infiltrate zu beobachten sind.

### 3.3 Analyse der differentiellen Expression von Fibronectin- und Tenascin-C-Spleißvarianten im Modell der Monocrotalin-induzierten Pulmonalen Hypertonie

Die Genexpressionsanalyse von sechs Spleißvarianten von Fibronectin beziehungsweise Tenascin-C im PH-Modell wurde mit dem *Rotor-Gene Q Cycler* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wie in Abschnitt 2.2.3.2 erläutert, analysiert. Zuvor wurde eine RNA-Isolation und eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle der erhaltenen RNA an der *Tape Station* durchgeführt. Dort erfolgt eine Auftrennung in 18S und 28S RNA. Der RNA *integrity number equivalent* (RINe)-Wert gibt Auskunft über die Qualität der RNA und kann einen Wert zwischen 1 und 10 annehmen (*Abbildung 17*). Ein RINe-Wert von 10 ist erstrebenswert.

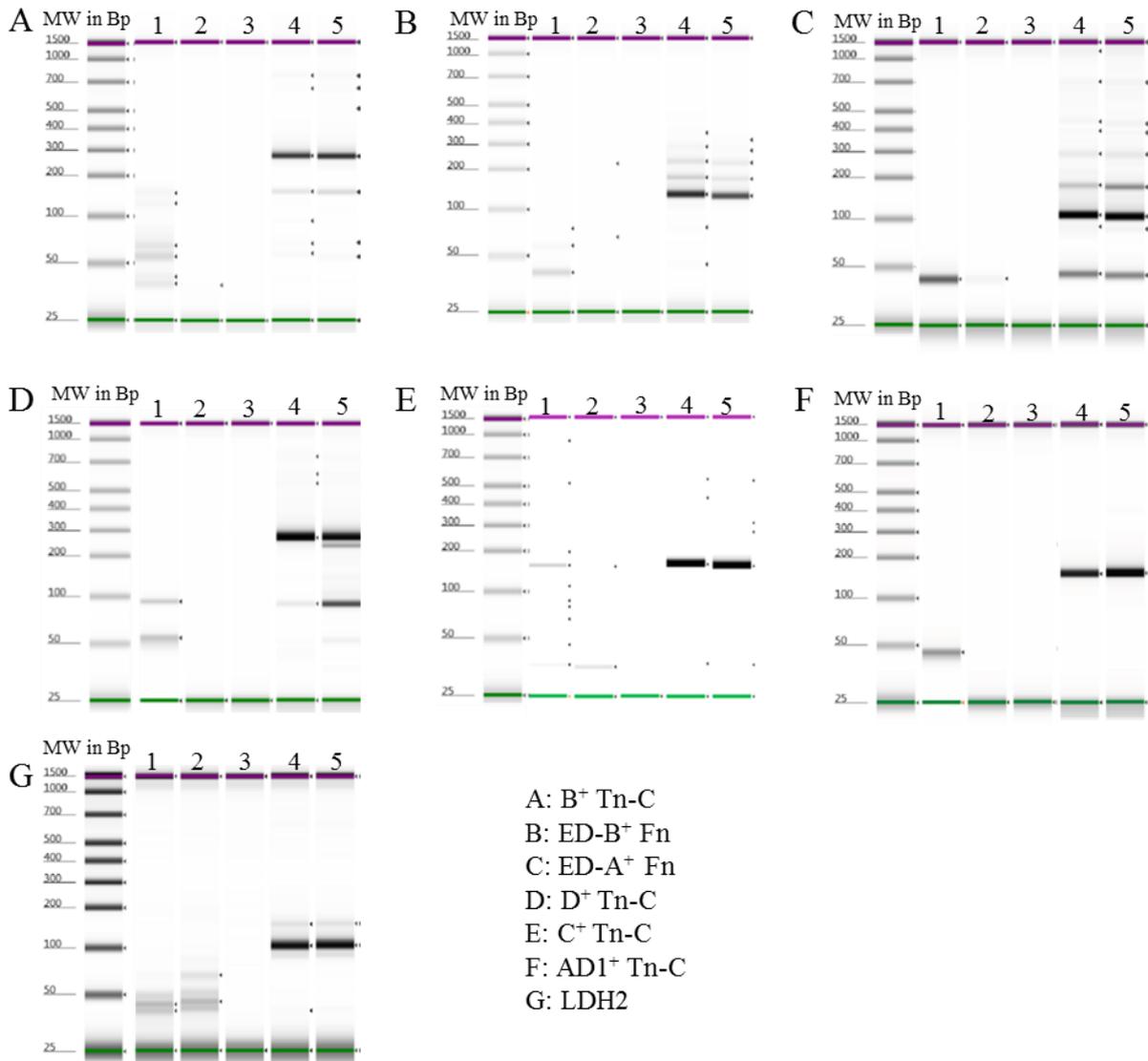


**Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse an der *Tape Station***

**Links:** Dargestellt sind die RNA-Banden nach Auftrennung der RNA in 18S und 28S RNA. **Rechts:** Tabelle mit Ergebnissen des RINe-Wertes.

Verwendete Abkürzungen: Conc.: Konzentration, RINe: RNA *integrity number equivalent*, RNA: Ribonukleinsäure

Im Anschluss an die Durchführung der qRT-PCR erfolgt eine Qualitätskontrolle aller verwendeten Primer wie in Abschnitt 2.2.3.2 erläutert. *Abbildung 18* zeigt die Ergebnisse an der *Tape Station*. Als Negativkontrollen erfolgte eine Analyse von „no template“, „no reverse transcription“ und „no primer“. Die Banden aus den positiven RNA-Proben zeigen bei allen Primern eine definierte große Bande. Die Länge der Bande ist hierbei abhängig von dem jeweils verwendeten Primer.



**Abbildung 18: Qualitätskontrolle der Primer an der Tape Station**

Dargestellt sind die Elektrophoreseergebnisse der unterschiedlichen Spleißvarianten. Links ist jeweils ein mitgeführter Größenstandard mit dazugehöriger Basenpaar-Länge (MW in Bp) dargestellt. Zeile 1-3 zeigen Negativkontrollen in der Reihenfolge: „no template“ (1, Verwendung von H<sub>2</sub>O anstelle einer Probe), „no reverse transcription“ (2, Ersatz der reverse transcription durch H<sub>2</sub>O) und „no primer“ (3, Ersatz der Primer durch H<sub>2</sub>O). Die beiden Banden 4 und 5 zeigen beliebige RNA Proben.

Verwendete Abkürzungen: Bp: Basenpaar, Fn: Fibronectin, LDH: Laktatdehydrogenase, Tn-C: Tenascin, RNA: Ribonukleinsäure, MW: *molecular weight*

### 3.3.1 Differentielle Genexpressionsanalyse der Spleißvarianten von Fibronectin und Tenascin-C in Lunge, rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel

Die Auswertung der Genexpressionsanalyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben mit Hilfe der ermittelten *Fold changes*. Ein *Fold change* > 1 zeigt eine Expressionssteigerung an,

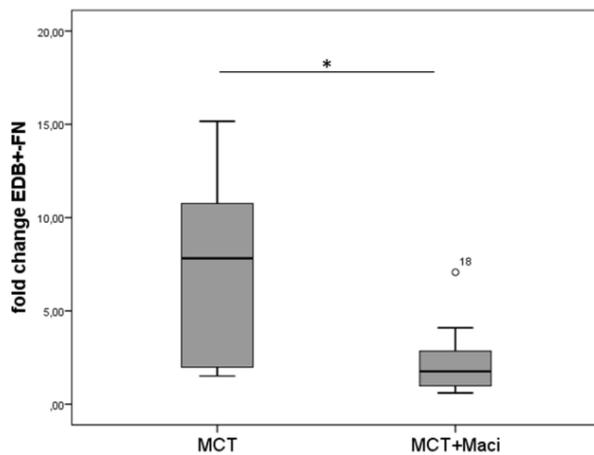
ein *Fold change* < 1 zeigt eine Expressionsverminderung des untersuchten Gens an. Ein *Fold change*  $\geq 2,5$  wurde in unseren Analysen als biologisch relevant bewertet. In Tabelle 16 sind die *Fold changes* aller untersuchten Spleißvarianten von Fn und Tn-C in der Lunge, im RV und im LV jeweils in der MCT-Gruppe beziehungsweise in der MCT+MACI-Gruppe dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt es zu einer Expressionssteigerung aller Spleißvarianten im rechten Ventrikel und bei ED-B<sup>+</sup> Fn und B<sup>+</sup> Tn-C zu einer Abnahme der Expression unter Therapie mit Macitentan. Die ermittelten *Fold changes* in der Lunge bewegen sich innerhalb der definierten biologischen Spannweite und überschreiten den Faktor 2,5 nicht mit Ausnahme einer 2,76-fachen Expressionssteigerung von ED-B<sup>+</sup> Fn. Im LV zeigt sich ein leichter Anstieg für ED-B<sup>+</sup> Fn und ein stärkerer Anstieg der Expression bei B<sup>+</sup> Tn-C und D<sup>+</sup> Tn-C, welcher unter Therapie tendenziell abnimmt.

**Tabelle 16: Darstellung der *Fold changes* mit Mittelwert und Standardabweichung**

	Lunge		RV		LV	
	MCT	MCT+MACI	MCT	MCT+MACI	MCT	MCT+MACI
ED-A <sup>+</sup> Fn	1,17 ± 0,74	0,88 ± 0,23	<b>3,7</b> ± 1,91	3,22 ± 0,98	1,11 ± 0,74	0,49 ± 0,27
ED-B <sup>+</sup> Fn	2,76 ± 1,37	2,91 ± 0,70	<b>7,34</b> ± 4,46	<b>2,34</b> ± 1,88	3,09 ± 2,58	1,37 ± 0,71
B <sup>+</sup> Tn-C	1,32 ± 0,59	0,07 ± 0,29	<b>10,75</b> ± 10,34	<b>4,27</b> ± 3,31	6,11 ± 6,72	2,75 ± 2,83
C <sup>+</sup> Tn-C	1,89 ± 0,61	1,04 ± 0,64	<b>6,87</b> ± 5,68	5,89 ± 6,09	0,77 ± 0,53	0,73 ± 0,44
D <sup>+</sup> Tn-C	1,62 ± 0,93	1,25 ± 0,89	6,79 ± 6,79	6,06 ± 6,94	14,96 ± 11,07	8,09 ± 5,45
AD1 <sup>+</sup> Tn-C	1,11 ± 0,68	0,87 ± 0,78	<b>5,53</b> ± 3,99	6,18 ± 7,23	2,76 ± 2,56	1,46 ± 1,32

Verwendete Abkürzungen: Fn: Fibronectin, Tn-C: Tenascin, RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin

Einige Ergebnisse aus der Tabelle sind im Folgenden detaillierter dargestellt. Im RV ist die Spleißvariante ED-B<sup>+</sup> Fn in der MCT-Gruppe (7,34 ± 4,46) deutlich überexprimiert. Verglichen mit den behandelten Tieren aus der MCT+MACI-Gruppe (2,34 ± 1,88) zeigt sich hierbei eine signifikant geringere Expression ( $p < 0,05$ , **Abbildung 19**).



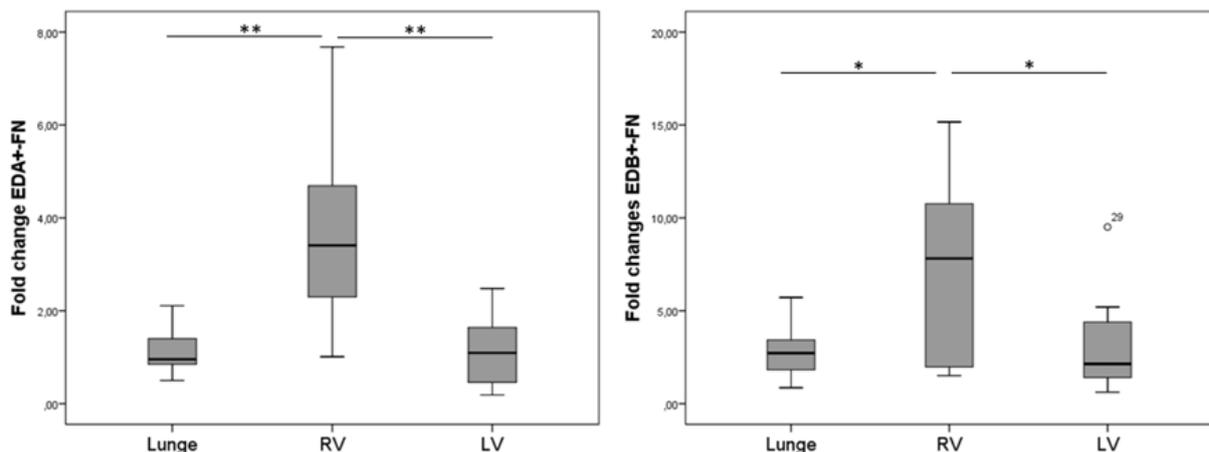
**Abbildung 19: Expression von ED-B<sup>+</sup> Fn im RV**

Darstellung der *Fold changes* von ED-B<sup>+</sup> Fn im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*,  $p < 0,05$ ).

Verwendete Abkürzungen: MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, Fn: Fibronectin, RV: rechter Ventrikel

### Vergleich der Genexpressionsanalyse innerhalb der MCT-Gruppen

Die Analyse der Genexpression innerhalb der MCT-Gruppen ist von Interesse, weil dadurch ein Vergleich zwischen der Lunge, dem RV und dem LV ermöglicht wird. Bei der ED-A<sup>+</sup> Fn-Spleißvariante zeigt sich im RV ( $3,7 \pm 1,91$ ) im Vergleich zur Lunge ( $1,17 \pm 0,74$ ) und zum LV ( $1,11 \pm 0,74$ ) eine deutliche Expressionssteigerung ( $p < 0,01$ ). Bei ED-B<sup>+</sup> Fn ist auch im RV ( $7,34 \pm 4,46$ ) eine vermehrte Expression im Vergleich zur Lunge ( $2,76 \pm 1,37$ ) und zum LV ( $3,09 \pm 2,58$ ) zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ; **Abbildung 20**).

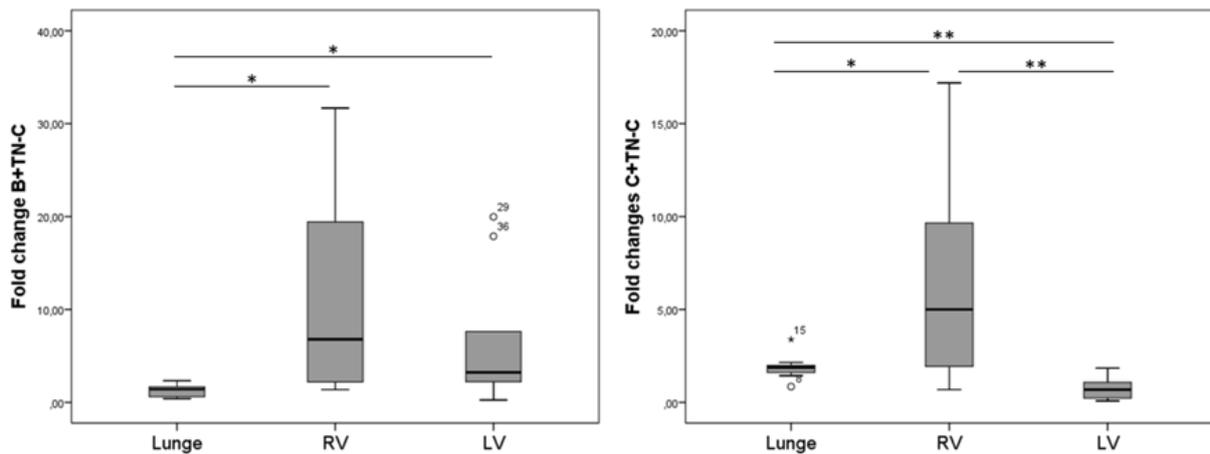


**Abbildung 20: ED-A<sup>+</sup> Fn und ED-B<sup>+</sup> Fn in den MCT-Gruppen im Vergleich**

Dargestellt sind die *Fold changes* von ED-A<sup>+</sup> Fn (**links**) und ED-B<sup>+</sup> Fn (**rechts**) innerhalb der MCT-Gruppen im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

Verwendete Abkürzungen: Fn: Fibronectin, LV: linker Ventrikel, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, RV: rechter Ventrikel

Im Hinblick auf die B<sup>+</sup> Tn-C-Spleißvariante zeigt sich im RV (10,75 ± 10,34) eine Expressionssteigerung im Vergleich zur Lunge (1,32 ± 0,59). Der Unterschied zwischen dem RV und dem LV (6,11 ± 6,72) ist nicht signifikant. Bei C<sup>+</sup> Tn-C zeigt sich im RV (6,87 ± 5,68) eine deutlich gesteigerte Expression im Vergleich zur Lunge (1,89 ± 0,61, p<sub>RV-Lunge</sub> < 0,05) und zum LV (0,77 ± 0,53, p<sub>RV-LV</sub> < 0,01; p<sub>Lunge-LV</sub> < 0,01; **Abbildung 21**).



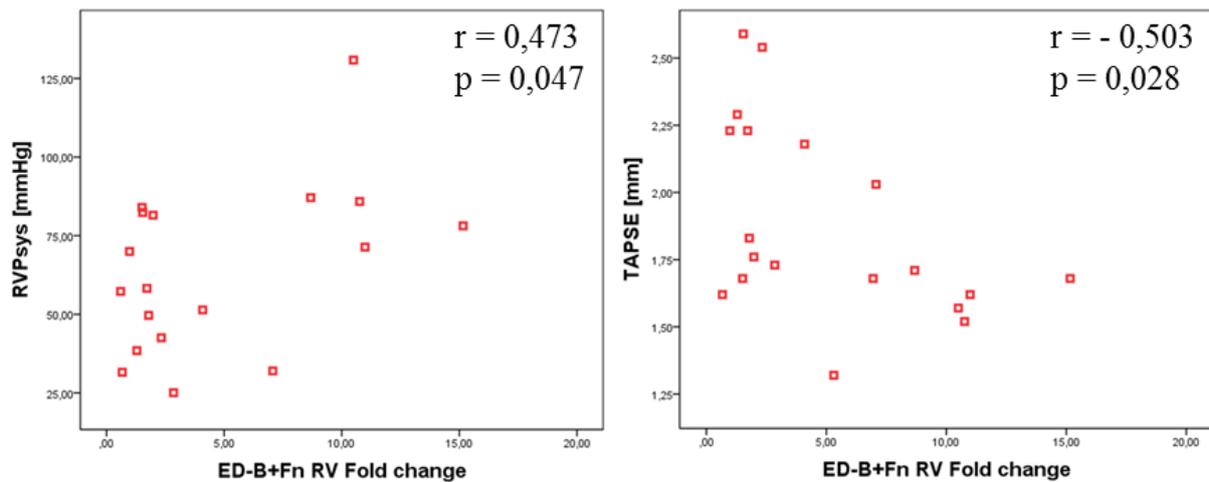
**Abbildung 21: B<sup>+</sup> Tn-C und C<sup>+</sup> Tn-C in den MCT-Gruppen im Vergleich**

Dargestellt sind die *Fold changes* von B<sup>+</sup> Tn-C (**links**) und C<sup>+</sup> Tn-C (**rechts**) innerhalb der MCT-Gruppen im Boxplot. Die Signifikanzen wurden des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01).

Verwendete Abkürzungen: LV: linker Ventrikel, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, RV: rechter Ventrikel, Tn-C: Tenascin-C

### *Korrelationsanalysen*

Bivariate Korrelationen zwischen parametrischen Variablen wurden anhand des Korrelationskoeffizienten nach Paerson getestet. Die gesteigerte ED-A<sup>+</sup> Fn und ED-B<sup>+</sup> Fn Genexpression im RV zeigt eine signifikante Korrelation zur histopathologisch nachgewiesenen entzündlichen Infiltration und Fibrose im RV. Für ED-A<sup>+</sup> Fn liegt der Korrelationskoeffizient r bei 0,653 für entzündliche Infiltration (p = 0,002); für Fibrose bei r = 0,464 (p = 0,045); für ED-B<sup>+</sup> Fn r = 0,723 für entzündliche Infiltration (p < 0,001); für Fibrose r = 0,530 (p = 0,019). Die ED-B<sup>+</sup> Fn Expression korreliert signifikant mit hämodynamischen Parametern wie dem RVPsys (r = 0,473, p = 0,047) und der TAPSE (r = -0,503, p = 0,028). Letztere sind in Abbildung 22 dargestellt.



**Abbildung 22: Korrelationsanalysen der mRNA-Genexpression von ED-B<sup>+</sup> Fn**

Dargestellt sind die Korrelationen zwischen ED-B<sup>+</sup> Fn im RV und dem RVPsys links und der TAPSE rechts.

Verwendete Abkürzungen: Fn: Fibronectin, r: Korrelationskoeffizient, RV: rechter Ventrikel, RVPsys: rechtsventrikulär systolischer Druck, TAPSE: *tricuspid annular plane systolic excursion*

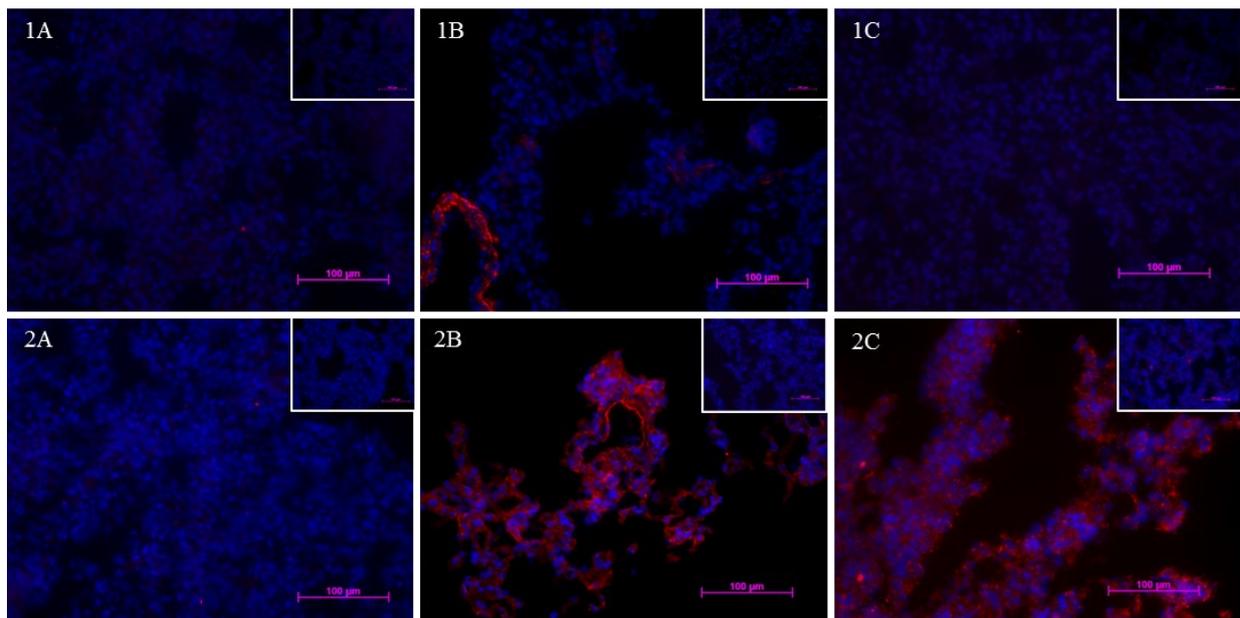
### 3.4 Immunfluoreszenz-Detektion von Fibronectin- und Tenascin-C-Varianten im Gewebe

Da nur für die Spleißvarianten, ED-A<sup>+</sup> Fn und B<sup>+</sup> Tn-C, Maus-anti-human-Antikörper existieren, welche eine Kreuzreaktivität im murinen System aufweisen, wurden aus der Lunge, dem RV und dem LV Kryoschnitte erstellt, welche einer Immunfluoreszenzmarkierung unterzogen wurden. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ mit Hilfe der LSM Software durch den relativen Anteil der angefärbten Fläche (in Prozent). Zu jedem Bild ist eine Negativkontrolle ohne primäre Antikörper vorhanden.

#### 3.4.1 Immunfluoreszenz-Detektion von B<sup>+</sup> Tn-C und ED-A<sup>+</sup> Fn in der Lunge

Abbildung 23 zeigt die repräsentativen Immunfluoreszenz-Aufnahmen von B<sup>+</sup> Tn-C und ED-A<sup>+</sup> Fn im Lungengewebe. Bei den Kontrolltieren konnte keine Gewebedeposition nachgewiesen werden. In den Lungengewebeschnitten von Ratten der MCT-Gruppe ist deutlich zu erkennen, dass vor allem Bereiche in der Gefäßwand und um die Gefäße angefärbt sind. Während dies bei B<sup>+</sup> Tn-C bei den therapierten Tieren nicht mehr zu erkennen ist, zeigen sich bei ED-A<sup>+</sup> Fn unspezifische Cy3 angefärbte Bereiche. Die Abbildungen aus den Negativkontrollen ohne angefärbte Bereiche sind der Beweis, dass der verwendete Antikörper spezifisch die jeweilige Spleißvariante detektiert. In Abbildung 24 ist die semiquantitative

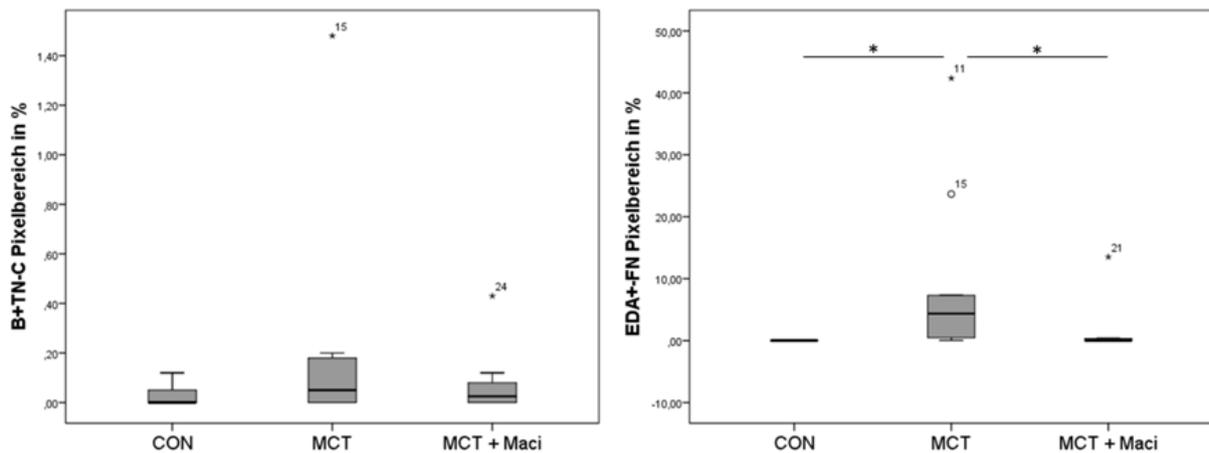
Auswertung durch den relativen Anteil der angefärbten Fläche (in Prozent) dargestellt. Dabei zeigt sich für die B<sup>+</sup> Tn-C-Spleißvariante ein Anstieg in der MCT-Gruppe ( $0,21 \pm 0,41$ ) im Vergleich zur CON-Gruppe ( $0,03 \pm 0,04$ ), sowie zur MCT+MACI-Gruppe ( $0,07 \pm 0,13$ ), jedoch sind die Unterschiede innerhalb der drei Gruppen nicht signifikant. Bei der ED-A<sup>+</sup> Fn-Spleißvariante sieht man, dass die Deposition in der MCT-Gruppe ( $9,02 \pm 12,92$ ,  $p < 0,01$ ) im Vergleich zu CON-Gruppe ( $0,02 \pm 0,02$ ) deutlich zunimmt. Im Vergleich zur MCT-Gruppe nehmen die ED-A<sup>+</sup> Fn-Proteindepotionen in der MCT+MACI-Gruppe ( $1,44 \pm 4,02$ ,  $p = 0,05$ ) wieder ab.



**Abbildung 23: Immunfluoreszenz-Detektion von B<sup>+</sup> TN-C und ED-A<sup>+</sup> FN in der Lunge**

Dargestellt ist die Immunfluoreszenzmarkierung (rote Fluoreszenz) von B<sup>+</sup> Tn-C (1A-1C) und ED-A<sup>+</sup> Fn (2A-2C) der Kontrollen (A), der MCT-Gruppe (B) und der MCT+MACI-Gruppe (C). Vergrößerung: x 20. Der jeweils kleine Bildausschnitt repräsentiert eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper.

Verwendete Abkürzungen: Cy3: Cyanin 3, Fn: Fibronectin, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, Tn-C: Tenascin-C



**Abbildung 24: Semiquantitative Analyse der B<sup>+</sup>Tn-C - und ED-A<sup>+</sup>Fn - Deposition in der Lunge**  
 Darstellung der B<sup>+</sup>Tn-C-Deposition (**links**) und der ED-A<sup>+</sup>Fn-Deposition (**rechts**) in der Lunge im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*, p < 0,05)  
 Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, Fn: Fibronectin, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, Tn-C: Tenascin-C

### 3.4.2 Immunfluoreszenz-Detektion von B<sup>+</sup>Tn-C und ED-A<sup>+</sup>Fn im rechten Ventrikel

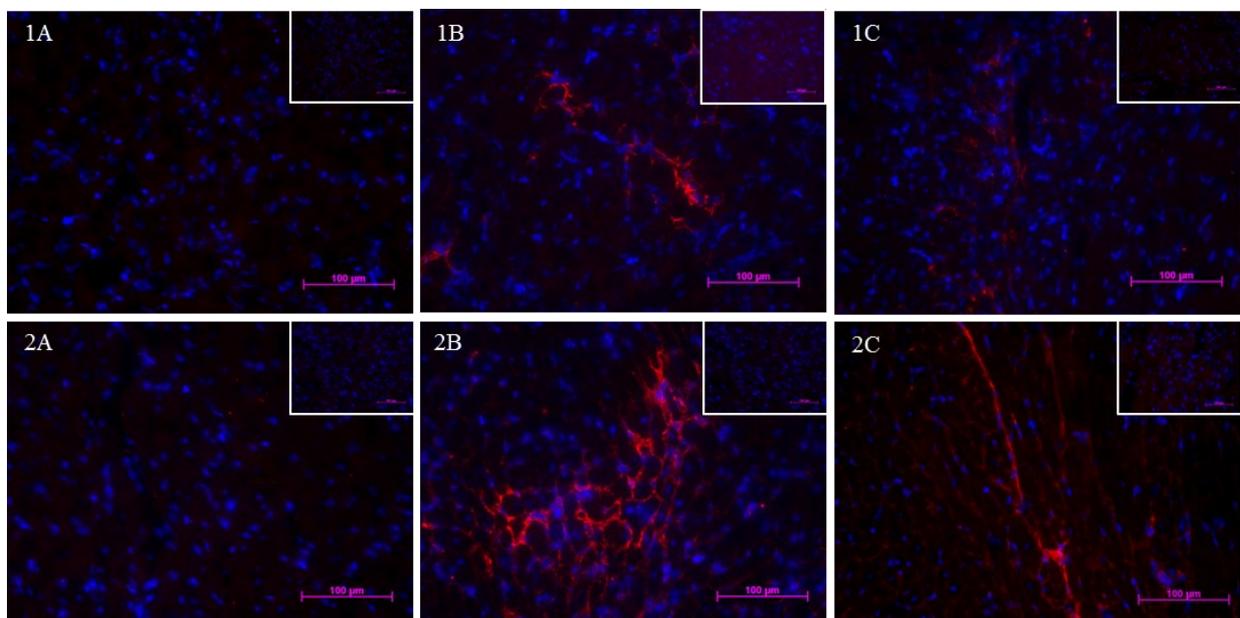
Abbildung 25 zeigt repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von B<sup>+</sup>Tn-C und ED-A<sup>+</sup>Fn im rechten Ventrikel. Innerhalb der Kontrolltiere lässt sich kein Nachweis einer Deposition erbringen. Die B<sup>+</sup>Tn-C - beziehungsweise ED-A<sup>+</sup>Fn - Deposition innerhalb der MCT-Gruppe zeigt sich in der Abbildung in deutlicher räumlicher Assoziation zu Gefäßstrukturen. In der MCT+MACI-Gruppe ist dieser Befund weniger ausgeprägt. In den Negativkontrollen lässt sich keine Immunfluoreszenz nachweisen. In Abbildung 26 ist die semiquantitative Auswertung durch den relativen Anteil der angefärbten Fläche (in Prozent) dargestellt. Die B<sup>+</sup>Tn-C-Depositionen im RV sind in der MCT-Gruppe ( $1,57 \pm 1,85$ , p < 0,01) und in der MCT+MACI-Gruppe ( $0,6 \pm 1,27$ , p < 0,05) signifikant höher als in der CON-Gruppe ( $0,02 \pm 0,03$ ). Im Vergleich zur MCT-Gruppe zeigen sie sich in der MCT+MACI-Gruppe signifikant geringer.

Während in der CON-Gruppe ( $0,85 \pm 1,17$ ) semiquantitativ nahezu keine ED-A<sup>+</sup>Fn-Deposition im RV nachweisbar ist, zeigt sich in der MCT-Gruppe ( $10,11 \pm 14,84$ , p < 0,05) ein signifikanter Anstieg. Die Deposition nimmt in der MCT+MACI-Gruppe ( $4,37 \pm 10,06$ ) tendenziell wieder ab.



### 3.4.3 Immunfluoreszenz-Detektion von B<sup>+</sup> Tn-C und ED-A<sup>+</sup> Fn im linken Ventrikel

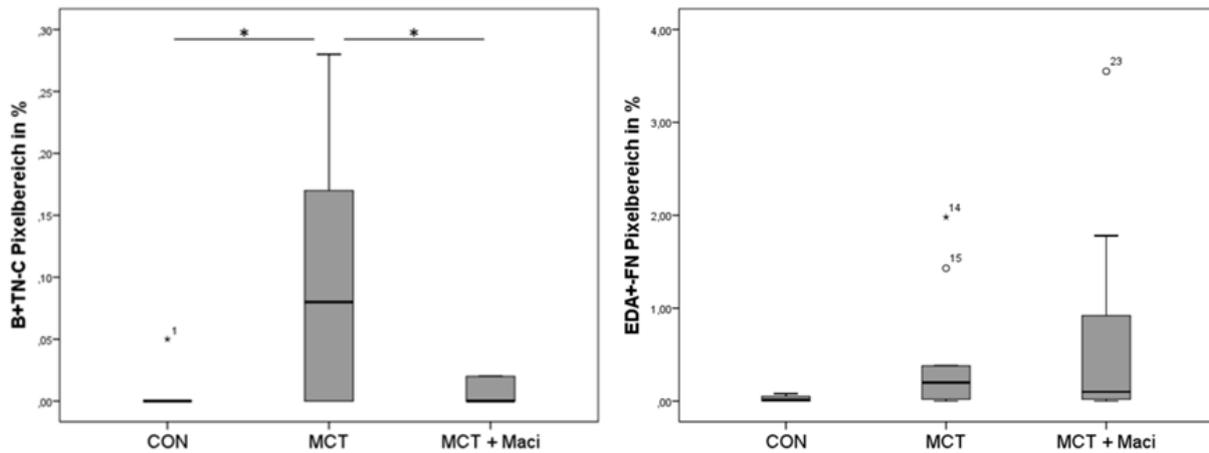
Abbildung 27 zeigt repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von B<sup>+</sup> Tn-C und ED-A<sup>+</sup> Fn im linken Ventrikel. Bei den Kontrolltieren lassen sich weder relevante Depositionen von B<sup>+</sup> Tn-C noch von ED-A<sup>+</sup> Fn detektieren. In den Myokardgewebeschnitten von Ratten der MCT-Gruppe hingegen ist eine gelegentlich spärliche Proteindeposition nachweisbar. In Abbildung 28 ist die semiquantitative Auswertung durch den relativen Anteil der angefärbten Fläche (in Prozent) dargestellt. Diese ergibt innerhalb der MCT-Gruppe ( $0,1 \pm 0,09$ ,  $p < 0,05$ ) eine signifikant vermehrte B<sup>+</sup> Tn-C-Deposition im Vergleich zur CON-Gruppe ( $0,01 \pm 0,02$ ). In der MCT+MACI-Gruppe ( $0,01 \pm 0,01$ ,  $p < 0,05$ ) ist die Deposition signifikant geringer im Vergleich zur MCT-Gruppe. Zwischen der CON-Gruppe und der MCT+MACI-Gruppe sind keine Unterschiede zu verzeichnen. Bei der semiquantitativen Auswertung der ED-A<sup>+</sup> Fn-Deposition ist ein Anstieg in der MCT-Gruppe ( $0,46 \pm 0,65$ ) im Vergleich zur CON-Gruppe ( $0,03 \pm 0,03$ ) zu verzeichnen, jedoch sind die Unterschiede innerhalb der drei Gruppen nicht signifikant. Insgesamt scheinen die Proteindepositionen im LV, verglichen mit dem RV und der Lunge, marginal und, auch in Anbetracht der histologischen Befunde, biologisch wenig relevant zu sein.



**Abbildung 27: Immunfluoreszenz-Detektion von B<sup>+</sup> Tn-C und ED-A<sup>+</sup> Fn im LV**

Dargestellt ist die Immunfluoreszenzmarkierung (rote Fluoreszenz) von B<sup>+</sup> Tn-C (1A-1C) und ED-A<sup>+</sup> Fn (2A-2C) der Kontrollen (A), der MCT-Gruppe (B) und der MCT+MACI-Gruppe (C). Vergrößerung: x 20. Der jeweils kleine Bildausschnitt repräsentiert eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper.

Verwendete Abkürzungen: Cy3: Cyanin 3, Fn: Fibronectin, LV: linker Ventrikel, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, Tn-C: Tenascin-C



**Abbildung 28: Semiquantitative Analyse der B<sup>+</sup> Tn-C - und ED-A<sup>+</sup> Fn - Deposition im LV**

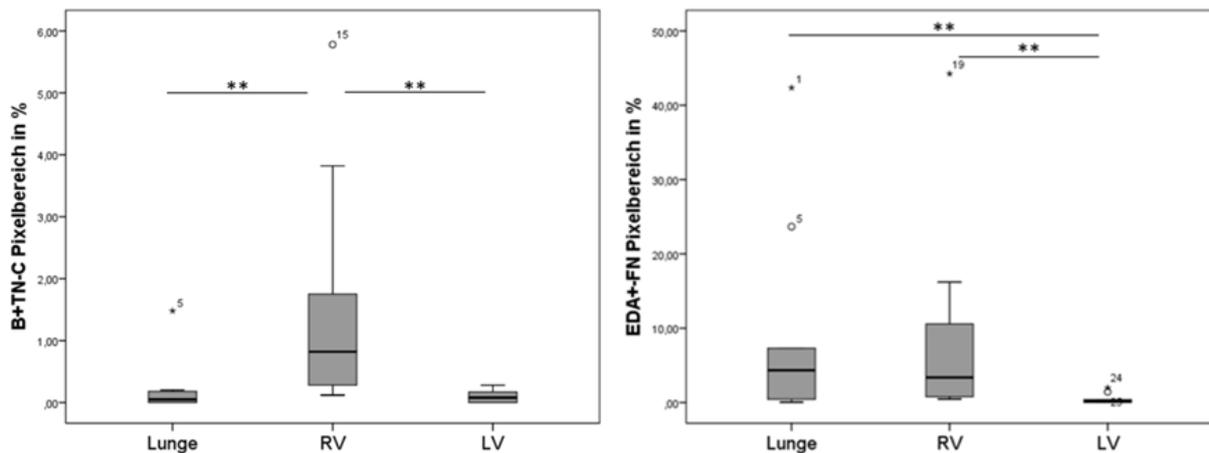
Darstellung der B<sup>+</sup> Tn-C-Deposition (**links**) und der ED-A<sup>+</sup> Fn-Deposition (**rechts**) im LV im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, LV: linker Ventrikel, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, Tn-C: Tenascin-C

### 3.4.4 Vergleich der Monocrotalin-Gruppen

Der Vergleich der differentiellen Proteindeposition innerhalb der MCT-Gruppen erfolgt durch die semiquantitative Auswertung der relativen Anteile der gefärbten Fläche in Prozent. Die B<sup>+</sup> Tn-C-Deposition ist im RV ( $1,57 \pm 1,85$ ) im Vergleich zur Lunge ( $0,21 \pm 0,41$ ) und dem LV ( $0,1 \pm 0,09$ ) in den erkrankten Tieren signifikant gesteigert ( $p_{\text{Lunge/RV}} < 0,006$ ;  $p_{\text{RV/LV}} < 0,000$ ).

Die ED-A<sup>+</sup> Fn - Deposition innerhalb der MCT-Gruppen ist im RV ( $10,11 \pm 14,84$ ,  $p < 0,01$ ) und in der Lunge ( $9,02 \pm 12,92$ ,  $p < 0,01$ ) signifikant höher als im LV ( $0,46 \pm 0,65$ ). Zwischen der Lunge und dem RV besteht kein signifikanter Unterschied (**Abbildung 29**).

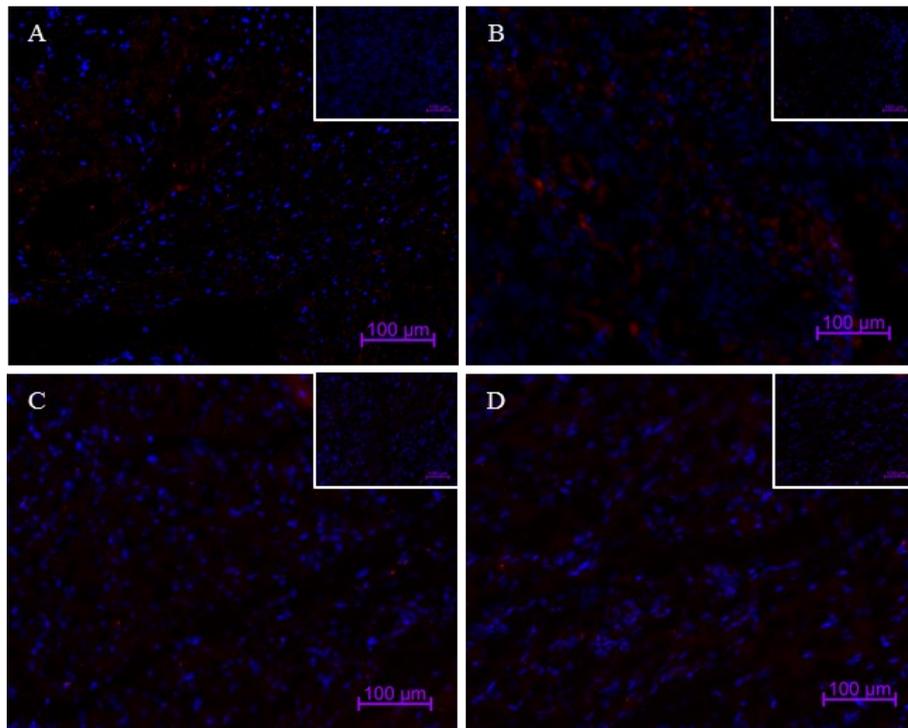


**Abbildung 29: Semiquantitative Analyse der B<sup>+</sup> Tn-C - und ED-A<sup>+</sup> Fn - Deposition in den MCT-Gruppen**

Darstellung der B<sup>+</sup> Tn-C-Deposition (**links**) und der ED-A<sup>+</sup> Fn-Deposition (**rechts**) in den MCT-Gruppen aus Lunge, RV und LV im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01)

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, Fn: Fibronectin, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, Tn-C: Tenascin-C

Neben den bisher hinsichtlich ihrer Proteindeposition im Gewebe dargestellten fetalen Varianten B<sup>+</sup> Tn-C und ED-A<sup>+</sup> Fn, existieren eine Reihe weiterer Varianten (siehe Genexpressionsanalysen Kapitel 3.3.1). Gegen eine Vielzahl dieser Spleißvarianten sind spezifische Antikörper verfügbar – in der Regel sind diese Maus–anti-human–Antikörper. Im Einzelnen stehen zur Verfügung: C6 (ED-B<sup>+</sup> Fn), BC1 (ED-B<sup>+</sup> Fn), III12TN (D<sup>+</sup> Tn-C) und BC-2 (A1/A4<sup>+</sup> Tn-C), siehe Tabelle 2. Bislang existieren keine Daten, ob diese Antikörper auch im murinen System (Ratte, Maus) funktionieren. Da dies von hohem Interesse für weiterführende Analysen in unserem Modell ist, erfolgte eine Immunfluoreszenz-Analyse dieser Antikörper. In vielen Testreihen und nach mannigfaltigen Protokollmodifikationen gelang es nicht, spezifische Markierungen zur Detektion der genannten Spleißvarianten im Rattengewebe zu generieren (**Abbildung 30**).



**Abbildung 30: Immunfluoreszenz-Detektion von weiteren Fn- und Tn-C - Spleißvarianten im Myokardgewebe**

Dargestellt ist die Immunfluoreszenzmarkierung (rote Fluoreszenz) von Fn- und Tn-C – Spleißvarianten. **A:** C6 (ED-B<sup>+</sup> Fn), **B:** BC-1 (ED-B<sup>+</sup> Fn), **C:** III12TN (D<sup>+</sup> Tn-C), **D:** BC-2 (A1/A4<sup>+</sup> Tn-C). Vergrößerung: x 20. Der jeweils kleine Bildausschnitt repräsentiert eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper.

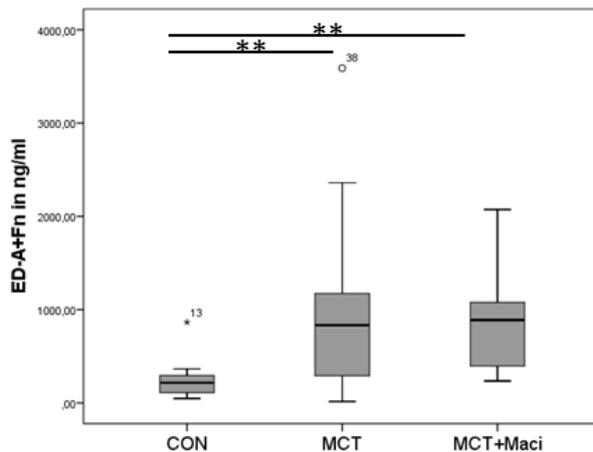
Verwendete Abkürzungen: Cy3: Cyanin 3; Fn: Fibronectin, Tn-C: Tenascin-C

### 3.5 Quantitative Analyse der Serumkonzentrationen von Fibronectin- und Tenascin-C-Spleißvarianten mittels ELISA

Von allen Versuchstieren stand Serum zur Verfügung, welches am Versuchsende gewonnen wurde. Es wurden die Serumkonzentrationen von ED-A<sup>+</sup> Fn, B<sup>+</sup> Tn-C und C<sup>+</sup> Tn-C in allen drei Versuchsgruppen unter Verwendung des unter 2.2.5 beschriebenen Protokolls ermittelt.

#### *ED-A<sup>+</sup> Fn*

Die Serumspiegel von ED-A<sup>+</sup> Fn wurden unter Verwendung des unter 2.2.5 beschriebenen Protokolls analysiert. Bei den Serumspiegeln der MCT-Gruppe (975,56 ng/ml ± 932,6 ng/ml) und der MCT+MACI-Gruppe (859,84 ng/ml ± 501,38 ng/ml) werden im Vergleich zur CON-Gruppe (240,23 ng/ml ± 201,53 ng/ml) signifikant höhere Werte detektiert ( $p_{\text{CON-MCT}} < 0,01$ ,  $p_{\text{CON-MCT+MACI}} < 0,01$ ). Der Abfall des ED-A<sup>+</sup>Fn Serumspiegels in der MCT+MACI-Gruppe ist im Vergleich zur MCT-Gruppe nicht signifikant (*Abbildung 31*).



**Abbildung 31: ED-A<sup>+</sup> Fn-Serumkonzentrationen im Vergleich der drei Versuchsgruppen**

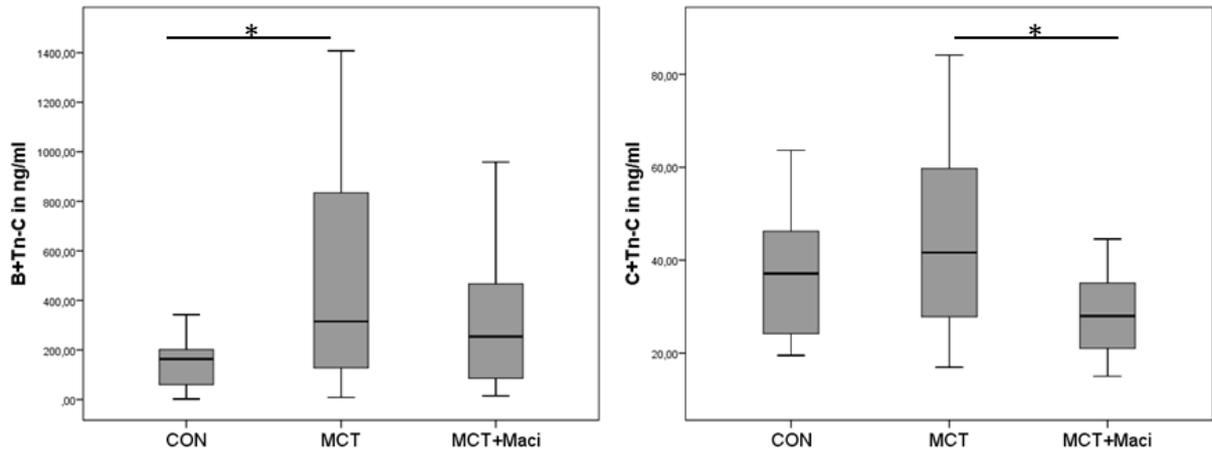
Darstellung der ED-A<sup>+</sup> Fn-Serumkonzentrationen im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*\*,  $p < 0,01$ ).

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, MCT: Monocrotalin, MACI: Macitentan, Fn: Fibronektin

### *B<sup>+</sup> Tn-C und C<sup>+</sup> Tn-C*

Die Serumspiegel von B<sup>+</sup> Tn-C und C<sup>+</sup> Tn-C wurden unter Verwendung des unter 2.2.5 beschriebenen Protokolls bestimmt. Bei B<sup>+</sup> Tn-C werden innerhalb der MCT-Gruppe (464,31 ng/ml ± 440,33 ng/ml,  $p < 0,05$ ) signifikant höhere Serumwerte im Vergleich zur CON-Gruppe (140,40 ng/ml ± 94,08 ng/ml) detektiert. Der Abfall der Serumspiegel innerhalb der MCT+MACI-Gruppe (305,64 ng/ml ± 240,89 ng/ml) im Vergleich zur MCT-Gruppe ist nicht signifikant.

Der Vergleich der C<sup>+</sup> Tn-C Serumkonzentrationen zwischen der CON-Gruppe (36,49 ng/ml ± 13,58 ng/ml) und der MCT-Gruppe (45,22 ng/ml ± 21,62 ng/ml) ergibt keinen signifikanten Unterschied. Innerhalb der MCT+MACI-Gruppe (28,61 ng/ml ± 9,02 ng/ml) ist im Vergleich zur MCT-Gruppe ein signifikanter Abfall der Serumspiegel zu verzeichnen (**Abbildung 32**).



**Abbildung 32: B<sup>+</sup> Tn-C und C<sup>+</sup> Tn-C Serumkonzentrationen im Vergleich der drei Versuchsgruppen**

Darstellung der B<sup>+</sup> Tn-C (**links**) und C<sup>+</sup> Tn-C (**rechts**) Serumkonzentrationen im Boxplot. Die Signifikanzen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests erhoben (\*,  $p < 0,05$ ).

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, Tn-C: Tenascin-C

## 4. Diskussion

Die Pulmonale Hypertonie geht mit einem Gewebeumbau der pulmonalarteriellen Gefäßstrukturen (vaskuläres *Remodelling*) und sekundär auch des druckbelasteten rechten Ventrikels (myokardiales *Remodelling*) einher. Dies ist verbunden mit einer Reorganisation der extrazellulären Matrix einschließlich des Wiederauftretens sogenannter onkofetaler Fibronectin- und Tenascin-C-Varianten. Diese Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix kommen im gesunden, reifen Gewebe nicht vor, können aber im Rahmen des kardiovaskulären *Remodellings* reexprimiert werden. Dies konnte für das *Remodelling* des Myokards bei koronarer Herzerkrankung und Aortenklappenstenose für ED-A<sup>+</sup> Fn und A1<sup>+</sup> Tn-C gezeigt werden (Baldinger *et al.* 2011). Bei PH-Patienten konnten erhöhte Serumkonzentrationen der Spleißvarianten B<sup>+</sup> Tn-C und C<sup>+</sup> Tn-C nachgewiesen werden (Rohm *et al.* 2017). Eine weiterführende Untersuchung verschiedener Spleißvarianten hinsichtlich deren Reexpression im Rahmen pulmonalvaskulärer und rechtsventrikulärer *Remodelling*-Prozesse ist von hohem wissenschaftlichem und klinischem Interesse. Angesichts dessen war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Untersuchung ausgewählter Spleißvarianten von Fibronectin und Tenascin-C im Rattenmodell der pulmonalen Hypertonie. Eine differenzierte Analyse zwischen Lunge, rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel ist von besonderer Bedeutung, um eine potentielle Spleißvariante zu identifizieren, welche isoliert in einem Kompartiment exprimiert wird und dadurch gezielt dessen Schädigung, insbesondere das prognostisch relevante rechtsventrikuläre *Remodelling*, im Rahmen der PH aufzeigt.

### *Tiermodell der Monocrotalin-induzierten PH*

Die Induktion der pulmonalen Hypertonie erfolgte in Sprague-Dawley-Ratten durch eine einmalige subkutane Injektion von Monocrotalin. Das Tiermodell wird bereits seit vielen Jahren verwendet und gilt als ein etabliertes Verfahren zur Induktion der pulmonalen Hypertonie in der Ratte (Campian *et al.* 2006). Die pathologischen Merkmale, welche nach MCT-Injektion beobachtet werden, weisen Ähnlichkeiten zur humanen pulmonalen Hypertonie auf. Diese sind histologisch gekennzeichnet durch eine pulmonalvaskuläre Endothelschädigung, gefolgt von einem *Remodelling* einschließlich der Mediahypertrophie glatter Muskelzellen und entzündlichen Infiltraten. Hämodynamisch zeigt sich eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes mit nachfolgender rechtsventrikulärer Hypertrophie. Die genauen Mechanismen der MCT-Wirkung sind unbekannt (Akhavain *et al.* 2007, Nogueira-Ferreira *et al.* 2015). Ein Nachteil des MCT-Modells ist die Toxizität von Monocrotalin.

Neben einer Hepatotoxizität ist eine direkte kardiale Schädigung durch Monocrotalin im Sinne einer Myokarditis beschrieben (Akhavain *et al.* 2007, Gomez-Arroyo *et al.* 2012, Nogueira-Ferreira *et al.* 2015). Dadurch kann unter Umständen nicht klar unterschieden werden, welche pathophysiologischen Mechanismen der PH-Erkrankung und welche der Toxizität zuzuschreiben sind. Unter den bestehenden PH-Versuchsmodellen ist das MCT-Modell jedoch dasjenige, welches am meisten zum Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung beiträgt und Ähnlichkeiten zur humanen PAH aufweist (Nogueira-Ferreira *et al.* 2015). Folgende drei experimentelle Gruppen wurden in der Arbeit vergleichend untersucht: gesunde Kontrolltiere (CON), Ratten mit MCT-induzierter PH (MCT) und Ratten mit MCT-induzierter PH behandelt mit dem dualen Endothelinrezeptor-Antagonist Macitentan (MCT+MACI, 15 mg/kg KG *per os* von Tag 14 bis 28 *p.i.*). Macitentan kann durch die Blockade von ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> Rezeptoren die Endothelin-1 vermittelte Vasokonstriktion, Zellproliferation und Inflammation hemmen (Iglarz *et al.* 2008).

Die Tiere wurden während der Versuchslaufzeit zweimal wöchentlich gewogen. Die Gewichtszunahme fiel bei den erkrankten Tieren deutlich geringer aus im Vergleich zu den gesunden Versuchstieren. Andere Studien konnten ähnliche Beobachtungen machen (Franz *et al.* 2016, Jung *et al.* 2017, Temple *et al.* 2014). Eine Reduktion des Wohlbefindens durch PH-Induktion ist eine wahrscheinliche Erklärung hierfür. Darüber hinaus ist bekannt, dass chronische Erkrankungen, wie Herzinsuffizienz oder Lungenerkrankungen, zu einer Kachexie führen. Eine hierbei häufig verstärkte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit Erhöhung der Angiotensin II – Spiegel scheint bedeutend in der Pathogenese der Kachexie zu sein (Yoshida und Delafontaine 2015). Die konsekutive Rechtsherzbelastung bei der PH mit Aktivierung des RAAS kann die reduzierte Gewichtszunahme der Ratten erklären. Hinzu kommt, dass die Rechtsherzinsuffizienz stauungsbedingt eine Gastritis verursachen kann. Patienten mit pulmonaler Hypertonie leiden häufig unter abdominellen Beschwerden, welche zu einer Einschränkung der Lebensqualität führen (Zlupko *et al.* 2008). In ähnlicher Weise könnte die Stauungsgastritis eine wahrscheinliche Erklärung der reduzierten Gewichtszunahmen durch die PH-Induktion darstellen. Unter durchgeführter Macitentantherapie fällt die Gewichtszunahme geringer aus als in der Kontrollgruppe, jedoch nahmen die Tiere mehr an Gewicht zu, verglichen mit der MCT-Gruppe. Eine vergleichbare Studie zeigt hingegen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Gewichtszunahme zwischen der MCT-Gruppe und der MCT+MACI-Gruppe (Temple *et al.* 2014).

Darüber hinaus konnte durch die Beobachtung der Tiere deren Gesundheitszustand anhand des *Clinical Severity Scores* (CSS) erhoben werden. Während die Kontrolltiere in der gesamten Versuchslaufzeit keine Krankheitsanzeichen entwickelten und sich aktiv verhielten, verschlechterte sich der Gesundheitszustand der Tiere in der MCT-Gruppe. Dies konnte bereits durch Franz *et al.* gezeigt werden (Franz *et al.* 2016). Die PH-Induktion führt zu einer starken Reduktion des Allgemeinzustands der Tiere. Die Therapie mit Macitentan kann eine Besserung des Gesundheitszustandes der Tiere bewirken.

Die Funktion und Morphologie des rechten Herzens wurde mittels Echokardiographie untersucht. Bei den erkrankten Ratten zeigen sich im Vergleich zur CON-Gruppe eine verminderte *tricuspid annular plane systolic excursion* (TAPSE) sowie eine vergrößerte Fläche des rechten Vorhofs. Die erkrankten Ratten zeigen deutliche Zeichen einer Rechtsherzbelastung. Zur invasiven Diagnostik erhielten die Tiere eine Rechtsherzkatheteruntersuchung. Dies ist der klinische Goldstandard zur hämodynamischen Evaluation der PH (Galie *et al.* 2016). Die Messung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVPsys) der Ratten zeigt einen relevanten Anstieg durch die PH Induktion. Dies konnte bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden (Franz *et al.* 2016, Kosanovic *et al.* 2011). Durch die Macitentantherapie weisen die Ratten eine weniger stark eingeschränkte Kontraktilität des rechten Ventrikels im Vergleich zu den nicht therapierten Ratten auf. Temple *et al.* beschrieben eine Reduktion der Wanddicke des rechten Ventrikels (Temple *et al.* 2014). Die Größe des rechten Vorhofs veränderte sich durch Macitentantherapie nicht. Eine Reversibilität der eingetretenen RA-Dilatation unter Druckbelastung ist unwahrscheinlich. Jedoch normalisierte sich der RVPsys unter Therapie sogar bis auf das Niveau der CON-Gruppe. Macitentan blockiert die spezifische Bindung von Endothelin-1 an ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren. Es wird angenommen, dass die therapeutische Wirkung von Macitentan auf einer verbesserten Endothelfunktion, einer Vasodilatation und einer verringerten Mediahypertrophie glatter Muskelzellen beruht (Iglarz *et al.* 2008). Es ist anzunehmen, dass die pulmonale Vasodilatation sowie die Inhibition der Proliferation glatter Muskelzellen den pulmonalen Blutfluss unter Therapie bedeutend verbessern. Die Beobachtungen decken sich mit den Resultaten aus der Studie von Temple *et al.*, in der an echokardiographisch ermittelten Parametern gezeigt werden konnte, dass die Behandlung mit Macitentan das Fortschreiten der PH im Monocrotalin-Modell verzögert (Temple *et al.* 2014).

Das verwendete Tiermodell konnte in der vorliegenden Arbeit anhand klinischer und echokardiographischer Parameter sowie anhand hämodynamischer Analysen validiert werden:

Es konnte gezeigt werden, dass Monocrotalin eine pulmonale Hypertonie induziert. Es kommt zum progredienten Rechtsherzversagen mit klinisch manifest erkrankten Tieren. Die Therapie mit dem dualen Endothelinrezeptor-Antagonist Macitentan verbessert im Rattenmodell die klinischen, echokardiographischen und hämodynamischen Parameter.

#### *Histopathologische Gewebeschädigung in der Lunge, im rechten Ventrikel und im linken Ventrikel nach PH-Induktion*

Die histologische Analyse der Lungengewebsschädigung erfolgte an HE-gefärbten Paraffinschnitten anhand eines semiquantitativen Summen-Scores. Dieser wurde in der Arbeitsgruppe entwickelt und beinhaltet die Begutachtung von Atelektase- und Emphysembereichen, die Mediahypertrophie der peribronchialen Arterien, perivaskuläre zelluläre Ödeme der peribronchialen Arterien und die Mediahypertrophie der kleinen Arterien (Franz *et al.* 2016). Bei den gesunden Kontrolltieren zeigen sich keinerlei Schädigungsmuster. Durch MCT-Injektion steigt der Summen-Score bei den erkrankten Tieren deutlich an. Es zeigt sich eine ausgeprägte Mediahypertrophie der peribronchialen und kleinen Arterien. Die histopathologische Schädigung innerhalb des Lungengewebes nach PH-Induktion ist bereits bekannt (Franz *et al.* 2016). In den mit Macitentan therapierten Versuchstieren konnten niedrigere Scores im Vergleich zu den nicht-therapierten Tieren ermittelt werden. Der pulmonale Gewebeumbau ist hier geringer ausgeprägt. Shinohara *et al.* beschrieben die therapeutischen Effekte von Macitentan im Hypoxie-induzierten PH-Tiermodell. Hierbei konnten sie ebenfalls positive Veränderungen im Lungengewebe der behandelten Tiere nachweisen, unter anderem einen verringerten Anteil okklusiver Läsionen, eine geringere Mediaverdickung und Fibrose (Shinohara *et al.* 2015). Der therapeutische Effekt kann möglicherweise durch die Blockade der Endothelin-1-vermittelten Kollagensynthese, Zellproliferation und Inflammation in der Lunge erklärt werden (Iglarz *et al.* 2008).

Die histologische Analyse der Myokardschädigung erfolgte an HE-gefärbten Paraffinschnitten. Der rechte Ventrikel und der linke Ventrikel wurden separat anhand des Ausmaßes von Fibrose und entzündlicher Infiltration semiquantitativ bewertet. Im rechten Ventrikel zeigt sich im Vergleich zur CON-Gruppe sowohl in der MCT-Gruppe als auch in der MCT+MACI-Gruppe eine signifikant verstärkte Fibrose und entzündliche Infiltration. Frangogiannis beschrieb, dass die konsekutiv erhöhte rechtsventrikuläre Druckbelastung mit einer Vermehrung von Fibroblasten, der Aktivierung zu Myofibroblasten und der verstärkten Deposition extrazellulärer Matrixproteine assoziiert ist. Die Aktivierung der Fibroblasten im rechten Ventrikel erfolgt durch sympathisch-adrenerge Stimulation und das Renin-

Angiotensin-Aldosteron-System. Inflammatorische Zytokine tragen zur Makrophagenaktivierung bei, welche wiederum den *transforming growth factor-β* (TGF-β) freisetzen. Endothelin-1 und TGF-β aktivieren Myofibroblasten zur Synthese von extrazellulären Matrixproteinen (Frangogiannis 2017). Bei den inflammatorischen Zytokinen handelt sich unter anderem um den Tumornekrosefaktor-α, Interleukin-6 und Toll-like-Rezeptoren (Samson und Paulin 2017). Die in diesem Tierversuch nachgewiesene entzündliche Infiltration konnte ebenfalls durch Campian *et al.* im rechten Ventrikel von Ratten nach MCT-Injektion anhand einer erhöhten Gallium-Aufnahme in der Myokardszintigraphie gezeigt werden (Campian *et al.* 2010). Im vorliegenden Versuch konnte die Therapie mit Macitentan die Fibrose und entzündliche Infiltration im rechten Ventrikel nicht signifikant senken. Bei der pulmonalen Hypertonie kommt es zu einer organspezifischen Aktivierung des Endothelinsystems mit veränderten Expressionsmustern von ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Clozel 2016, Iglarz *et al.* 2015). Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die histopathologischen Gewebeschädigungen unter Macitentantherapie in der Lunge deutlich geringer sind als im rechten Ventrikel, da Macitentan möglicherweise durch eine höhere Dichte an ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren in der Lunge hier effektiver wirken kann.

In histopathologischen Gewebeschnitten des linken Ventrikels zeigen sich keine fibrotischen Areale und eine nur marginale entzündliche Infiltration in der MCT-Gruppe sowie in der MCT+MACI-Gruppe. In Studien, die sich mit dem linken Ventrikel MCT-induzierter Ratten beschäftigten, konnte gezeigt werden, dass es dort zu einer neuroendokrinen Aktivierung mit Expressionssteigerung des Angiotensin-*Converting*-Enzyms und ET-1 kommt und Ratten mit einer schweren PH eine linksventrikuläre Dysfunktion entwickeln. Jedoch zeigt sich keine Myokardhypertrophie oder Fibrose im linken Ventrikel (Correia-Pinto *et al.* 2009, Lourenco *et al.* 2006). Wie eingangs erwähnt, besteht die Überlegung, dass Monocrotalin womöglich eine direkt toxische Wirkung auf das Myokard hat (Akhavain *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit präsentiert sich der linke Ventrikel im Vergleich zum rechten Ventrikel histopathologisch allerdings nur marginal verändert. Demzufolge scheint es unwahrscheinlich, dass Monocrotalin hier generalisiert toxisch wirkt und eine Myokarditis auslöst.

Zusammenfassend zeigen die histopathologischen Untersuchungen eine Schädigung des Lungengewebes und des rechtsventrikulären Myokards als Folge des induzierten pulmonalen Hochdrucks durch Monocrotalin. Macitentan verbessert die klinischen,

echokardiographischen und hämodynamischen Parameter und führt zu einer deutlichen Abmilderung der histopathologisch fassbaren Gewebeschädigung in der Lunge.

#### *Analyse der Fn- und Tn-C-Spleißvarianten in der Lunge, im rechten Ventrikel und im linken Ventrikel*

Im frühen Krankheitsstadium der PAH kommt es zu Veränderungen der extrazellulären Matrix pulmonaler Gefäße. Eine Bedeutung der Spleißvarianten der extrazellulären Matrixproteine Fibronectin und Tenascin-C konnte für pathologische *Remodelling*-Prozesse bei kardiovaskulären Erkrankungen bereits gezeigt werden (Franz *et al.* 2010). Eine detaillierte Analyse der differentiellen Expression der Spleißvarianten ist im Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie von großem Interesse. Hierfür erfolgte im MCT-Tiermodell zunächst eine Genexpressionsanalyse in der Lunge, im rechten Ventrikel und im linken Ventrikel. Mittels qRT-PCR konnte die mRNA-Expression von mehreren Fibronectin- und Tenascin-C-Spleißvarianten in den verschiedenen Geweben untersucht werden, darunter: ED-A<sup>+</sup> Fn, ED-B<sup>+</sup> Fn, B<sup>+</sup> Tn-C, C<sup>+</sup> Tn-C, D<sup>+</sup> Tn-C und AD1<sup>+</sup> Tn-C. Im zweiten Schritt erfolgte deren immunhistochemischer Nachweis im Gewebe mittels Immunfluoreszenz. Hierfür wurden spezifische Antikörper verwendet um die Deposition der Matrixproteine im Gewebe darzustellen und zu quantifizieren. Dies konnte für die Spleißvarianten ED-A<sup>+</sup> Fn und B<sup>+</sup> Tn-C realisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Antikörper in der Immunfluoreszenz getestet, hierunter Antikörper gegen ED-B<sup>+</sup> Fn, D<sup>+</sup> Tn-C und A1/A4<sup>+</sup> Tn-C. Jedoch zeigte keiner der verfügbaren Maus-anti-human- Antikörper eine suffiziente Reaktivität im Rattengewebe. Der immunhistochemische Nachweis weitere Spleißvarianten mit bereits etablierten Antikörpern wäre von großem Interesse um die gewonnen Erkenntnisse auf Genexpressionsebene weiter zu verfolgen. Um einen potentiellen Biomarker zu identifizieren, welcher eine Serumliberation zeigt und somit unter pathologischen Zuständen ansteigt und unter Therapie abfällt ist eine Messung der Serumkonzentrationen innerhalb der drei Versuchsgruppen notwendig. Hierfür erfolgte eine Messung der Serumspiegel von ED-A<sup>+</sup> Fn, B<sup>+</sup> Tn-C und C<sup>+</sup> Tn-C mittels ELISA. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Spleißvarianten diskutiert.

#### *ED-A<sup>+</sup>Fn*

Die Genexpressionsanalyse von ED-A<sup>+</sup> Fn zeigt in der Lunge und im linken Ventrikel keinen relevanten Anstieg innerhalb der MCT-Gruppen (kleiner 2,5-fach). Im rechten Ventrikel zeigt sich eine 3,7-fache Expressionssteigerung innerhalb der erkrankten Tiere im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Die verstärkte ED-A<sup>+</sup> Fn Genexpression korreliert hierbei zur histopathologisch nachgewiesenen entzündlichen Infiltration und Fibrose im rechten Ventrikel. Bereits 1990 beschrieben Borsi *et al.*, dass das Spleißmuster der prä-mRNA, in dem Fall die Extradomäne A und B von Fibronektin, durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  reguliert wird (Borsi *et al.* 1990). Auch Serini *et al.* zeigten, dass TGF- $\beta$  die Synthese extrazellulärer Matrixmoleküle, einschließlich ED-A<sup>+</sup> Fn, verstärkt und dies die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten fördert (Serini *et al.* 1998). Darüber hinaus kann ED-A<sup>+</sup> Fn den Toll-like-Rezeptor-4 aktivieren wodurch es zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommt (Okamura *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die verstärkte Genexpression mit einer sichtbaren Proteindeposition im rechten Ventrikel erkrankter Tiere einhergeht. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann vermutet werden, dass ED-A<sup>+</sup> Fn an dem fortschreitenden Gewebeumbau mit entzündlicher Infiltration und Fibrose im rechten Ventrikel beteiligt ist. Die Macitentherapie hat keinen relevanten Einfluss auf die Genexpression von ED-A<sup>+</sup> Fn. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, dass Macitentan auch die Fibrose und entzündliche Infiltrationen im rechten Ventrikel nicht signifikant beeinflussen kann. In der Immunfluoreszenz zeigt sich jedoch eine deutlich geringere Proteindeposition bei den therapierten Tieren. Eine genauere Analyse mittels Westernblot-Verfahren könnte in zukünftigen Untersuchungen die Proteinmenge exakter quantifizieren.

In der Lunge zeigen sich die ED-A<sup>+</sup> Fn Proteindepositionen vor allem in räumlicher Assoziation zu Gefäßstrukturen und auch im Lungenparenchym. Obwohl ED-A<sup>+</sup> Fn im Gewebe nachweisbar ist, zeigt sich auf mRNA Ebene keine verstärkte Expression. Die fehlende Korrelation zwischen mRNA- und Proteinlevel kann ihre Ursache in posttranskriptionellen Mechanismen haben, die Einfluss auf das Ausmaß der Proteinsynthese nehmen aber auch in einer unterschiedlichen Halbwertszeit der Proteine (Greenbaum *et al.* 2003). Eine Erklärung, weshalb ED-A<sup>+</sup> Fn Proteindepositionen in der Lunge vorhanden sind obwohl keine verstärkte mRNA-Expression nachweisbar ist könnte in einer zeitlich limitierten Genexpression liegen, die nach PH-Induktion beginnt und im Verlauf wieder sistiert, während sich die Proteine aufgrund ihrer langen Halbwertszeit im Gewebe persistierend nachweisen lassen. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste man das Studiendesign abwandeln. Die Gewebeuntersuchungen dürften nicht erst an Tag 28 *p.i.* durchgeführt werden sondern müssten an mehreren Tagen im Verlauf nach PH-Induktion erfolgen, sodass eine longitudinale Messreihe entsteht. So wäre es hypothetisch möglich den Zeitpunkt eines ED-A<sup>+</sup> Fn mRNA-Expressionsgipfels in der Lunge zu detektieren. Unter

Macitentantherapie lassen sich signifikant geringere ED-A<sup>+</sup> Fn Proteindepositionen nachweisen. Lambers *et al.* beschrieben die Endothelin-1-vermittelten Effekte im vaskulären *Remodelling*. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Endothelin-1 die TGF- $\beta$ -vermittelten extrazellulären Matrixproteindepositionen intensiviert und es zu einer verstärkten Synthese von Kollagen Typ 1 und Fibronectin kommt (Lambers *et al.* 2013). ET-1 konnte sowohl im Plasma als auch im Lungengewebe von PAH-Patienten sowie in Tiermodellen nachgewiesen werden und die duale Blockade der Endothelinrezeptoren ist eine etablierte Therapieoption (Galie *et al.* 2004). Anhand der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass Macitentan die ED-A<sup>+</sup> Fn-Deposition in der Lunge reduzieren kann.

Im linken Ventrikel der erkrankten Tiere zeigt sich keine relevante Genexpression und eine deutlich geringere ED-A<sup>+</sup> Fn Proteindeposition im Vergleich zum rechten Ventrikel und zur Lunge. Ähnlich wie histopathologisch gezeigt, sind die Veränderungen im linken Ventrikel deutlich geringer ausgeprägt.

Erhöhte Serumkonzentrationen von ED-A<sup>+</sup> Fn im Rattenmodell der MCT-induzierten PH wurden bereits von Franz *et al.* beschrieben (Franz *et al.* 2016). Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Hypothetisch kann ED-A<sup>+</sup> Fn sowohl aus veränderten Lungengefäßen als auch aus dem belasteten rechten Ventrikel ins Blut freigesetzt werden, da sich sowohl in der Lunge als auch im rechten Ventrikel verstärkt ED-A<sup>+</sup> Fn im Gewebe nachweisen lässt. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz erwies sich ED-A<sup>+</sup> Fn als potentiell vielversprechender Biomarker für das kardiovaskuläre *Remodelling*. Hierbei korrelierten die ED-A<sup>+</sup> Fn Serumwerte auch mit dem systolischen Lungenarteriendruck (Ziffels *et al.* 2016). Unter Macitentantherapie zeigen sich in der vorliegenden Arbeit tendenziell geringere ED-A<sup>+</sup> Fn-Serumwerte als bei den nicht-therapierten Tieren. Die Eignung als potentieller Biomarker für das *Remodelling* im Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie müsste in einem großen Kollektiv von Patienten untersucht werden.

#### *ED-B<sup>+</sup> Fn*

Die Expression von ED-B<sup>+</sup> Fn ist in allen drei untersuchten Geweben biologisch relevant gesteigert. Im rechten Ventrikel unterliegt ED-B<sup>+</sup> Fn der stärksten Expressionssteigerung auf ein *Fold change* von 7,34 und fällt unter Macitentantherapie auf ein *Fold change* von 2,34 ab. In einer Studie an Transplantatnephropathien konnte gezeigt werden, dass die ED-B<sup>+</sup> Fn Expression durch Endothelin-1 und dessen Wechselwirkung mit TGF- $\beta$  gesteigert wird (Siddiqui *et al.* 2006). Eine Blockade der Endothelinrezeptoren durch Macitentan hat

möglicherweise direkten Einfluss auf die ED-B<sup>+</sup> Fn Genexpression im rechten Ventrikel von Tieren mit pulmonaler Hypertonie. Die ED-B<sup>+</sup> Fn Genexpression korreliert darüber hinaus signifikant mit Parametern wie dem RVPsys und invers mit der TAPSE. Weisen Ratten eine stärkere hämodynamische Beeinträchtigung auf, die sich in einem erhöhten RVPsys und einer verminderten TAPSE widerspiegelt, so ist dies mit einer verstärkten ED-B<sup>+</sup> Fn Genexpression im rechten Ventrikel assoziiert. Dies lässt darauf schließen, dass ED-B<sup>+</sup> Fn vor allem lokal im druckbelasteten rechtsventrikulären Gewebe überexprimiert ist und somit möglicherweise an der Pathogenese der Rechtsherzinsuffizienz durch die PH beteiligt ist. Um eine so weitreichende Schlussfolgerung zu ziehen müsste untersucht werden, ob ED-B<sup>+</sup> Fn auch über die Genexpressionsebene hinaus im Gewebe oder im Plasma nachzuweisen ist. Die Reexpression der Spleißvariante ED-B<sup>+</sup> Fn im rechten Ventrikel mit Assoziation zur Hämodynamik erweist sich jedoch als sehr vielversprechend und es sollten zukünftige Untersuchungen folgen.

#### *B<sup>+</sup> Tn-C*

Die Genexpressionsanalyse von B<sup>+</sup> Tn-C zeigt im rechten Ventrikel (*Fold change* 10,75 fach) und im linken Ventrikel eine relevante gesteigerte Expression (*Fold change* 6,11 fach). Im Gegensatz dazu findet sich in der Lunge erkrankter Tiere keine biologisch relevante Regulation. Dies deckt sich auch mit Ergebnissen der Immunfluoreszenzanalyse. Wie bereits Franz *et al.* beschrieben, kann auch in der vorliegenden Arbeit keine verstärkte B<sup>+</sup> Tn-C Deposition in der Lunge nachgewiesen werden (Franz *et al.* 2016). Im rechten Ventrikel kommt es zur stärksten Steigerung der B<sup>+</sup> Tn-C-Synthese. Auf Proteinebene kann dies anhand ausgeprägter Depositionen bestätigt werden. Zwar kommt es auch im linken Ventrikel zu einer Induktion der mRNA-Expression, jedoch spiegelt sich dies nicht auf Proteinebene wieder. Wie bereits erwähnt, könnten posttranskriptionelle Mechanismen Einfluss auf die Proteinentstehung haben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass B<sup>+</sup> Tn-C bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie der dilatativen Kardiomyopathie, das Ausmaß des *Remodellings* widerspiegelt (Franz *et al.* 2013). In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass es vor allem im rechten Ventrikel zu einer B<sup>+</sup> Tn-C-Geninduktion und assoziierten Proteindeposition kommt und B<sup>+</sup> Tn-C sich somit als potentieller Marker des rechtsventrikulären *Remodellings* in der pulmonalen Hypertonie eignen könnte.

Unter Macitentantherapie zeigt sich eine partielle Reversibilität sowohl auf Genebene als auch auf Proteinebene. Die Regulation der Tenascin-C-Spleißvarianten erfolgt über Wachstumsfaktoren, speziell durch TGF- $\beta$ , sowie durch proinflammatorische Zytokine und

über den intrazellulären pH-Wert (Giblin und Midwood 2015). Womöglich kann auch hier durch eine Hemmung der Endothelin-1-assoziierten TGF- $\beta$ -Signalweges eine Verbesserung unter Therapie erklärt werden.

Die Messung der Serumspiegel von B<sup>+</sup> Tn-C zeigt erhöhte Werte in den erkrankten Tieren. Rohm *et al.* konnten dies bereits bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie nachweisen und eine positive Korrelation zum systolischen PAP, zum BNP und zum 6-Minuten-Gehtest aufzeigen (Rohm *et al.* 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte unter Macitentantherapie eine tendenzielle Verringerung der Serumkonzentrationen nachgewiesen werden. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die herausragende Bedeutung von B<sup>+</sup>Tn-C als potentieller Biomarker des rechtsventrikulären *Remodellings* der PH.

### *C<sup>+</sup> Tn-C*

Es ist bekannt, dass Tenascin-C im MCT-Rattenmodell verstärkt im rechten Ventrikel exprimiert ist (Hessel *et al.* 2009). Jedoch gibt es noch keine Untersuchung hinsichtlich der Reexpression der Spleißvariante C<sup>+</sup> Tn-C im Rattenmodell der pulmonalen Hypertonie. In der vorliegenden Arbeit konnte eine biologisch relevante Expressionssteigerung von C<sup>+</sup> Tn-C im rechten Ventrikel erkrankter Tiere nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu sind die Lunge und der linke Ventrikel nicht von einer relevanten Regulation betroffen. Die Macitentantherapie hat im rechten Ventrikel kaum einen Einfluss auf die Genexpression von C<sup>+</sup> Tn-C. Tendenziell kommt es zur verringerten C<sup>+</sup> Tn-C Expression, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Weshalb Macitentan die B<sup>+</sup> Tn-C Expression im rechten Ventrikel signifikant senkt, der Einfluss auf die C<sup>+</sup> Tn-C Expression jedoch geringer ist, bleibt unklar.

Die Untersuchung der Serumspiegel der Molekülvariante C<sup>+</sup> Tn-C zeigen keine relevanten Befunde im Vergleich der drei Gruppen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der CON- und der MCT-Gruppe gemessen werden. Rohm *et al.* konnten andere Ergebnisse präsentieren. Sie zeigten erhöhte C<sup>+</sup> Tn-C Serumspiegel bei PH Patienten der Gruppe 2 (Rohm *et al.* 2017). Die Patienten weisen als Ursache der pulmonalen Hypertonie eine Linksherzerkrankung auf. Möglicherweise kommt es im Zuge dessen zu erhöhten C<sup>+</sup> Tn-C-Serumspiegel. Franz *et al.* konnten bei Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie infolge einer hypertensiven Herzerkrankung erhöhte C<sup>+</sup> Tn-C-Serumspiegel detektieren (Franz *et al.* 2009). Es ist wahrscheinlich, dass Linksherzremodelling-Prozesse zu einer gesteigerten C<sup>+</sup> Tn-C-Serumliberation führen.

### *D<sup>+</sup> Tn-C und AD1<sup>+</sup> Tn-C*

Über die Spleißvarianten D<sup>+</sup> Tn-C und AD1<sup>+</sup> Tn-C gibt es in der Literatur nur sehr wenige Berichte. Die verwendeten Primer zur Genexpressionsanalyse stammten aus einer Arbeit von Dobbertin *et al.*, in welcher eine verstärkte Expressionen von D<sup>+</sup> Tn-C im zentralen Nervensystem nach kortikalen Läsionen beobachtet wurde (Dobbertin *et al.* 2010). Die durchgeführten Genexpressionsanalysen von D<sup>+</sup> Tn-C und AD1<sup>+</sup> Tn-C zeigen im vorliegenden Tiermodell eine gesteigerte Expression im rechten Ventrikel und im linken Ventrikel erkrankter Tiere. Im Lungengewebe findet sich keine relevante Regulation. Insbesondere AD1<sup>+</sup> Tn-C wird möglicherweise verstärkt im Myokard als Reaktion auf die induzierte PH exprimiert. Es bleibt unklar, weshalb es bei D<sup>+</sup> Tn-C im linken Ventrikel zu einer deutlich stärkeren Expressionssteigerung kommt. Womöglich liegt hier eher eine unspezifische Aktivierung vor welche nicht mit einer PH-assoziierten Myokardbelastung zusammenhängt. Die Rolle von D<sup>+</sup> Tn-C im Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie bleibt somit aktuell unklar.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse hinsichtlich der differentiellen Reexpression einzelner Spleißvarianten von Fn und Tn-C im Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie auf. ED-A<sup>+</sup> Fn kann in der Lunge und im rechten Ventrikel, sowie im Serum erkrankter Tiere nachgewiesen und eignet sich daher als potentieller Biomarker der pulmonalen Hypertonie. ED-B<sup>+</sup> Fn, B<sup>+</sup> Tn-C, C<sup>+</sup> Tn-C und AD1<sup>+</sup> Tn-C lassen sich verstärkt im rechten Ventrikel nachweisen. Durch die sekundäre Druckbelastung unterliegt der rechte Ventrikel einem *Remodelling*-Prozess. Von allen untersuchten Spleißvarianten unterlag B<sup>+</sup> Tn-C der stärksten Regulation im rechten Ventrikel. Die Korrelation der B<sup>+</sup> Tn-C-Serumwerte zur rechtsventrikulären Funktionseinschränkung unterstreicht dessen potentielle Bedeutung als Marker des rechtsventrikulären *Remodellings* im Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie. Die Gabe von Macitentan kann eine Reihe der PH-assoziierten Effekte im Tiermodell positiv beeinflussen.

### *Neue zielgerichtete Therapiestrategien*

Die zur Verfügung stehenden Therapieoptionen der PAH konzentrieren sich auf die Verstärkung der Vasodilatation im pulmonalen Gefäßbett. Dies führt zwar zu einer Symptomkontrolle aber nicht zur Heilung der Erkrankung, da die Gewebeumbauprozesse dadurch nicht reversibel sind (Huetsch *et al.* 2016). Antikörper-basierte zielgerichtete Therapieverfahren, sogenannte *target-delivery*-Verfahren, befinden sich bei vielen

Erkrankungen, vor allem bei Krebstherapien in der Entwicklung und Anwendung. Die Theorie dahinter ist die Kopplung von therapeutisch wirksamen Zytokinen an Antikörper, die im Körper spezifisch am Ort pathologischer Remodelling-Prozesse binden und ihre Wirkung lokal entfalten und somit gesundes Gewebe schonen. Alternativ gespleißte Isoformen von Fibronectin und Tenascin-C lagern sich stabil im Extrazellularraum ab und werden häufig in räumlicher Assoziation zu Blutgefäßen gefunden. Dies konnte für ED-A<sup>+</sup> Fn und B<sup>+</sup> Tn-C in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Dadurch sind sie gut zugänglich für systemisch über die Zirkulation applizierte Agenzien. Die Kopplung von Interleukin-10 an den L19-Antikörper (Spezifität ED-B<sup>+</sup> Fn) oder den F8-Antikörper (Spezifität ED-A<sup>+</sup> Fn) hemmt in präklinischen Studien das Fortschreiten einer Arthritis (Bootz und Neri 2016). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass L19 im Tiermodell und bei Krebspatienten nach *intravenöser* Injektion effizient an Tumorgefäße binden kann. Spezifische radioaktiv markierte Antikörper für die Domänen A1<sup>+</sup> und D<sup>+</sup> von Tn-C werden für die Bildgebung und Radioimmuntherapie von Krebspatienten verwendet (Rybak *et al.* 2007). Anhand der Erkenntnisse dieser Arbeit könnte eine Kopplung von therapeutisch wirksamen Zytokinen an Antikörper, welche gezielt die jeweiligen Spleißvarianten in der Lunge oder im rechten Ventrikel ansteuert eine neue therapeutische Möglichkeit der pulmonalen Hypertonie darstellen. Dies ist jedoch gegenwärtig höchst spekulativ.

## 5. Schlussfolgerungen

Das Tiermodell der MCT-induzierten PH führt zu einer gesundheitlichen Beeinträchtigung der Tiere, einer Erhöhung des RVPsys und einer rechtsventrikulären Dysfunktion einhergehend mit Gewebeschädigungen in der Lunge und insbesondere im rechtsventrikulären Myokard. Demzufolge erwies sich das verwendete Tiermodell als geeignet zur Analyse der Reexpression von Adhäsionsproteinen der extrazellulären Matrix im Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie.

Es konnte gezeigt werden, dass ED-A<sup>+</sup> Fn am Gefäß- und Gewebe-*Remodelling* in der Lunge und im rechten Ventrikel beteiligt ist. Basierend auf den erhöhten Serumspiegeln erkrankter Tiere eignet sich ED-A<sup>+</sup> Fn als vielversprechender Biomarker für das *Remodelling* in der PH. Die Verfügbarkeit des humanen Antikörpers F8, welcher spezifisch an ED-A<sup>+</sup> Fn bindet scheint eine potentielle Targettherapieoption darzustellen.

Die pathophysiologischen Mechanismen der PH gehen mit einer differentiell gesteigerter mRNA-Expression von ED-B<sup>+</sup> Fn, B<sup>+</sup> Tn-C, C<sup>+</sup> Tn-C und AD1<sup>+</sup> Tn-C im rechten Ventrikel einher. Es handelt sich hierbei um neuartige Erkenntnisse. In der Literatur gibt es, soweit bekannt, keine Daten zur Expressionsanalyse dieser Spleißvarianten im rechten Ventrikel MCT-induzierter Ratten. Der rechte Ventrikel erfährt durch den erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand eine Druckbelastung, die zu einer prognostisch bedeutsamen und fortschreitenden Herzinsuffizienz führt. Demnach ist der rechte Ventrikel von besonderer Bedeutung im Hinblick auf mögliche Biomarker und Therapieoptionen. Es konnte gezeigt werden, dass es im rechten Ventrikel zu einer biologisch relevanten mRNA-Expressionssteigerung von B<sup>+</sup> Tn-C kommt verbunden mit einer ausgeprägten Proteindeposition sowie Serumliberation. Demzufolge scheint die Reexpression von B<sup>+</sup> Tn-C an der Entstehung der rechtsventrikulären Dysfunktion im Rahmen der PH beteiligt zu sein.

Die Gabe von Macitentan kann eine Reihe der PH assoziierten Effekte positiv beeinflussen. Die duale Endothelinrezeptorblockade erwies sich in den Experimenten der vorliegenden Arbeit als wirksam, klinische, echokardiographische und hämodynamische Parameter im Tiermodell zu verbessern und die Reexpression der Spleißvarianten zu dezimieren.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es zu einer differentiellen Reexpression fetaler Fibronectin- und Tenascin-C-Varianten in der Lunge und im konsekutiv belasteten rechten Ventrikel MCT-induzierter Ratten kommt. Dies könnte die Grundlage für neue vielversprechende Möglichkeiten in der Diagnostik und Therapie der Erkrankung

darstellen. Onkofetale Fibronectin- und Tenascin-C-Spleißvarianten könnten in der Zukunft möglicherweise als Biomarker oder Therapieoptionen fungieren. Dieses Potential muss in weiteren präklinischen und später klinischen Studien an großen Patientenkollektiven evaluiert werden.

# Literaturverzeichnis

- Akhavein F, St-Michel EJ, Seifert E, Rohlicek CV. 2007. Decreased left ventricular function, myocarditis, and coronary arteriolar medial thickening following monocrotaline administration in adult rats. *J Appl Physiol* (1985), 103 (1):287-295.
- Archer SL, Weir EK, Wilkins MR. 2010. Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation*, 121 (18):2045-2066.
- Astrof S, Hynes RO. 2009. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*, 12 (2):165-175.
- Astrof S, Crowley D, Hynes RO. 2007. Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Dev Biol*, 311 (1):11-24.
- Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J. 2016. *Duale Reihe Anatomie*. Thieme.
- Benza RL, Miller DP, Barst RJ, Badesch DB, Frost AE, McGoon MD. 2012. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest*, 142 (2):448-456.
- Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L, Held A, Maxam G, Seidler L, Häcker B, Jarosch B. 2017. *Stryer Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Biotech Science & Creativity <http://www.sirius-biotech.com/products-services/antibodies/>.
- Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF. 2009. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*, 135 (3):794-804.
- Bonnans C, Chou J, Werb Z. 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15 (12):786-801.
- Booth AJ, Wood SC, Cornett AM, Dreffs AA, Lu G, Muro AF, White ES, Bishop DK. 2012. Recipient-derived EDA fibronectin promotes cardiac allograft fibrosis. *J Pathol*, 226 (4):609-618.
- Bootz F, Neri D. 2016. Immunocytokines: a novel class of products for the treatment of chronic inflammation and autoimmune conditions. *Drug Discov Today*, 21 (1):180-189.
- Borsi L, Castellani P, Risso AM, Leprini A, Zardi L. 1990. Transforming growth factor-beta regulates the splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS Lett*, 261 (1):175-178.
- Borsi L, Balza E, Gaggero B, Allemanni G, Zardi L. 1995. The alternative splicing pattern of the tenascin-C pre-mRNA is controlled by the extracellular pH. *J Biol Chem*, 270 (11):6243-6245.
- Bowers SLK, Banerjee I, Baudino TA. 2010. The Extracellular Matrix: At the Center of it All. *J Mol Cell Cardiol*, 48 (3):474-482.
- Campian ME, Hardziyenka M, Michel MC, Tan HL. 2006. How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 373 (6):391-400.
- Campian ME, Hardziyenka M, de Bruin K, van Eck-Smit BL, de Bakker JM, Verberne HJ, Tan HL. 2010. Early inflammatory response during the development of right ventricular heart failure in a rat model. *Eur J Heart Fail*, 12 (7):653-658.
- Chesney CF, Allen JR. 1973. Animal model: pulmonary hypertension, cor pulmonale and endocardial fibroelastosis in monocrotaline-intoxicated nonhuman primates. *Am J Pathol*, 70 (3):489-492.
- Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. 2003. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol*, 200 (4):488-499.

- Clozel M. 2016. Endothelin research and the discovery of macitentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*:ajpregu 00475 02015.
- Correia-Pinto J, Henriques-Coelho T, Roncon-Albuquerque R, Jr., Lourenco AP, Melo-Rocha G, Vasques-Novoa F, Gillebert TC, Leite-Moreira AF. 2009. Time course and mechanisms of left ventricular systolic and diastolic dysfunction in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Basic Res Cardiol*, 104 (5):535-545.
- D'Alto M, Romeo E, Argiento P, D'Andrea A, Vanderpool R, Correria A, Bossone E, Sarubbi B, Calabro R, Russo MG, Naeije R. 2013. Accuracy and precision of echocardiography versus right heart catheterization for the assessment of pulmonary hypertension. *Int J Cardiol*, 168 (4):4058-4062.
- De Vecchis R, Cesaro A, Ariano C, Giasi A, Cioppa C. 2017. Phosphodiesterase-5 Inhibitors Improve Clinical Outcomes, Exercise Capacity and Pulmonary Hemodynamics in Patients With Heart Failure With Reduced Left Ventricular Ejection Fraction: A Meta-Analysis. *J Clin Med Res*, 9 (6):488-498.
- Dobbertin A, Czvitkovich S, Theocharidis U, Garwood J, Andrews MR, Properzi F, Lin R, Fawcett JW, Faissner A. 2010. Analysis of combinatorial variability reveals selective accumulation of the fibronectin type III domains B and D of tenascin-C in injured brain. *Experimental Neurology*, 225 (1):60-73.
- Ehlken N, Verduyn C, Tiede H, Staehler G, Karger G, Nechwatal R, Opitz CF, Klose H, Wilkens H, Rosenkranz S, Halank M, Grunig E. 2014. Economic evaluation of exercise training in patients with pulmonary hypertension. *Lung*, 192 (3):359-366.
- EMA European Medicines Agency Sciences Medicines Health. Opsumit, macitentan [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002697/human\\_med\\_001717.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002697/human_med_001717.jsp&mid=WC0b01ac058001d124).
- Erickson HP, Inglesias JL. 1984. A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature*, 311 (5983):267-269.
- Erickson HP, Bourdon MA. 1989. Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu Rev Cell Biol*, 5:71-92.
- Farhadian F, Contard F, Corbier A, Barrieux A, Rappaport L, Samuel JL. 1995. Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol*, 27 (4):981-990.
- Foris V, Kovacs G, Tscherner M, Olschewski A, Olschewski H. 2013. Biomarkers in pulmonary hypertension: what do we know? *Chest*, 144 (1):274-283.
- Foshat M, Boroumand N. 2017. The Evolving Classification of Pulmonary Hypertension. *Arch Pathol Lab Med*, 141 (5):696-703.
- Frangogiannis NG. 2017. Fibroblasts and the extracellular matrix in right ventricular disease. *Cardiovasc Res*, 113 (12):1453-1464.
- Franz M, Neri D, Berndt A. 2012. Chronic cardiac allograft rejection: critical role of ED-A(+) fibronectin and implications for targeted therapy strategies. *J Pathol*, 226 (4):557-561.
- Franz M, Jung C, Lauten A, Figulla HR, Berndt A. 2015a. Tenascin-C in cardiovascular remodeling: potential impact for diagnosis, prognosis estimation and targeted therapy. *Cell Adh Migr*, 9 (1-2):90-95.
- Franz M, Berndt A, Altendorf-Hofmann A, Fiedler N, Richter P, Schumm J, Fritzenwanger M, Figulla HR, Brehm BR. 2009. Serum levels of large tenascin-C variants, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in concentric versus eccentric left ventricular hypertrophy. *Eur J Heart Fail*, 11 (11):1057-1062.

- Franz M, Brehm BR, Richter P, Gruen K, Neri D, Kosmehl H, Hekmat K, Renner A, Gummert J, Figulla HR, Berndt A. 2010. Changes in extra cellular matrix remodelling and re-expression of fibronectin and tenascin-C splicing variants in human myocardial tissue of the right atrial auricle: implications for a targeted therapy of cardiovascular diseases using human SIP format antibodies. *J Mol Histol*, 41 (1):39-50.
- Franz M, Grun K, Betge S, Rohm I, Ndongson-Dongmo B, Bauer R, Schulze PC, Lichtenauer M, Petersen I, Neri D, Berndt A, Jung C. 2016. Lung tissue remodelling in MCT-induced pulmonary hypertension: a proposal for a novel scoring system and changes in extracellular matrix and fibrosis associated gene expression. *Oncotarget*, 7 (49):81241-81254.
- Franz M, Berndt A, Neri D, Galler K, Grun K, Porrmann C, Reinbothe F, Mall G, Schlattmann P, Renner A, Figulla HR, Jung C, Kuthe F. 2013. Matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, B(+) tenascin-C and ED-A(+) fibronectin in dilated cardiomyopathy: potential impact on disease progression and patients' prognosis. *Int J Cardiol*, 168 (6):5344-5351.
- Franz M, Doll F, Grun K, Richter P, Kose N, Ziffels B, Schubert H, Figulla HR, Jung C, Gummert J, Renner A, Neri D, Berndt A. 2015b. Targeted delivery of interleukin-10 to chronic cardiac allograft rejection using a human antibody specific to the extra domain A of fibronectin. *Int J Cardiol*, 195:311-322.
- Gabler U, Berndt A, Kosmehl H, Mandel U, Zardi L, Muller S, Stelzner A, Katenkamp D. 1996. Matrix remodelling in dilated cardiomyopathy entails the occurrence of oncofetal fibronectin molecular variants. *Heart*, 75 (4):358-362.
- Galie N, Manes A, Branzi A. 2004. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res*, 61 (2):227-237.
- Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2016. 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 69 (2):177.
- Giblin SP, Midwood KS. 2015. Tenascin-C: Form versus function. *Cell Adh Migr*, 9 (1-2):48-82.
- Glukhova MA, Frid MG, Shekhonin BV, Vasilevskaya TD, Grunwald J, Saginati M, Koteliansky VE. 1989. Expression of extra domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent. *J Cell Biol*, 109 (1):357-366.
- Golledge J, Clancy P, Maguire J, Lincz L, Koblar S. 2011. The role of tenascin C in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 92 (1):19-28.
- Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, Bogaard HJ. 2012. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 302 (4):L363-369.
- Grapsa J, Gibbs JS, Cabrita IZ, Watson GF, Pavlopoulos H, Dawson D, Gin-Sing W, Howard LS, Nihoyannopoulos P. 2012. The association of clinical outcome with right atrial and ventricular remodelling in patients with pulmonary arterial hypertension: study with real-time three-dimensional echocardiography. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 13 (8):666-672.
- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. 2003. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*, 4 (9):117.
- Greiner S, Jud A, Aurich M, Hess A, Hilbel T, Hardt S, Katus HA, Mereles D. 2014. Reliability of noninvasive assessment of systolic pulmonary artery pressure by Doppler echocardiography compared to right heart catheterization: analysis in a large patient population. *J Am Heart Assoc*, 3 (4).

- Held M, Linke M, Jany B. 2014. [Echocardiography and right heart catheterization in pulmonary hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr*, 139 (30):1511-1517.
- Heresi GA, Minai OA, Tonelli AR, Hammel JP, Farha S, Parambil JG, Dweik RA. 2013. Clinical characterization and survival of patients with borderline elevation in pulmonary artery pressure. *Pulm Circ*, 3 (4):916-925.
- Hessel M, Steendijk P, den Adel B, Schutte C, van der Laarse A. 2009. Pressure overload-induced right ventricular failure is associated with re-expression of myocardial tenascin-C and elevated plasma tenascin-C levels. *Cell Physiol Biochem*, 24 (3-4):201-210.
- Hoeper MM, Huscher D, Pittrow D. 2016a. Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *Int J Cardiol*, 203:612-613.
- Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, Jing ZC, Gibbs JS. 2016b. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*, 4 (4):306-322.
- Hoorn CM, Wagner JG, Roth RA. 1993. Effects of monocrotaline pyrrole on cultured rat pulmonary endothelium. *Toxicol Appl Pharmacol*, 120 (2):281-287.
- Huber LC, Bye H, Brock M, Hypertension SSP. 2015. The pathogenesis of pulmonary hypertension - an update. *Swiss Medical Weekly*, 145.
- Huetsch JC, Suresh K, Bernier M, Shimoda LA. 2016. Update on novel targets and potential treatment avenues in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 311 (5):L811-L831.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. 2004. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 43 (12 Suppl S):13S-24S.
- Iglarz M, Binkert C, Morrison K, Fischli W, Gatfield J, Treiber A, Weller T, Bolli MH, Boss C, Buchmann S, Capeleto B, Hess P, Qiu C, Clozel M. 2008. Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 327 (3):736-745.
- Iglarz M, Landskroner K, Bauer Y, Vercauteren M, Rey M, Renault B, Studer R, Vezzali E, Freti D, Hadana H, Schlapfer M, Cattaneo C, Bortolamiol C, Weber E, Whitby BR, Delahaye S, Wanner D, Steiner P, Nayler O, Hess P, Clozel M. 2015. Comparison of Macitentan and Bosentan on Right Ventricular Remodeling in a Rat Model of Non-vasoreactive Pulmonary Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, 66 (5):457-467.
- Ihida-Stansbury K, McKean DM, Lane KB, Loyd JE, Wheeler LA, Morrell NW, Jones PL. 2006. Tenascin-C is induced by mutated BMP type II receptors in familial forms of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291 (4):L694-702.
- Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T. 2004. Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. *Histol Histopathol*, 19 (2):517-525.
- Imanaka-Yoshida K, Matsumoto K, Hara M, Sakakura T, Yoshida T. 2003. The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse. *Differentiation*, 71 (4-5):291-298.
- Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T, Ishiyama S, Shimojo T, Ohta Y, Sakakura T, Yoshida T. 2001. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest*, 81 (7):1015-1024.
- Imoto K, Okada M, Yamawaki H. 2017. Expression profile of matricellular proteins in hypertrophied right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Vet Med Sci*, 79 (6):1096-1102.
- Jeffery TK, Morrell NW. 2002. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*, 45 (3):173-202.

- Jones FS, Jones PL. 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*, 218 (2):235-259.
- Jung C, Grun K, Betge S, Pernow J, Kelm M, Muessig J, Masyuk M, Kuethe F, Ndongson-Dongmo B, Bauer R, Lauten A, Schulze PC, Berndt A, Franz M. 2017. Arginase Inhibition Reverses Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Int J Mol Sci*, 18 (8).
- Kaul S, Tei C, Hopkins JM, Shah PM. 1984. Assessment of right ventricular function using two-dimensional echocardiography. *Am Heart J*, 107 (3):526-531.
- Kolditz M, Seyfarth HJ, Wilkens H, Ewert R, Bollmann T, Dinter C, Hertel S, Klose H, Opitz C, Grunig E, Hoffken G, Halank M. 2015. MR-proADM Predicts Exercise Capacity and Survival Superior to Other Biomarkers in PH. *Lung*, 193 (6):901-910.
- Kosanovic D, Kojonazarov B, Luitel H, Dahal BK, Sydykov A, Cornitescu T, Janssen W, Brandes RP, Davie N, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT. 2011. Therapeutic efficacy of TBC3711 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Respir Res*, 12 (1):87.
- Kovacs G, Dumitrescu D, Barner A, Greiner S, Grunig E, Hager A, Kohler T, Kozlik-Feldmann R, Kruck I, Lammers A, Mereles D, Meyer A, Meyer FJ, Pabst S, Seyfarth HJ, Sinning C, Sorichter S, Stahler G, Wilkens H, Held M. 2016. [Clinical classification and initial diagnosis of pulmonary hypertension: recommendations of the Cologne Consensus Conference 2016]. *Dtsch Med Wochenschr*, 141 (S 01):S10-S18.
- Lalich JJ, Merkow L. 1961. Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest*, 10:744-750.
- Lambers C, Roth M, Zhong J, Campregher C, Binder P, Burian B, Petkov V, Block LH. 2013. The interaction of endothelin-1 and TGF-beta1 mediates vascular cell remodeling. *PLoS One*, 8 (8):e73399.
- Lan NSH, Massam BD, Kulkarni SS, Lang CC. 2018. Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Diseases*, 6 (2).
- Lang G. 2012. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer Vienna.
- Lourenco AP, Roncon-Albuquerque R, Jr., Bras-Silva C, Faria B, Wieland J, Henriques-Coelho T, Correia-Pinto J, Leite-Moreira AF. 2006. Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291 (4):H1587-1594.
- Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX. 2004. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res*, 68 (2):75-103.
- Meyrick B, Gamble W, Reid L. 1980. Development of *Crotalaria* pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol*, 239 (5):H692-702.
- Morimoto S, Imanaka-Yoshida K, Hiramitsu S, Kato S, Ohtsuki M, Uemura A, Kato Y, Nishikawa T, Toyozaki T, Hishida H, Yoshida T, Hiroe M. 2005. Diagnostic utility of tenascin-C for evaluation of the activity of human acute myocarditis. *J Pathol*, 205 (4):460-467.
- Müller HJ, Prange DR. 2015. *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Springer Berlin Heidelberg.
- Nadeau V, Potus F, Boucherat O, Paradis R, Tremblay E, Iglarz M, Paulin R, Bonnet S, Provencher S. 2018. Dual ETA/ETB blockade with macitentan improves both vascular remodeling and angiogenesis in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*, 8 (1):2045893217741429.
- Naeije R, D'Alto M, Forfia PR. 2015. Clinical and research measurement techniques of the pulmonary circulation: the present and the future. *Prog Cardiovasc Dis*, 57 (5):463-472.

- National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 2011. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington (DC): National Academies Press (US)
- National Academy of Sciences.
- Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R, Henriques-Coelho T. 2015. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm Pharmacol Ther*, 35:8-16.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, 3rd. 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 276 (13):10229-10233.
- Pagnamenta A, Azzola A, Beghetti M, Lador F, On Behalf Of The Swiss Society Of Pulmonary H. 2017. Invasive haemodynamic evaluation of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension. *Swiss Med Wkly*, 147:w14445.
- Pankov R, Yamada KM. 2002. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*, 115 (Pt 20):3861-3863.
- Peters JH, Hynes RO. 1996. Fibronectin isoform distribution in the mouse. I. The alternatively spliced EIIIB, EIIB, and V segments show widespread codistribution in the developing mouse embryo. *Cell Adhes Commun*, 4 (2):103-125.
- Petrini I, Barachini S, Carnicelli V, Galimberti S, Modeo L, Boni R, Sollini M, Erba PA. 2017. ED-B fibronectin expression is a marker of epithelial-mesenchymal transition in translational oncology. *Oncotarget*, 8 (3):4914-4921.
- Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galie N, Ghofrani HA, Jansa P, Jing ZC, Le Brun FO, Mehta S, Mittelholzer CM, Perchenet L, Sastry BK, Sitbon O, Souza R, Torbicki A, Zeng X, Rubin LJ, Simonneau G, Investigators S. 2013. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 369 (9):809-818.
- Raymond RJ, Hinderliter AL, Willis PW, Ralph D, Caldwell EJ, Williams W, Ettinger NA, Hill NS, Summer WR, de Boisblanc B, Schwartz T, Koch G, Clayton LM, Jobsis MM, Crow JW, Long W. 2002. Echocardiographic predictors of adverse outcomes in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 39 (7):1214-1219.
- Roewer N, Thiel H. 2010. *Taschenatlas der Anästhesie: Farbtafeln von Jürgen Wirth*. Thieme.
- Rohm I, Grun K, Muller LM, Kretzschmar D, Fritzenwanger M, Yilmaz A, Lauten A, Jung C, Schulze PC, Berndt A, Franz M. 2017. Increased Serum Levels of Fetal Tenascin-C Variants in Patients with Pulmonary Hypertension: Novel Biomarkers Reflecting Vascular Remodeling and Right Ventricular Dysfunction? *Int J Mol Sci*, 18 (11).
- Rohm I, Grun K, Muller LM, Baz L, Forster M, Schrepper A, Kretzschmar D, Pistulli R, Yilmaz A, Bauer R, Jung C, Berndt A, Schulze PC, Franz M. 2019. Cellular inflammation in pulmonary hypertension: Detailed analysis of lung and right ventricular tissue, circulating immune cells and effects of a dual endothelin receptor antagonist. *Clin Hemorheol Microcirc*.
- Ryan JJ, Archer SL. 2014. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*, 115 (1):176-188.
- Rybak JN, Trachsel E, Scheuermann J, Neri D. 2007. Ligand-based vascular targeting of disease. *ChemMedChem*, 2 (1):22-40.
- Samson N, Paulin R. 2017. Epigenetics, inflammation and metabolism in right heart failure associated with pulmonary hypertension. *Pulm Circ*, 7 (3):572-587.

- Sato A, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Isobe M, Kawase D, Kinoshita N, Yazaki Y, Hiroe M. 2006. Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 47 (11):2319-2325.
- Schmid E, Hilberath JN, Blumenstock G, Shekar PS, Kling S, Shernan SK, Rosenberger P, Nowak-Machen M. 2015. Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) predicts poor outcome in patients undergoing acute pulmonary embolectomy. *Heart Lung Vessel*, 7 (2):151-158.
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. 2011. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Schwarzbauer JE. Fibronectins, Their Fibrillogenesis, and In Vivo. 3 (7).
- Schwarzbauer JE. 1991a. Fibronectin: from gene to protein. *Curr Opin Cell Biol*, 3 (5):786-791.
- Schwarzbauer JE. 1991b. Alternative splicing of fibronectin: three variants, three functions. *Bioessays*, 13 (10):527-533.
- Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. 1998. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol*, 142 (3):873-881.
- Shinohara T, Sawada H, Otsuki S, Yodoya N, Kato T, Ohashi H, Zhang E, Saitoh S, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y. 2015. Macitentan reverses early obstructive pulmonary vasculopathy in rats: early intervention in overcoming the survivin-mediated resistance to apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308 (6):L523-538.
- Siddiqui I, Khan ZA, Lian D, Jiang J, Zhong R, Garcia B, Chakrabarti S. 2006. Endothelin-mediated oncofetal fibronectin expression in chronic allograft nephropathy. *Transplantation*, 82 (3):406-414.
- Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. 2019. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 53 (1).
- Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. 2013. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 62 (25 Suppl):D34-41.
- Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. 2010. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26:397-419.
- Sitbon O, Humbert M, Jais X, Iosifescu V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Herve P, Simonneau G. 2005. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 111 (23):3105-3111.
- Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. 2009. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297 (6):L1013-1032.
- Studer SM, Kingman M, Calo L, Cannon HE, Dunn JD, James T, 3rd, Lewis SJ, Gilkin RJ, Jr., Pruettt JA. 2017. Considerations for optimal management of patients with pulmonary arterial hypertension: a multi-stakeholder roundtable discussion. *Am J Manag Care*, 23 (6 Suppl):S95-S104.
- Tamaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, Nishioka T, Inada H, Hiroe M, Sakakura T, Yoshida T. 2005. Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *Am J Pathol*, 167 (1):71-80.

- Temple IP, Monfredi O, Quigley G, Schneider H, Zi M, Cartwright EJ, Boyett MR, Mahadevan VS, Hart G. 2014. Macitentan treatment retards the progression of established pulmonary arterial hypertension in an animal model. *Int J Cardiol*, 177 (2):423-428.
- Terasaki F, Okamoto H, Onishi K, Sato A, Shimomura H, Tsukada B, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T, Kitaura Y, Kitabatake A, Study Group for Intractable Diseases by a Grant from the Ministry of Health L, Welfare of J. 2007. Higher serum tenascin-C levels reflect the severity of heart failure, left ventricular dysfunction and remodeling in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J*, 71 (3):327-330.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. 2016. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97 (Supplement C):4-27.
- To WS, Midwood KS. 2011. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 4:21.
- Tuder RM. 2017. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Cell Tissue Res*, 367 (3):643-649.
- Tuder RM, Chacon M, Alger L, Wang J, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Cool CD, Bishop AE, Geraci M, Semenza GL, Yacoub M, Polak JM, Voelkel NF. 2001. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol*, 195 (3):367-374.
- Vonk Noordegraaf A, Chin KM, Haddad F, Hassoun PM, Hemnes AR, Hopkins SR, Kawut SM, Langleben D, Lumens J, Naeije R. 2019. Pathophysiology of the right ventricle and of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension: an update. *Eur Respir J*, 53 (1).
- Vuolteenaho O, Ala-Kopsala M, Ruskoaho H. 2005. BNP as a biomarker in heart disease. *Adv Clin Chem*, 40:1-36.
- White ES, Baralle FE, Muro AF. 2008. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol*, 216 (1):1-14.
- Xu B, Chiu J, Feng B, Chen S, Chakrabarti S. 2008. PARP activation and the alteration of vasoactive factors and extracellular matrix protein in retina and kidney in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 24 (5):404-412.
- Yoshida T, Delafontaine P. 2015. Mechanisms of Cachexia in Chronic Disease States. *Am J Med Sci*, 350 (4):250-256.
- Ziffels B, Ospel J, Grun K, Neri D, Pfeil A, Fritzenwanger M, Figulla HR, Jung C, Berndt A, Franz M. 2016. Detection of Soluble ED-A(+) Fibronectin and Evaluation as Novel Serum Biomarker for Cardiac Tissue Remodeling. *Dis Markers*, 2016:3695454.
- Zlupko M, Harhay MO, Gallop R, Shin J, Archer-Chicko C, Patel R, Palevsky HI, Taichman DB. 2008. Evaluation of disease-specific health-related quality of life in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*, 102 (10):1431-1438.

# Anhang

**Tabelle 17: Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der Daten anhand des Mann-Whitney-U-Tests**

Parameter / Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert CON/MCT	p-Wert CON/MCT+MACI	p-Wert MCT/MCT+MACI
<b>Gesundheitskontrolle</b>					
<b>Differenzgewicht (in g)</b>			0,002	0,011	0,049
CON	180,17	16,94			
MCT	126,00	29,35			
MCT+Maci	152,70	12,54			
<b>CSS</b>			0,011	0,083	0,061
CON	1,00	0,00			
MCT	2,10	0,83			
MCT+Maci	1,40	0,49			
<b>Echokardiographie</b>					
<b>RA-Fläche (mm<sup>2</sup>)</b>			0,005	0,009	0,545
CON	28,85	4,67			
MCT	45,11	9,06			
MCT+Maci	42,80	11,10			
<b>TAPSE (mm)</b>			0,007	0,099	0,016
CON	2,38	0,29			
MCT	1,71	0,32			
MCT+Maci	2,08	0,28			
<b>Rechtsherzkatheter</b>					
<b>RVP<sub>sys</sub> (mmHg)</b>			0,013	0,329	0,004
CON	37,87	14,04			
MCT	77,91	31,86			
MCT+Maci	45,62	13,43			
<b>Histoscores</b>					
<b>Histoscore-Summe Lunge</b>			0,001	0,001	0,003
CON	1,58	1,02			
MCT	8,33	1,41			
MCT+Maci	5,60	1,36			
<b>Fibrose LV</b>			0,258	0,439	0,503
CON	0,00	0,00			
MCT	0,15	0,32			
MCT+Maci	0,05	0,15			

Parameter / Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert CON/MCT	p-Wert CON/MCT+MACI	p-Wert MCT/MCT+MACI
<b>Entzündliche Infiltration LV</b>			0,025	0,023	0,475
CON	0,00	0,00			
MCT	0,70	0,71			
MCT+Maci	0,40	0,37			
<b>Fibrose RV</b>			0,009	0,001	0,836
CON	0,08	0,19			
MCT	1,70	1,08			
MCT+Maci	1,67	0,75			
<b>Entzündliche Infiltration RV</b>			0,003	0,002	0,398
CON	0,25	0,25			
MCT	1,60	0,86			
MCT+Maci	1,28	0,67			
Immunfluoreszenz Lunge (in Prozent)					
<b>Lunge EDA<sup>+</sup>-Fn</b>			0,003	0,594	0,05
CON	0,02	0,02			
MCT	9,02	12,92			
MCT+Maci	1,44	4,02			
<b>Lunge B<sup>+</sup>Tn-C</b>			0,309	0,562	0,571
CON	0,03	0,04			
MCT	0,21	0,41			
MCT+Maci	0,07	0,13			
Immunfluoreszenz RV					
<b>RV EDA<sup>+</sup>-Fn</b>			0,032	0,263	0,118
CON	0,85	1,17			
MCT	10,11	14,84			
MCT+Maci	4,37	10,06			
<b>RV B<sup>+</sup>Tn-C</b>			0,003	0,019	0,034
CON	0,02	0,03			
MCT	1,57	1,85			
MCT+Maci	0,60	1,27			
Immunfluoreszenz LV					
<b>LV EDA<sup>+</sup>-Fn</b>			0,061	0,118	0,82
CON	0,03	0,03			
MCT	0,46	0,65			
MCT+Maci	0,67	1,11			

Parameter / Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert CON/MCT	p-Wert CON/MCT+MACI	p-Wert MCT/MCT+MACI
<b>LV B<sup>+</sup>Tn-C</b>			0,027	0,792	0,014
CON	0,01	0,02			
MCT	0,10	0,09			
MCT+Maci	0,01	0,01			
ELISA					
<b>ED-A<sup>+</sup> Fn ELISA (in ng/ml)</b>			0,006	0,001	0,819
CON	240,23	201,53			
MCT	975,56	932,6			
MCT+Maci	859,84	501,38			
<b>C<sup>+</sup> Tn-C ELISA (in ng/ml)</b>			0,405	0,149	0,044
CON	36,49	13,58			
MCT	45,22	21,62			
MCT+Maci	28,61	9,02			
<b>B<sup>+</sup> Tn-C ELISA (in ng/ml)</b>			0,020	0,054	0,485
CON	140,40	94,08			
MCT	464,31	440,33			
MCT+Maci	305,64	240,89			

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, Fn: Fibronectin, LV: linker Ventrikel, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, RV: rechter Ventrikel, Tn-C: Tenascin-C

**Tabelle 18: Pixelwerte in Prozent der Immunfluoreszenz-Daten**

Tier / Gruppe	ED-A <sup>+</sup> Fn			B <sup>+</sup> Tn-C		
	RV	LV	Lunge	RV	LV	Lunge
<b>CON</b>						
F09-02	0,05	0,00	0,05		0,05	0,00
F09-03	0,02	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
F09-04	1,77	0,00	0,02	0,08	0,00	0,12
F09-05	3,05	0,05		0,00	0,00	0,00
F09-06	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
F09-07	0,20	0,03	0,02	0,00	0,00	0,05
<b>MCT</b>						
F09-08	0,67	0,13	42,35	0,28	0,08	0,00
F09-09		0,07	3,77		0,00	0,00
F09-10		0,00	0,45	1,75	0,28	0,00
F09-11	0,90	1,98	4,93	0,60	0,18	0,12

Tier / Gruppe	ED-A <sup>+</sup> Fn			B <sup>+</sup> Tn-C		
F09-12		1,43	23,67	5,78	0,13	1,48
F09-13	3,37	0,02	0,20	3,82	0,05	0,00
F09-14	16,22	0,00	7,30	0,12	0,17	0,20
F09-15	0,48	0,27	0,05	0,13	0,00	0,00
F09-16	44,23	0,27	5,88	0,82	0,00	0,10
F09-17	4,93	0,38	1,62	0,87	0,08	0,18
<b>MCT+MACI</b>						
F09-18	0,97	0,08	13,50	0,10	0,02	0,05
F09-19	0,32	0,00	0,38	4,37	0,02	0,00
F09-20	0,13	3,55	-0,02	0,13	0,00	0,00
F09-21	0,70	0,00	0,15	0,05	0,00	0,43
F09-22	0,10	0,20	0,02	0,02	0,00	0,00
F09-23	0,18	0,12	0,02	0,00	0,00	0,05
F09-24	0,65	1,78	0,32	0,45	0,02	0,08
F09-25	34,17	0,02	-0,02	0,30	0,00	0,12
F09-26	0,85	0,02	0,02	0,50	0,00	0,00
F09-27	5,68	0,92	0,00	0,12	0,00	0,00

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, Fn: Fibronectin, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, Tn-C: Tenascin-C

**Tabelle 19: Mittelwerte, p-Werte und 40-ΔCt-Werte der *Fold change* Ergebnisse**

PCR	<i>Fold change</i> versus CON	p-Wert <sub>MCT-MCT+MACI</sub>	40- ΔCt
<b>RV ED-A<sup>+</sup> Fn</b>		0,705	
CON			30,64
MCT	3,70		32,31
MCT+Maci	3,22		32,23
<b>RV ED-B<sup>+</sup> Fn</b>		0,016	
CON			34,50
MCT	7,34		36,98
MCT+Maci	2,34		35,33
<b>RV B<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,226	
CON			30,50
MCT	10,75		33,16
MCT+Maci	4,27		32,15
<b>RV C<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,762	

PCR	<i>Fold change versus CON</i>	p-Wert <sub>MCT-MCT+MACI</sub>	40- ΔCt
CON			28,73
MCT	6,87		30,87
MCT+Maci	5,89		30,59
<b>RV D<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,705	
CON			31,17
MCT	6,79		33,26
MCT+Maci	6,06		32,97
<b>RV AD1<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,88	
CON			28,55
MCT	5,53		30,42
MCT+Maci	6,18		30,48
PCR LV			
<b>LV ED-A<sup>+</sup> Fn</b>		0,104	
CON			32,00
MCT	1,11		31,73
MCT+Maci	0,49		30,76
<b>LV ED-B<sup>+</sup> Fn</b>		0,131	
CON			34,68
MCT	3,09		35,83
MCT+Maci	1,37		34,92
<b>LV B<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,257	
CON			31,55
MCT	6,11		33,09
MCT+Maci	2,75		32,27
<b>LV C<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,739	
CON			30,77
MCT	0,77		29,87
MCT+Maci	0,73		29,97
<b>LV D<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,290	
CON			29,05
MCT	14,96		32,37
MCT+Maci	8,09		31,64
<b>LV AD1<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,290	
CON			29,39
MCT	2,76		30,11

PCR	<i>Fold change</i> versus CON	p-Wert <sub>MCT-MCT+MACI</sub>	40- ΔCt
MCT+Maci	1,46		29,46
PCR Lunge			
<b>Lunge ED-A<sup>+</sup> Fn</b>		0,118	
CON			36,57
MCT	1,17		36,67
MCT+Maci	0,88		36,34
<b>Lunge ED-B<sup>+</sup> Fn</b>		0,845	
CON			38,13
MCT	2,76		39,40
MCT+Maci	2,91		39,63
<b>Lunge B<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,660	
CON			38,60
MCT	1,32		38,81
MCT+Maci	1,29		38,92
<b>Lunge C<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,016	
CON			34,34
MCT	1,89		35,18
MCT+Maci	1,04		34,22
<b>Lunge D<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,326	
CON			37,14
MCT	1,62		37,66
MCT+Maci	1,25		36,95
<b>Lunge AD1<sup>+</sup> Tn-C</b>		0,153	
CON			33,65
MCT	1,11		33,59
MCT+Maci	0,87		32,75

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, Fn: Fibronectin, LV: linker Ventrikel, MACI: Macitentan, MCT: Monocrotalin, RV: rechter Ventrikel, Tn-C: Tenascin-C

**Tabelle 20: P-Werte der *Fold change* Ergebnisse in den MCT-Gruppen**

PCR / IF	P <sub>Lunge – RV</sub>	P <sub>Lunge- LV</sub>	P <sub>RV-LV</sub>
PCR <i>Fold changes</i>			
MCT ED-A <sup>+</sup> Fn	0,001	0,762	0,001
MCT ED-B <sup>+</sup> Fn	0,041	0,821	0,028
MCT C <sup>+</sup> Tn-C	0,045	0,001	0,001
MCT D <sup>+</sup> Tn-C	0,041	0,001	0,086

PCR / IF	P <sub>Lunge-RV</sub>	P <sub>Lunge-LV</sub>	P <sub>RV-LV</sub>
MCT B <sup>+</sup> Tn-C	0,03	0,034	0,326
MCT AD1 <sup>+</sup> Tn-C	0,013	0,241	0,096
IF			
MCT ED-A <sup>+</sup> Fn	0,884	0,008	0,005
MCT B <sup>+</sup> Tn-C	0,006	0,135	0

Verwendete Abkürzungen: CON: Kontrollen, Fn: Fibronectin, LV: linker Ventrikel, MCT: Monocrotalin, RV: rechter Ventrikel, Tn-C: Tenascin-C

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der pulmonalen Hypertonie. Übersetzt und modifiziert nach (Galie <i>et al.</i> 2016). .....	3
Tabelle 2: Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz .....	15
Tabelle 3: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz.....	15
Tabelle 4: Antikörper und Enzyme für ELISA .....	16
Tabelle 5: Primer für die qRT-PCR .....	16
Tabelle 6: Kits .....	17
Tabelle 7: Reagenzien und Chemikalien.....	17
Tabelle 8: Puffer und Lösungen .....	18
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien .....	19
Tabelle 10: Geräte .....	20
Tabelle 11: Verwendete Softwares .....	20
Tabelle 12: <i>Clinical Severity Score</i> (CSS) des Gesundheitszustands .....	22
Tabelle 13: Semiquantitative Bewertung der Lungengewebsschädigung anhand des <i>Summenscores</i> aus fünf histopathologischen Parametern .....	26
Tabelle 14: Semiquantitative Bewertung der Myokardschädigung anhand von entzündlicher Infiltration und Fibrose.....	27
Tabelle 15: qRT-PCR Protokoll.....	29
Tabelle 16: Darstellung der <i>Fold changes</i> mit Mittelwert und Standardabweichung.....	44

Tabelle 17: Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der Daten anhand des Mann-Whitney-U-Tests .....	79
Tabelle 18: Pixelwerte in Prozent der Immunfluoreszenz-Daten .....	81
Tabelle 19: Mittelwerte, p-Werte und 40- $\Delta$ Ct-Werte der <i>Fold change</i> Ergebnisse .....	82
Tabelle 20: P-Werte der <i>Fold change</i> Ergebnisse in den MCT-Gruppen.....	84

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Macitentan und ACT-132577 übernommen aus (Iglarz <i>et al.</i> 2008).....	6
Abbildung 2: Aufbau von Fibronectin adaptiert nach (Biotech 2018) .....	10
Abbildung 3: Aufbau von Tenascin-C adaptiert nach (Dobbertin <i>et al.</i> 2010) und (Biotech 2018).....	11
Abbildung 4: Studienprotokoll des Tiermodells der MCT-induzierten PH in der Ratte .....	22
Abbildung 5: Darstellung der Organaufteilung von Lunge und Herz.....	25
Abbildung 6: SYBR-Green Fluoreszenz Grafik, erstellt während der qRT-PCR mit dem B <sup>+</sup> Tn-C Primer, <i>threshold</i> bei 0,02.....	29
Abbildung 7: Schmelzkurvenanalyse der qRT-PCR mit dem AD1 <sup>+</sup> Tn-C Primer .....	30
Abbildung 8: Gewichtsdifferenz der Versuchstiere von Tag 0 bis Tag 28 <i>p.i.</i> .....	35
Abbildung 9: <i>Clinical Severity Score</i> (CSS) an Tag 28 <i>p.i.</i> .....	36
Abbildung 10: Echokardiographische Ergebnisse .....	37
Abbildung 11: Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck .....	37
Abbildung 12: Histopathologische Veränderungen im erkrankten Lungengewebe .....	38
Abbildung 13: <i>Summenscore</i> der histopathologischen Gewebeschädigung der Lunge .....	39
Abbildung 14: Histopathologische Gewebeschädigung des rechtsventrikulären Myokards ...	40
Abbildung 15: Gewebeschädigung im RV: entzündliche Infiltration und Fibrose.....	40
Abbildung 16: Gewebeschädigung im LV: entzündliche Infiltration und Fibrose.....	41

Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse an der <i>Tape Station</i> .....	42
Abbildung 18: Qualitätskontrolle der Primer an der <i>Tape Station</i> .....	43
Abbildung 19: Expression von ED-B <sup>+</sup> Fn im RV .....	45
Abbildung 20: ED-A <sup>+</sup> Fn und ED-B <sup>+</sup> Fn in den MCT-Gruppen im Vergleich .....	45
Abbildung 21: B <sup>+</sup> Tn-C und C <sup>+</sup> Tn-C in den MCT-Gruppen im Vergleich .....	46
Abbildung 22: Korrelationsanalysen der mRNA-Genexpression von ED-B <sup>+</sup> Fn .....	47
Abbildung 23: Immunfluoreszenz-Detektion von B <sup>+</sup> TN-C und ED-A <sup>+</sup> FN in der Lunge .....	48
Abbildung 24: Semiquantitative Analyse der B <sup>+</sup> Tn-C - und ED-A <sup>+</sup> Fn - Deposition in der Lunge.....	49
Abbildung 25: Immunfluoreszenz-Detektion von B <sup>+</sup> Tn-C und ED-A <sup>+</sup> Fn im RV.....	50
Abbildung 26: Semiquantitative Analyse der B <sup>+</sup> Tn-C - und ED-A <sup>+</sup> Fn - Deposition im RV .	50
Abbildung 27: Immunfluoreszenz-Detektion von B <sup>+</sup> Tn-C und ED-A <sup>+</sup> Fn im LV.....	51
Abbildung 28: Semiquantitative Analyse der B <sup>+</sup> Tn-C - und ED-A <sup>+</sup> Fn - Deposition im LV .	52
Abbildung 29: Semiquantitative Analyse der B <sup>+</sup> Tn-C - und ED-A <sup>+</sup> Fn - Deposition in den MCT-Gruppen.....	53
Abbildung 30: Immunfluoreszenz-Detektion von weiteren Fn- und Tn-C - Spleißvarianten im Myokardgewebe .....	54
Abbildung 31: ED-A <sup>+</sup> Fn-Serumkonzentrationen im Vergleich der drei Versuchsgruppen ....	55
Abbildung 32: B <sup>+</sup> Tn-C und C <sup>+</sup> Tn-C Serumkonzentrationen im Vergleich der drei Versuchsgruppen.....	56

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Marcus Franz, apl. Prof. Dr. Alexander Berndt, Dr. Katja Grün,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Marcus Franz für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können und die Bereitstellung des Themas bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich für sein Engagement bei der Betreuung der Dissertation sowie seine sorgfältige Korrektur meiner Entwürfe.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Christian Schulze für die Ermöglichung der Arbeit durch die Bereitstellung der Räumlichkeiten.

Ebenso gilt ein großer Dank apl. Prof. Dr. Alexander Berndt für seine fachliche Hilfe in allen pathologischen Fragestellungen und für die angenehme Zusammenarbeit am Mikroskop.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Katja Grün für die jahrelange ausgezeichnete Betreuung im Labor, ihre wertvollen Ratschläge und auch die vielen netten und verständnisvollen Gespräche.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meiner Familie, für die Ermöglichung meines bisherigen Lebenswegs, bedanken. Sie hat mich als eine emotionale Stütze stets motiviert und so einen bestmöglichen Rahmen für die Erstellung dieser Arbeit geschaffen.