

**AUS DER ABTEILUNG
FÜR PNEUMOLOGIE**

PROFESSOR DR. MED. MICHAEL PFEIFER

**DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**



Effekt des Endothelin-Antagonisten Bosentan auf die Leistungsfähigkeit und neurohumorale Regulation bei der bleomycininduzierten Lungenfibrose

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jörg Martin Nüchterlein

2013

**AUS DER ABTEILUNG
FÜR PNEUMOLOGIE**

PROFESSOR DR. MED. MICHAEL PFEIFER

**DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**



Effekt des Endothelin-Antagonisten Bosentan auf die Leistungsfähigkeit und neurohumorale Regulation bei der bleomycininduzierten Lungenfibrose

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jörg Martin Nüchterlein

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Michael Pfeifer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann
Tag der mündlichen Prüfung:	19. November 2013

Meinen Eltern und meiner Frau Susanne

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1	Tierexperimentelle Versuchsphase	3
2.1.1	Haltung und Gruppeneinteilung	3
2.1.2	Versuchsaufbau	3
2.1.3	Induktion der Lungenfibrose und deren Behandlung	4
2.1.3.1	Induktion der Lungenfibrose	4
2.1.3.2	Behandlung mit Bosentan	5
2.1.4	Belastungstest	5
2.1.4.1	Kleintierergometrie	5
2.1.4.2	Trainingsprogramm	6
2.1.4.3	Abbruchkriterien	6
2.1.4.4	Ermittlung der Ausgangskondition	6
2.1.4.5	Ermittlung der Leistungsfähigkeit	7
2.1.5	Hämodynamische Messung	7
2.1.5.1	Tail-Cuff-Plethysmographie	7
2.1.5.2	Messung des RVSP	8
2.1.6	Blut- und Organentnahme	8
2.2	Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes	9
2.2.1	Probenvorbereitung	9
2.2.2	Durchführung	9
2.2.3	Auswertung	10
2.3	Genexpressionsanalyse	10
2.3.1	RNS – Isolation	10
2.3.2	RNS – Konzentrationsbestimmung	11
2.3.3	RNS – Qualitätskontrolle	12
2.3.4	cDNS – Synthese	13
2.4	Quantitative Echt-Zeit-PCR	14
2.4.1	Prinzip	14
2.4.2	Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) mittels Light – Cyclor	17
2.4.2.1	Allgemeines	17
2.4.2.2	Primer – Design	18
2.4.2.3	Durchführung	19
2.4.2.4	Auswertung (rel. Quantifizierung)	20
2.4.3	Genexpressionsanalyse mittels Taqman – Technologie	21
2.4.3.1	Allgemeines	21
2.4.3.2	Primer-/Sonden - Design	22
2.4.3.3	Durchführung	23
2.4.3.4	Auswertung	24
2.5	Plasmauntersuchung mittels Endothelin-1 ELISA	25
2.5.1	Allgemeines	25
2.5.2	Durchführung	26
2.5.3	Auswertung	27
2.6	Statistische Auswertung	27

3	ERGEBNISSE	28
3.1	Bosentan verbessert die Leistungsfähigkeit im Bleomycin-Modell	28
3.1.1	Leistungsfähigkeit im Verlauf	28
3.1.2	Korrelationen zur Laufleistung	29
3.1.3	Veränderungen des Körpergewichts	30
3.2	Verbesserung der Lungenfibrose	32
3.2.1	Relatives Lungengewicht	32
3.2.2	Hydroxyprolingehalt der Lunge	33
3.3	Pulmonalen Hypertonie	34
3.3.1	Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck (RVSP)	34
3.3.2	Relatives Herzgesamtgewicht	35
3.3.3	Rechtsventrikuläre Hypertrophie	36
3.3.4	Korrelationen des rechtsventrikulären Gewichtes	37
3.3.5	Arterieller systolischer Blutdruck	38
3.4	Neurohumorale Regulation	39
3.4.1	eNOS – mRNA Expression in der Lunge	39
3.4.2	Endothelin-1 (ET-1)–mRNA in der Lunge	40
3.4.3	Endothelin-A–Rezeptor mRNA in der Lunge	41
3.4.4	Endothelin-B–Rezeptor mRNA in der Lunge	42
3.4.5	ET-1 Konzentration im Plasma	43
4	DISKUSSION	44
4.1	Bosentan verbessert die Leistungsfähigkeit im Bleomycin-Modell	44
4.2	Verbesserung der Lungenfibrose	45
4.3	Verbesserung der pulmonalen Hypertonie	46
4.4	Veränderungen des Körpergewichtes	47
4.5	Veränderungen auf molekular-biologischer Ebene	48
4.6	Ausblick	51
5	ZUSAMMENFASSUNG	52
6	LITERATURNACHWEIS	53
7	ANHANG	62
7.1	Abkürzungsverzeichnis	62
7.2	Danksagung	65
7.3	Eigenständigkeitserklärung	65
7.4	Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

Die Lungenfibrose stellt den Endzustand der interstitiellen Lungenerkrankungen dar.

Ätiologisch betrachtet sind diese Lungenerkrankungen eine heterogene Gruppe. Bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) kommt es aufgrund von Entzündungsprozessen und abnormer Wundheilung zu Epithel- und Endothelschäden in der Lunge, die zu einem narbigen Umbau des Lungenparenchyms führen [1]. Das mittlere Überleben nach der Diagnosestellung liegt bei der IPF bei unter 3 Jahren [2,3,4].

Aktuell gibt es keine etablierte Therapie, die die Lebenserwartung verbessert [5].

Wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass die Entstehung einer pulmonalen Hypertonie (PH) im Laufe der Erkrankung für die schlechte Prognose der IPF von Bedeutung ist [6, 7].

Die Genese der PH bei Patienten mit IPF hat mehrere Ursachen. Durch die Fibrose kommt es einerseits zur Zerstörung des Lungenparenchyms und somit auch der Lungengefäße.

Andererseits kommt es durch Störung des pulmonalen Gasaustausches aufgrund des narbigen Umbaus des Lungenparenchyms zu einer hypoxischen Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße.

Ferner werden Veränderungen der Lungengefäße beobachtet – das pulmonale, vaskuläre Remodelling, das auch bei der, nur die Lungengefäße betreffenden, eigenständigen pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) beobachtet wird [8,9,10].

Beim pulmonalvaskulären Remodeling kommt es unter anderem zur endothelialen Dysfunktion mit einer Imbalance von Vasokonstriktoren wie z.B. Endothelin-1 (ET-1) und Vasodilatoren. Mehrere Arbeiten konnten sowohl eine Korrelation zwischen der ET-1 Konzentration und dem Schweregrad der PAH aufzeigen [11,12,13], als auch die enge Beziehung der endothelialen Dysfunktion und des ET-Systems bei der Entstehung der PH auf dem Boden der IPF nachweisen [14].

ET besitzen neben der Rolle der Vasoregulation antiinflammatorische, antifibrotische und antihypertrophische Effekte [1, 15]. Über die vasokonstriktorische Wirkung von ET hinaus, konnte eine stimulierende Wirkung auf die Kollagensynthese, sowie eine Verminderung der Kollagen-abbauenden Enzyme gezeigt werden.

Die Rolle des ET-Systems bei der Lungenfibrose konnte in der Zellkultur, in der ET-1 die Kollagen-Synthese stimuliert, nachgewiesen werden [16].

Desweiteren wurde bei ET-1 transgenen Mäusen eine fibrotisch vermehrte Lungenmatrix nachgewiesen [17].

In verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten fand sich eine Korrelation zwischen der ET-1 Konzentration und der Aktivität der IPF [13,18,19]. Durch eine Hemmung des Endothelinsystems mittels des ET-Antagonisten Bosentan konnten in-vitro Studien zeigen, dass sowohl die Fibroblastenproliferation [20], wie auch die Kollagensynthese [16] gehemmt werden können.

Eine Reduktion der Lungenfibrose konnte im etablierten Tiermodell der Bleomycin-induzierten PF bei Ratten in vivo unter Bosentan gezeigt werden [21].

In einer weiteren Arbeit [15], die jedoch eine unterschiedliche Methode zur Bestimmung der Lungenfibrose heranzog, konnte dieser Effekt von Bosentan auf die Lungenfibrose nicht

bestätigt werden. Ferner kam es bei Patienten mit histologisch nachgewiesener IPF zu einer Verlangsamung des Krankheitsverlaufs und es zeigte sich ein Trend zum besseren Überleben unter einer Bosentan-Therapie [22].

Der ET-Rezeptorantagonist Bosentan, der sowohl zu einer Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit, als auch der pulmonalen Hämodynamik führt, ist Bestandteil der etablierten Therapie der idiopatischen PAH [11,23,24].

Bisher gibt es jedoch keine Studien, die den Effekt eines ET-Rezeptorantagonisten auf die Leistungsfähigkeit und die Entwicklung einer PH auf dem Boden einer Lungenfibrose analysieren. Zudem bestehen widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Effektes von ET-Rezeptorantagonisten auf die Lungenfibrose [15,21].

Aufgrund dessen haben wir in dieser Dissertation die Hypothese geprüft, dass es durch die Applikation des ET-Rezeptorantagonisten Bosentan zu einer Steigerung der Leistungsfähigkeit durch die Verbesserung der PH und der Lungenfibrose kommt.

Hierfür wurde das Modell der Bleomycin-induzierten LF gewählt. Zur Evaluation der PH wurde der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) und die rechtsventrikuläre Hypertrophie gemessen. Zur Analyse der LF bestimmten wir das Lungengewicht und den Hydroxyprolinegehalt der Lungen. Ferner wurde zur Evaluation des Therapieeffektes die Leistungsfähigkeit der Ratten mittels Ergometrie gemessen.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Versuchsphase

2.1.1 Haltung und Gruppeneinteilung

Für den Versuch wurden 30 männliche, vier Wochen alte Wistar Ratten der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland), mit einem Durchschnittsgewicht von $260 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$ verwendet. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen bei normaler Kost und Wasser ad libidum bei einem zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

Zur Untersuchung wurden folgende Gruppen gebildet:

- 1 = Kontrollgruppe (n=10)
- 2 = Bleomycingruppe (n=7)
- 3 = Bleomycin- und Bosentangruppe (n=7)

Die beschriebenen Versuche sind gemäß §81 des Tierschutzgesetzes genehmigt worden. Sie wurden im Zeitraum von 01.09.2004 bis 1.04.2005 durchgeführt.

2.1.2 Versuchsaufbau

Die Ratten erhielten ein 7-tägiges Trainingsprogramm, um an das Laufband konditioniert zu werden. Im Anschluss daran erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen die Ermittlung der Ausgangsleistung, die als individuelle Maximalleistung festgelegt wurde.

Den Tieren der Bleomycin-Gruppe und der Bleomycin+Bosentan-Gruppe wurde am Tag 0 (t_0) mittels intratrachealer Instillation von Bleomycin ($2,5 \text{ mg/kg KG}$) eine pulmonale Fibrose induziert. Beginnend mit Tag 1 (t_1) wurde bei der Bleomycin+Bosentan-Gruppe die Behandlung mit Bosentan (100 mg/kg KG) eingeleitet. Um die Medikamente gewichtsadaptiert verabreichen zu können, wurden die Tiere zweimal wöchentlich gewogen. Die Belastbarkeit jeder Ratte wurde im Verlauf des vierwöchigen Versuchs täglich bestimmt. Abschließend wurde bei jeder Ratte am Tag 26 (t_{26}) der RVSP mittels Rechtsherzkatheter gemessen, die Organe (Herz und Lunge) entnommen und eingefroren, um sie molekularbiologisch und immunhistochemisch zu untersuchen (Abb. 1).

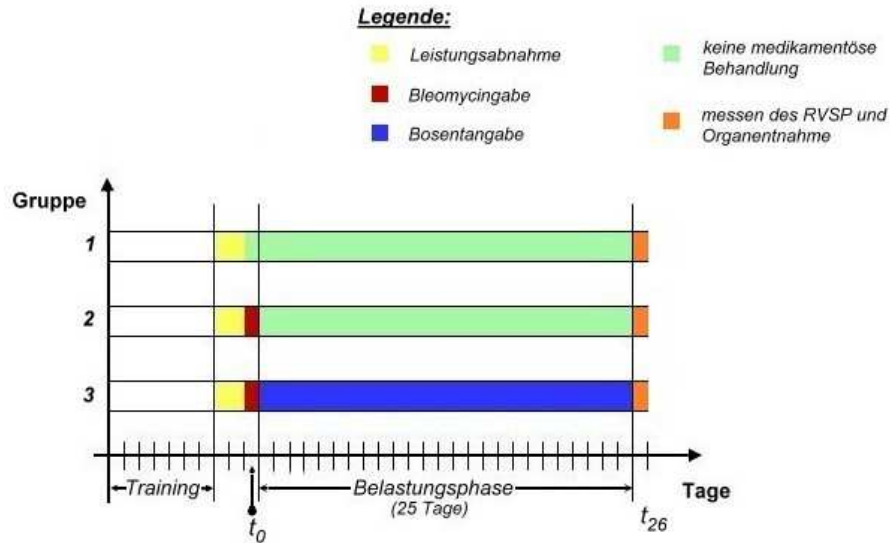


Abb. 1: Übersicht über den gesamten Versuchsaufbau

2.1.3 Induktion der Lungenfibrose und deren Behandlung

2.1.3.1 Induktion der Lungenfibrose

Das Zytostatikum Bleomycin (*Bleomycinsulfat*, cell-pharm-GmbH, Hannover, Deutschland) wurde unter Berücksichtigung der Richtlinien zum Arbeiten mit Zytostatika in 0,9%igen NaCl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelöst und am Tag 0 den Tieren der Bleomycin- und Bosentangruppe intratracheal verabreicht [25].

Im Vorversuch wurde zur Induktion einer Fibrose eine Injektionsdosis von 2,5 U/kg Körpergewicht (1Unit=1mg) ermittelt. Daraus ließ sich ein gewichtsabhängiges Injektionsvolumen für jede Ratte errechnen.

Mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran (Florene „R“, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) wurden die Ratten in eine Inhalationsnarkose versetzt und mit einem G16-Katheter (Johnson&Johnson, Norderstedt, Deutschland) intubiert. Die entsprechende Menge Bleomycin, jeweils auf ein Gesamtvolumen von 0,25 ml mit NaCl 0,9% aufgefüllt, wurde mit einer Insulinspritze (BD Plastikpak, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) über den Katheter einmalig appliziert und anschließend jeweils mit 0,5 ml Luft nachgespült, um sowohl eine adäquate Verteilung des Medikaments in der Lunge zu gewährleisten als auch zu verhindern, dass eine Restdosis in der Spritze verbleibt. Den Kontrolltieren wurde analog dazu nur 0,25ml NaCl 0,9%, gefolgt von 0,5ml Luft appliziert.

2.1.3.2 Behandlung mit Bosentan

Bosentan (Actelion, Allschwil, Schweiz) wurde täglich angesetzt und unmittelbar danach gewichtsadaptiert in einer Dosis von 100mg/kg Körpergewicht mittels Schlundsonde (18mm, Scanbur, Karlslunde, Dänemark) verabreicht [26].

2.1.4 Belastungstest

2.1.4.1 Kleintierergometrie

Bei dem Gerät (Abb. 2) handelt es sich um ein motorbetriebenes Laufband, an dessen Ende 15 Bügel angebracht sind, die den Strom von der Stromquelle weiterleiten und bei Kontakt einen milden Stromschlag auslösen. Die Stromstärke kann zwischen 0,5 und 1,5 mA geregelt werden. Die Geschwindigkeit ist zwischen 0 und 30m/min veränderbar. Darüber hinaus kann die Neigung des Laufbandes zwischen 0 und 12° (Grad), in 6° – Schritten verändert werden. Um das Laufband herum begrenzt ein Plexiglaskasten den Innenraum, in dem die Tiere laufen.

Zum Schutz des Tieres ist an der Außenseite des Laufbandes ein Notausschalter angebracht, der sowohl das Laufband stoppt als auch den Stromfluss unterbricht.

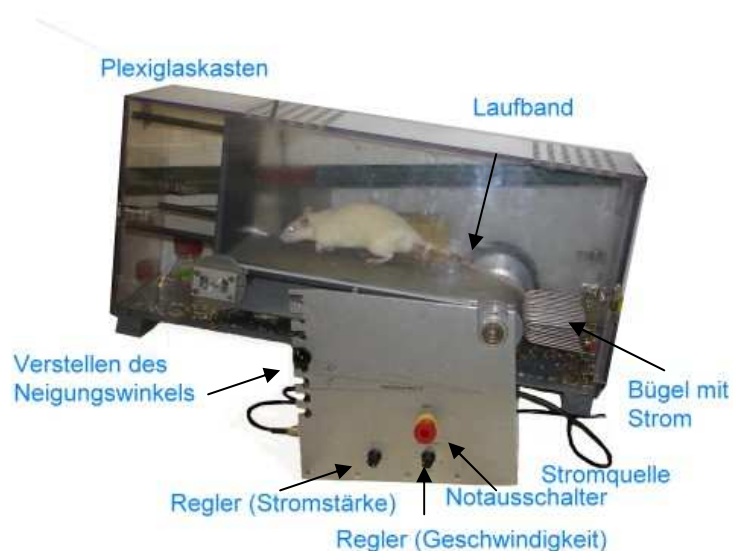


Abb. 2: Aufbau des Laufbandes

2.1.4.2 Trainingsprogramm

Vor der eigentlichen Versuchsphase erhielten die Ratten ein 7-tägiges Trainingsprogramm. Dadurch sollte eine Gewöhnung an das Laufband sichergestellt werden und schließlich ihre individuelle Leistungsfähigkeit bestimmt werden.

Das Trainingsprogramm verlief nach einem zuvor festgelegten Schema. Schrittweise wurden die Parameter „Zeit“ und „Geschwindigkeit“ erhöht, aber zusätzlich auch der Parameter „Winkelgrad“, um eine Gewöhnung der Ratten an das Laufband zu erreichen (Tab. 1).

Tag	Zeit in Minuten	Geschwindigkeit in Meter pro Minute	Winkel in Grad
1	5	10	0
2	7,5	10	0
3	10	10	6
4	7,5	20	6
5	7,5	20	12
6	10	20	12
7	15	25	12

Tab.1: 7-tägiges Trainingsprogramm

Das Laufband war so konstruiert, dass sich zwischen dem Ende der Lauffläche und den Bügeln, die den milden Stromschlag auslösten, eine für die Tiere deutlich wahrnehmbare Absenkung befand. Daher wurden die Tiere nicht ausschließlich auf den Stromschlag konditioniert, sondern zunächst auf die vorgeschaltete Absenkung. Erst wenn sie darauf nicht reagierten, kamen sie mit dem Strom in Berührung.

2.1.4.3 Abbruchkriterien

Das Tier war ausbelastet, wenn es zu einem dreimaligen Kontakt für länger als zwei Sekunden mit der Stromquelle kam. Sobald dieses Kriterium erfüllt war, wurde die Zeit angehalten, das Band gestoppt und die erzielte Zeit als Maximalleistung und somit als Ausgangswert festgelegt.

2.1.4.4 Ermittlung der Ausgangskondition

Im Anschluss an das 7-tägige Training erfolgte die Evaluation der maximalen Leistungsfähigkeit an zwei aufeinander folgenden Tagen. Bei einer Geschwindigkeit von 25m/min und einem Winkel von 12° wurde die Zeit gemessen, bis die Ratte das Abbruchkriterium erfüllte.

2.1.4.5 Ermittlung der Leistungsfähigkeit

Nachdem der Ausgangswert bestimmt war, wurden täglich, nach der Bleomycin-Gabe (t_0), über einen Zeitraum von 25 Tagen ($t_1 - t_{25}$) Leistungskontrollen durchgeführt. Dabei musste jede Ratte bei einer Geschwindigkeit von 25 m/min und einem Winkel von 12° laufen, bis dreimal eines der Abbruchkriterien erfüllt wurde. Daraus resultierten die jeweiligen Tagesleistungen. Erreichte eine Ratte die Zeit ihres Ausgangswertes, wurde der Lauf beendet und der Ausgangswert als Maximalwert der Tagesleistung notiert. Nach zwei Wochen waren Tiere der Bleomycin-Gruppe nicht mehr in der Lage bei einer Geschwindigkeit von 25 m/min zu laufen, so dass die Geschwindigkeit auf 20 m/min reduziert wurde und die Leistungsfähigkeit an Tag 15 als neue Basislinie verwendet wurde. Insgesamt ergab sich ein Leistungsvergleich über die Tage $t_1 - t_{14}$ bei 25m/min und 12° und die Tage $t_{16} - t_{25}$ bei 20m/min und 12°. Für jede Gruppe wurden die Werte der jeweiligen Tagesleistungen gemittelt und der erhaltene Mittelwert durch die Formel

$$\frac{\text{Tagesleistung(gemittelt)} \times 100}{\text{Ausgangslastung(gemittelt)}}$$

in Relation zur Ausgangsleistung gesetzt, die mit 100% festgesetzt wurde. Daraus resultierte für jeden Tag die jeweilige Leistung in % zur Ausgangsleistung der drei Gruppen.

2.1.5 Hämodynamische Messung

2.1.5.1 Tail-Cuff-Plethysmographie

Am Ende der 25-tägigen Versuchsphase wurde vor der Rechtsherzkatheterisierung eine Blutdruckmessung mittels Tail-cuff-Methode [27] mit dem BP-Recorder 8005 (W&W Electronics, Hofheim, Deutschland) durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, bei Ratten auf nicht-invasive Weise den systolischen Blutdruck zu messen. Dazu wurden die Ratten einzeln und in wachem Zustand in einen Röhrenkäfig gesperrt, an den sie durch wiederholte Proben gewöhnt waren. Dadurch wurden Bewegungen, auf die das Messsystem sehr sensitiv reagierte, unterbunden. Um die zu untersuchende Schwanzarterie zu hyperämisieren, wurde diese anschließend 20min mit einem Wärmekissen bei ca. 37°C erwärmt. Danach wurde am Schwanz der Ratte eine Druckmanschette – analog der Riva-Rocci-Methode beim Menschen – und distal davon ein piezoelektrischer Pulsaufnehmer befestigt. Kernstück des Pulsaufnehmers ist ein hochsensibler piezoelektrischer Kristall, der Druckschwankungen in der Schwanzarterie in elektrische Signale umwandelt. Nach elektronischer Verstärkung und Filterung wurde eine Pulsationskurve der Schwanzarterie aufgezeichnet, aus der der systemische Blutdruck abgeleitet werden konnte.

Die Messungen wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt und die beiden erhaltenen Werte gemittelt.

2.1.5.2 Messung des RVSP

Am 26. Tag der Studie fand die Messung des RVSP mittels Rechtsherzkatheter statt. Mit Isofluran erfolgte die Narkoseeinleitung. Daran schloss sich die eigentliche Narkose mit Trapanal (100mg/kg Körpergewicht; Altana Pharma, Konstanz, Deutschland) mittels intraperitonealer Injektion an. Über die Vena jugularis externa wurde ein mit Heparin (500iU/ml; Liquemin N 25000, Roche Pharma, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) gespülten Katheter (1mm×80mm; B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Schließlich wurde mit dem Druckabnehmer (Hellige, Programm19, Freiburg, Deutschland) bei hämodynamisch stabilen Bedingungen der RVSP ermittelt.

2.1.6 Blut- und Organentnahme

Nach der RVSP-Messung wurde über den Katheter ein Röhrchen EDTA-Blut entnommen, das bei 4°C mit 3000U 10min lang zentrifugiert (Bio fuge 28RS, Heraeus Sepatech, Osterode/Harz, Deutschland) wurde. Der resultierende Plasmaüberstand wurde für eine spätere Verarbeitung abgeschöpft und zunächst im Gefrierschrank bei -80°C gelagert.

Nach einem Hautschnitt wurde der Thorax kaudalwärts parasternal eröffnet, um Herz und Lunge enbloc entnehmen zu können. Entlang der Linea alba wurde der Schnitt fortgesetzt und das Abdomen eröffnet, um Veränderung der Leber oder die Bildung von Aszitis in der Bauchhöhle beurteilen zu können.

Die Lunge wurde gewogen und anschließend in rechten und linken Lungenflügel getrennt. Die linke Lungenhälfte war für die spätere Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes vorgesehen und wurde auf flüssigem Stickstoff durchgefroren und bis zur Homogenisierung bei -80°C gelagert. Von dem rechten Lungenflügel wurde der Lobus cranialis abgetrennt und mit 4%ig-PBS-gepufferten Formalin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei konstantem Druck, der durch ein Infusionssystem gewährleistet war, gespült. Danach wurde dieser für 48 Stunden in derselben Lösung inkubiert, bevor die Einbettung in Paraffin erfolgte. Der verbliebene Rest des rechten Lungenflügels, der im Gegensatz zum Menschen noch aus Lobus accessorius, Lobus medius und Lobus caudalis bestand [28], wurde mit 0,9%igem NaCl gespült, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Dieser diente später zur Untersuchung der Genexpression. In das Herz wurde kardioplege Lösung (Custodiol Lsg., Firma Köhler, Deutschland) injiziert. Es wurde gewartet bis es zu einer Erschlaffung des sich noch kontrahierenden Herzmuskels kam. Durch einen Horizontalschnitt auf Ventrikelenebene wurden die Vorhöfe und das Septum voneinander getrennt. Die Herzklappen und das Herzohr wurden entfernt. Die beiden Herzkammern wurden gewogen, nochmals geteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Das Septum wurde nach dem Wiegen verworfen.

2.2 Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes

2.2.1 Probenvorbereitung

Die zuvor bei -80°C auf flüssigem Stickstoff durchgefrorenen linken Lungenhälften wurden aufgetaut, mit 5ml NaCl versetzt und anschließend in einem Homogenisator zerkleinert. Von dem so für jede Lungenhälfte gewonnenen Homogenisat werden jeweils 40 μl in Eppendorfcups überführt.

2.2.2 Durchführung

Zunächst wurden Standard (Standardverdünnungsreihe) und Leerwert hergestellt. Aus einer Stammlösung, die 1mg Hydroxyprolin (cis-4-Hydroxy-L-Prolin, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) in 1ml NaCl enthielt, wurde eine Verdünnungsreihe mit 0,5 – 0,7 – 1,0 – 5,0 – 10,0 – 15,0 – und 20,0 μg , jeweils auf ein Endvolumen von 40 μl gebracht, hergestellt. Dieser Standard wurde wegen seiner Instabilität jedes Mal frisch angesetzt. Der zusätzlich hergestellte Leerwert enthielt nur 40 μl NaCl.

Die Homogenisate wurden derweil bei 4000 U/min 10min lang zentrifugiert. Dadurch bildeten sich drei Phasen: eine obere, fetthaltige Schicht, eine mittlere wasserhaltige Schicht, in der die hydrophile Aminosäure Hydroxyprolin vorkam, und eine untere Schicht, die vor allem Zelldetritus enthielt. Für die weitere Untersuchung wurden jeweils 40 μl aus der wasserhaltigen Mittelschicht in Eppendorfcups überführt.

Sowohl zu den Gewebeproben wie auch zu der Standardverdünnungsreihe und dem Leerwert wurden jeweils 10 μl 10molariger NaOH (Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Eppendorfcups 25min bei 121°C und einem Druck von 1bar autoklaviert, um die Hydrolysereaktion ablaufen zu lassen. Während dieser Zeit wurde bereits die Chloramin T-Lösung hergestellt. Sie bestand aus 1,27g Chloramin T-Pulver (Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland), das in 20ml 50%igem n-Propanol (Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland) aufgelöst wurde und anschließend mit Citratpuffer (pH 6,5) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) auf ein Endvolumen von 100ml gebracht wurde.

Nach dem Autoklavieren wurde in jedes Eppendorfcup 450 μl der Chloramin T – Lösung pipettiert und nach kurzem Vortexen der Ansatz 25min bei Raumtemperatur inkubiert. Fünf Minuten vor Ablauf dieser Zeit wurde das Ehrlichsreagenz hergestellt. Es besteht aus 3g DMAP (Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland), das in 13,3ml 100%igem n-Propanol gelöst und anschließend mit 6,7ml Perchlorsäure (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) versetzt wurde. Nach der Inkubation, bei der das Chloramin an das Hydroxyprolin gebunden hat, wurde jedem Cup 500 μl Ehrlichsreagenz zugesetzt, kurz gevortext und anschließend bei 65°C 20min im Heizblock inkubiert. Zum Abschluss wurde aus jedem Cup 200 μl entnommen und in die entsprechenden Vertiefungen der Photometerplatte (96 Well ELISA Platten,

ELISA Reader Emax, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) pipettiert, um die jeweilige Extinktion bei 540nm zu messen.

2.2.3 Auswertung

Die Konzentrationsbestimmung von Hydroxyprolin geschah über die Bestimmung der optischen Dichte (OD). Anhand der OD-Werte der Verdünnungsreihe erstellte die Computersoftware (ELISA Reader Emax, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) eine Eichgerade mit Hilfe der die OD-Werte der Proben, in die jeweilige Konzentration umgerechnet werden konnte.

2.3 Genexpressionsanalyse

2.3.1 RNS – Isolation

Mit der Single Step-Methode [29] wurde zunächst die Gesamt-RNS aus dem Lungengewebe isoliert. Um eine Kontamination der Proben durch ubiquitär vorkommende RNasen zu vermeiden, musste auf sauberes, RNase-freies Arbeiten geachtet werden.

Daher wurden so oft wie möglich sterile Einweg-Materialien verwendet oder andernfalls eine 1%ige Diethylprocarbonat (DEPC)-Behandlung der Materialien durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Proben ständig auf Eis gekühlt.

Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen: das Lungengewebe wurde in Falcontubes mit 15ml Trizollösung (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und anschließend in einem Homogenisator (*Ultra Turrax T25, KIKA Labortechnik, Deutschland*) zerkleinert. In der Trizollösung ist sowohl Guanidinisothiocyanat (GTC) als auch das saure Phenol enthalten. GTC ist ein chaotropes Salz, das Proteine – sogar RNasen – denaturiert und damit inaktiviert. Das saure Phenol bindet DNS und senkt den pH-Wert, wodurch zusätzlich kleine DNS-Fragmente aufgelöst werden. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde pro Falcontube 3ml phenol-bindendes Chloroform (Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben und gut geschüttelt. Es bildete sich eine milchig-trübe Suspension. Nach weiteren drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 4°C und 4000 U/min 15min lang zentrifugiert, um eine Phasenauftrennung zu bewirken. Dabei entstanden drei Phasen. Die oberste Schicht war farblos und enthielt die RNS, die mittlere Schicht war milchig-trüb und enthielt die großen DNS-Fragmente, während die untere rosafarbene Schicht das an Chloroform gebundene Phenol sowie nicht-nukleinsäurehaltiges Zellmaterial enthielt. Die obere RNS-haltige Schicht wurde abpipettiert, in ein neues Falcontube überführt und wiederum mit 3ml Chloroform versetzt, um eventuell noch vorhandene Phenolreste zu binden, anschließend gut geschüttelt und bei 4°C und

4000 U/min weitere 10min zentrifugiert. Bei der erneut auftretenden Phasenauffrennung ließen sich zwei Schichten unterscheiden, wobei sich in der oberen wieder die RNS befand und in der unteren das Chloroform mit den Phenolresten. Der RNS-haltige Überstand wurde in ein neues Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert, mit 7,5ml Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, um die RNS auszufällen und bei Raumtemperatur 10min inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation (4°C, 10.000 U/min, 15min) in einer Ultrazentrifuge (Varifuge 20RS, Heraeus Sepatech, Osterode/Harz, Deutschland, Rotor 20.16) bildete sich ein RNS-Pellet, das, nachdem die darüber befindliche wässrige Phase mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde, in 5ml 70%igem (-20°C) Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelöst und gevortext wurde. Erneut fiel die RNS aus. Nach weiteren 5min in der Ultrazentrifuge (4°C, 7.500 U/min) entstand das RNS-Pellet wieder, das mittels Wasserstrahlpumpe wiederum von dem wässrigen Überstand befreit wurde. Nach 5-minütigem Trocknen wurde das Pellet in 500µl RNase-freiem Aqua destillata gelöst und die so isolierte RNS in Eppendorfcups überführt, wo sie bis zur Konzentrationsbestimmung bei -80°C gelagert wurde.

2.3.2 RNS – Konzentrationsbestimmung

Die zuvor isolierte RNS wurde in einer Doppelbestimmung am Photometer (Gene Quant Pro-Photometer, Bio Chrom Ltd., Cambridge, England) vermessen, um ihre Konzentration in den verschiedenen Proben zu ermitteln. Dazu wurden 1:50-Verdünnungen (VG) der Proben mit Aqua destillata hergestellt. Aqua destillata diente auch als Leerwert.

Die Konzentrationsbestimmung funktionierte über die Messung der optischen Dichte (OD). Bei Nukleinsäuren wurde die Konzentration bei einer spezifischen Wellenlänge von 260nm aus der OD errechnet. Da Proteine dagegen bei einer spezifischen Wellenlänge von 280nm und Kohlenhydrate, Peptide, Phenole und aromatische Verbindungen bei einer Wellenlänge von 230nm absorbierten, konnte aus dem jeweiligen Verhältnis auch eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNS getroffen werden. Das Verhältnis OD_{260nm} / OD_{280nm} sollte dabei im Idealfall zwischen 1,6 und 2,0 liegen, während der Quotient OD_{260nm} / OD_{230nm} bei reinen RNS-Proben größer 2,0 sein sollte [30]. Aus der, bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmten OD berechnete das Photometer nach folgender Formel die RNS – Konzentration (c) der Ausgangslösung:

$$c = OD \times VG \times MPF$$

Da der Multiplikationsfaktor (MPF) für RNS 40 ist und die VG (1:50) ebenfalls bekannt war, ließ sich die Formel wie folgt verkürzen:

$$c = OD \times 2000 \quad [c \text{ in } \mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Die erhaltenen Doppelbestimmungswerte wurden gemittelt. Anschließend wurde für jede Probe das Volumen (V) berechnet, das man in die Reverse-Transkriptase-Reaktion einsetzt, damit jeweils die Masse (m) von 1µg RNS enthalten war [30]:

$$V = \frac{m}{c} \Rightarrow \frac{1\mu\text{g}}{OD \times 2000} \quad [\text{V in } \mu\text{l}]$$

2.3.3 RNS – Qualitätskontrolle

Mit einem RNS-Nano-Chip (RNA 6000 Nano Assay, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) wurde anschließend an die photometrische Konzentrationsbestimmung die RNS-Qualität überprüft, um vor den Genexpressionsanalysen sicherzugehen, dass die zu untersuchende RNS nicht schon degradiert war. Neben dem RNase-freien Arbeiten konnte damit auch sichergestellt werden, dass im vorangegangenen Arbeitsschritt nur die Konzentration der RNS und nicht die von DNS-Fragmenten, Oligonukleotiden oder monomeren Nukleotiden bestimmt wurde. Bei der Untersuchung handelte es sich um eine kapillarelektrophoretische Auftrennung. Mit einem Chip konnten zwölf Proben untersucht werden. Dazu wurde der Chip zunächst mit 9µl Gelmatrix beladen. In die Probenfächer und in das Referenzfach wurde jeweils 5µl Fluoreszenzfarbstoff (RNA 600 Nano Marker, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) gegeben und anschließend 1µl Probe in jedes der zwölf Fächer pipettiert bzw. 1µl RNS-Standard-Leiter (RNA 6000 ladder, Ambion Inc, Berlin, Deutschland) in das Referenzfach.

Der Fluoreszenzfarbstoff interkalierte mit den eingebrachten Proben. Nachdem ein Spannungsfeld erzeugt wurde, trennten sich die Proben nach ihrer Größe elektrophoretisch auf und wurden an Hand ihrer Migrationsgeschwindigkeit mittels Laser detektiert. Das Rechnerprogramm (Bioanalyser Agilent 2010 Software) erzeugte sowohl ein Elektropherogramm, wie auch ein sogenanntes „gel-like-picture“, indem die RNS-Fragmente durch Banden dargestellt wurden.

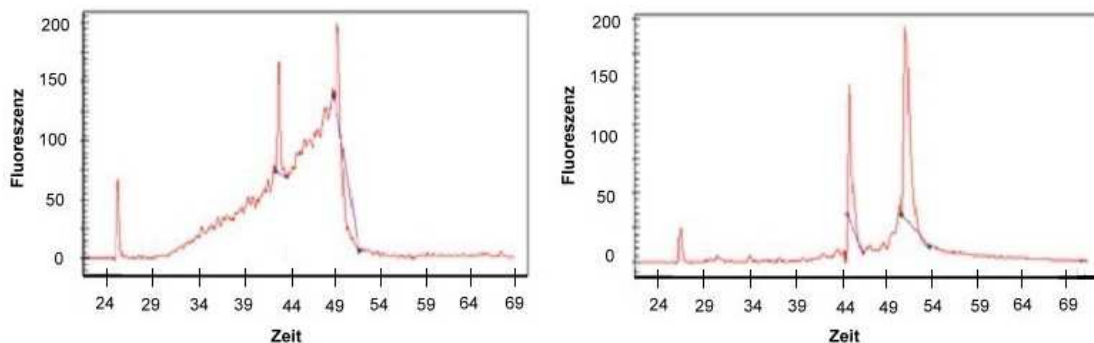


Abb. 3: Degenerierte Gesamt-RNS (links) und intakte Gesamt-RNS (rechts)

Das Elektropherogramm einer intakten RNS lässt einen anfänglichen Markerpeak und zwei charakteristische ribosomale Peaks (18S-RNS und 28S-RNS) erkennen (Abb. 3). Anhand dieser Charakteristik wurde schließlich jede Probe beurteilt, so dass letztlich nur Proben zur Genexpressionsanalyse verwendet wurden, die sowohl ausreichend RNS-Konzentration, als auch RNS-Qualität besaßen.

2.3.4 cDNS – Synthese

Da die aus der Lunge isolierte Gesamt-RNS nicht als Ausgangsmaterial für die quantitative Real-Time-PCR verwendet werden konnte um komplementäre DNS – Sequenzen zu synthetisieren, musste sie in einem Zwischenschritt in die cDNS umgeschrieben werden. Als Enzym wurde dabei die Moloney-Murine-Leukemia-Virus Reverse Transkriptase (MMLV-RT; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Sie ist eine RNS-abhängige DNS-Polymerase, die aus dem Moloney-Maus–Leukämie-Virus isoliert wurde [30]. Um die reverse Transkription in Gang zu setzen, wurde ein Startmolekül (Primer) benötigt. Verwendet wurden dafür randomisierte Hexamerprimer (random hexamers, Promega, Mannheim, Deutschland), die an eine beliebige Stelle der Gesamt-RNS hybridisieren und damit sicherstellen, dass alle RNS-Bereiche in cDNS transkribiert werden [30]. Bei der Durchführung war darauf zu achten, dass die Reagenzien erst kurz vor dem Gebrauch aufgetaut und die einzelnen Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt wurden. Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Als Reaktionsansatz wurden jeweils 1µg isolierte Gesamt-RNS und 1µl Random-Primer zusammenpipettiert und auf ein Gesamtvolumen von 10µl mit sterilem Aqua destillata aufgefüllt. Nach einer 3-minütigen Inkubationszeit bei 70°C, in der die Sekundärstrukturen der Gesamt-RNS aufgeschmolzen wurden, kühlten die Proben anschließend wieder auf Raumtemperatur ab. Dadurch konnten die Primer hybridisieren. In dieser Zeit wurde in folgender Reihenfolge ein Master-Mix erstellt, der im Anschluss obigem Reaktionsansatz zugefügt wurde:

- 4 µl 2,5mM dNTP [dATP, dGTP, dCTP, dTTP] (Amersham, Pharmacia Biotech Inc., Little Chalfont, England)
- 4 µl 5-fach RT-Standardpuffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 1 µl RNasin (Promega, Mannheim, Deutschland)
- 1 µl MMLV-RT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Der 20µl Ansatz wurde gevortext, herunter zentrifugiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, was dem Temperaturoptimum der MMLV-RT entsprach. Diese komplettierte jetzt die Basen zwischen den Primern, während das RNasin eventuell noch vorhandene RNasen inhibierte. Abschließend wurde durch ein 2-minütiges Erhitzen der Proben auf 95°C die Elongationsreaktion durch Inaktivierung der reversen Transkriptase beendet.

Die fertiggestellte cDNS wurde mit Aqua destillata auf ein Endvolumen von 150µl aufgefüllt und bei -80°C aufbewahrt bis sie als Matrize für die Synthese komplementärer DNS-Sequenzen im Rahmen der Echtzeit-PCR benötigt wurde.

2.4 Quantitative Echt-Zeit-PCR

2.4.1 Prinzip

Ein Zyklus der Echt-Zeit-PCR besteht aus drei Schritten [31], die sich – heutzutage leicht modifiziert – folgendermaßen darstellen (Tab.2):

Abfolge der Einzelschritte eines Zyklus der PCR	
1.	Denaturierung: bei einer Temperatur von 95°C spaltet sich der DNS-Doppelstrang in einzelsträngige Ziel-DNS (template) auf.
2.	Hybridisierung: nach dem Herabsetzen der Temperatur auf die Bindungstemperatur der Primer (abhängig von der Primergröße), lagern sich diese an den komplementären Ziel-DNS-Strang an (Annealing).
3.	Elongation: bei ihrem Temperaturoptimum von 72°C baut die Taq-Polymerase weitere Nukleotide (dNTP) komplementär zur Ziel-DNS an die Primer in Richtung 3'-Ende an.

Tab. 2: Die drei Einzelschritte eines Zyklus der Polymerase-Ketten-Reaktion

Der schließlich neu entstandene Doppelstrang kann in einem weiteren Zyklus wieder als Matrize dienen. Theoretisch verdoppelte sich – innerhalb der Linearphase (Abb. 4) - auf diese Weise mit jedem Zyklus der spezifische DNS-Abschnitt. Praktisch wurde jedoch nur eine Effizienz von 70-80% erreicht, was daran lag, dass besonders an Anfang und Ende der Reaktion die Bedingungen nicht optimal waren [30]. Die typische PCR-Reaktion zeigte einen charakteristischen 3-phasischen Kurvenverlauf:

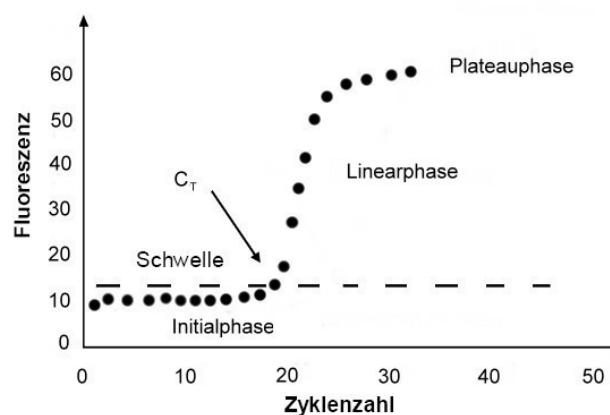


Abb. 4: typischer Kurvenverlauf einer Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)

Der 3-phasische Kurvenverlauf (Abb. 4) erklärt sich wie folgt:

In der Initialphase, also während der ersten Zyklen, zeigt sich ein flacher Kurvenverlauf, der durch die geringe Ziel-DNS-Menge bedingt ist, die von den Hintergrundsignalen noch übertroffen wird. Daran schließt sich der lineare Bereich an, in dem alle Parameter optimiert sind. Zu Beginn dieser Phase heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenzsignale des PCR-Produktes signifikant von dem Hintergrund ab. Die Zyklenzahl bei der diese Schwelle überschritten wird, wird vom Rechner als C_T -Wert (Cycle threshold) - auch Crossing Point (C_P) genannt - definiert. Anhand der C_T -Werte lassen sich vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an Ziel-DNS treffen. Zum Schluss flacht die Kurve, wegen der veränderten Reaktionskinetik, zu einem Plateau ab [32]. Ursachen dafür können z.B. Hitzeinaktivierung der Polymerasen, Inhibierung der Enzymaktivität durch den Anstieg der Pyrophosphatkonzentration oder die kompetitive Verdrängung der Primer durch neugebildete DNS-Stränge sein [33]. Mathematisch lässt sich die Amplifikationsmenge (P) mit Hilfe folgender Formel berechnen [34,35,36]:

$$P_n = A \times (1 + E)^n$$

- P_n hergestellte Amplifikatmenge nach n Zyklen
- A Startkopienzahl am Anfang der PCR
- n Zyklenanzahl
- E Effizienz (von 0 [=keine Amplifikation] bis 1 [= Verdoppelung])

Die tatsächliche Effizienz der Echt-Zeit-PCR lässt sich anhand der Steigung (st) einer Standardgeraden ermitteln, bei der die Verdünnungsreihe gegen die Zyklenzahl halblogarithmisch aufgetragen wurde (Abb.5).

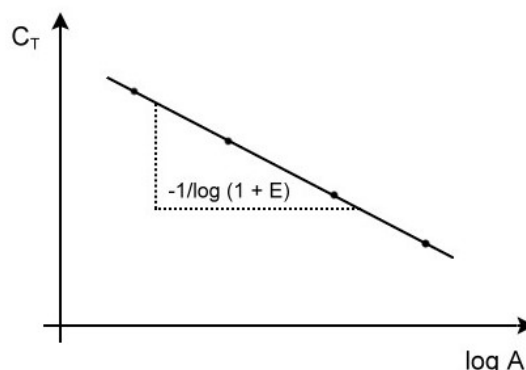


Abb.5: Graphische Darstellung der Schwellenwerte (C_T) gegen die Anzahl der Startkopien (A) zu Beginn der PCR in halblogarithmischer Form.

Für die Steigung ergibt sich daraus die Formel:

$$st = -1/(\log 1 + E)$$

Nach Rasmussen [37] kann die Effizienz folgendermaßen bestimmt werden:

$$E = 10^{\frac{-1}{st}}$$

Bei der ursprünglichen, sogenannten Endpunktbestimmung war im Bezug auf die quantitative Analyse ein großes Problem, dass die Ergebnisse oft erst in der Plateauphase registriert wurden, in der keine Amplifikation mehr stattfand.

Da eben diese Quantifizierung in vielen Fällen nötig war, entwickelte sich aus der Endpunktmessung die quantitative Echt-Zeit-PCR (quantitative real-time-PCR). Bei dieser, erstmals Anfang der 1990er Jahre vorgestellten Methode wird schon während der Amplifikation eine Detektion der PCR-Produkte durch Fluoreszenzsignale ermöglicht. Mit jedem Reaktionszyklus nehmen die fluoreszierenden PCR-Produkte und damit auch die Intensität der lichtinduzierten Fluoreszenz-Emission zu. Wegen der Proportionalität des Fluoreszenzsignals zu der Anzahl neusynthetisierter PCR-Produkten kann eine direkte Konzentrationsbestimmung der Ausgangs-DNS (Proben) stattfinden [30]. Somit ist auch eine abschließende gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate, wie bei der Endpunktbestimmung nicht mehr nötig. Als fluoreszierendes Medium kommt unter anderem der in dieser Studie verwendete Cyaninfarbstoff SybrGreen (im LightCycler) wie auch die ebenfalls verwendeten fluorogene Sonden (im Taqman) zum Einsatz (Roche 2004, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland).

2.4.2 Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) mittels Light – Cyclers Technologie

2.4.2.1 Allgemeines

Basierend auf der oben beschriebenen Echt-Zeit-PCR liegt die Besonderheit bei dem verwendeten Light-Cyclers (Roche, Mannheim, Deutschland) in der Verwendung des fluoreszierenden Farbstoffes SybrGreen I (Qiagen, Hilden, Deutschland), der weitgehend unspezifisch an den DNS-Doppelstrang bindet (Abb. 6). Als ungebundener Farbstoff wird er von dem Fluorimeter des LightCyclers lediglich als schwaches Signal detektiert. Ist er jedoch in der „kleinen Furche“ der dsDNS eingelagert, verstärkt sich die Fluoreszenz um etwa das 1000fache [38,39]. Dadurch steigt mit der Zunahme des Amplifikationsproduktes direkt proportional die gemessene Fluoreszenzstärke, die einmal pro PCR-Zyklus gemessen und aufgezeichnet wird.

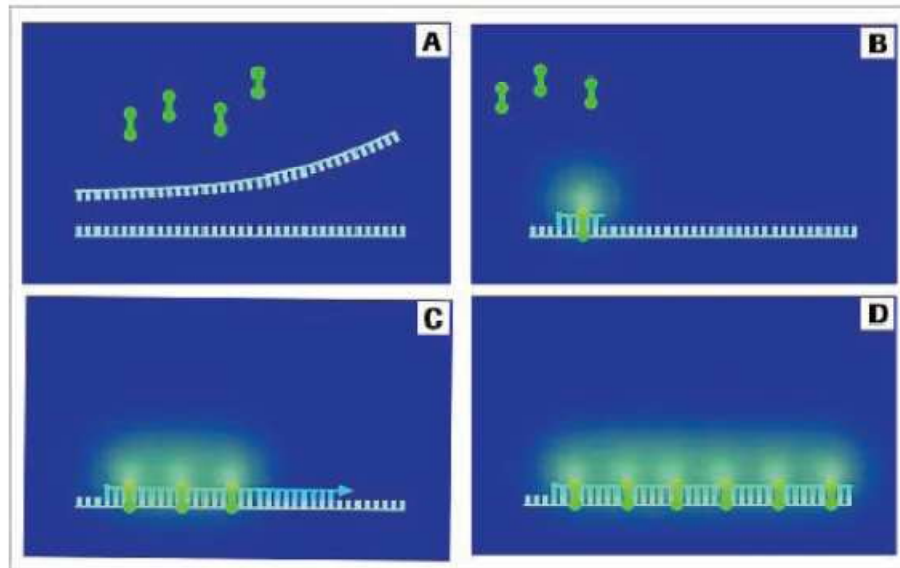


Abb. 6: Wirkweise des SYBR Green I Farbstoffes. Solange die DNS einzelsträngig vorliegt (A), kann SYBR Green I (grün) nicht binden. Erst in der Hybridisierungsphase (B), wenn also ein Primer hybridisiert, beginnt die Einlagerung des SYBR Green I an diesem kurzen doppelsträngigen Abschnitt. In der Elongationsphase (C, D) können sich immer mehr Farbstoffe einlagern. Die Fluoreszenz-Emission steigt dementsprechend (aus Roche Diagnostics 2004 [40]).

Eine spezifische Bindung des SybrGreen-Farbstoffes an die zu amplifizierende Ziel-DNS kann jedoch nicht sichergestellt werden. Vielmehr kann der Farbstoff auch an Artefakte oder Primer-Dimere binden und damit ebenfalls das Fluoreszenzsignal erhöhen [39]. Um spezifische Störfaktoren, verschiedene PCR-Effizienzen oder unterschiedliche reverse Transkriptionen, die die Ergebnisse deutlich beeinflussen können, zu minimieren, ist die Normalisierung der Ergebnisse notwendig. Dabei wird in derselben Untersuchung die Expression des Ziel-Gens und des Referenzgens parallel erfasst. Die ermittelten Werte für das Ziel-Gen werden dann in Relation zu der internen Kontrolle angegeben. Als

Referenzgene dienen vorzugsweise „Housekeeping-Gene“. Diese kodieren für Proteine, welche für die Erhaltung der Zellfunktion lebensnotwendig sind [41].

Um die Spezifität des Amplifikationsproduktes zu überprüfen, wurde am Ende der Echt-Zeit-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Unspezifische Produkte, wie z.B. Primer-Dimere, können durch ihren niedrigeren Schmelzpunkt so von dem Hauptprodukt diskriminiert werden (Abb. 7).

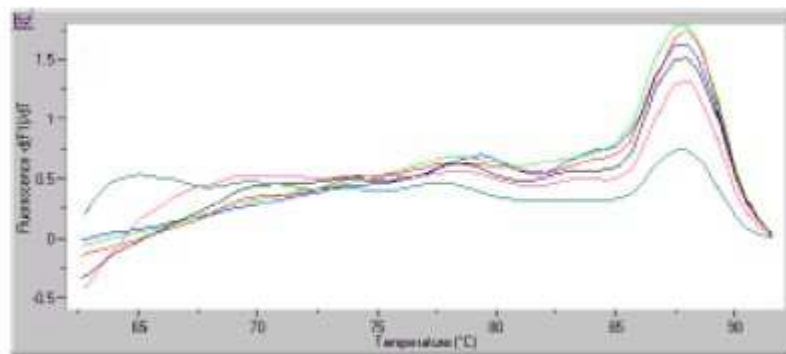


Abb. 7: Schmelzkurve, die keine Nebenprodukte zeigt.

2.4.2.2 Primer – Design

Prinzipiell wurden immer Assays on demand verwendet. Da es zum Zeitpunkt der Experimente für eNOS noch keine Assays on demand gab, wurde mit Hilfe der Gen-Datenbank des National Center of Biotechnology Information (NCBI) im Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) die benötigten Oligonukleotidprimersequenzen ermittelt. Mit Hilfe des Blast Programmes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) konnten die Intron-Exon-Grenzen bestimmt und die Primer im Anschluss durch das Primer3 Programm (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) generiert werden (Tab. 3).

Zielgen	Primerpaar	Sequenz
eNOS	Primer-sense	5'- TGA CCC TCA CCG ATA CAA CA -3'
	Primer-anti-sense	5'- CTG GCC TTC TGC TCA TTT TC -3'
β-Aktin	Primer-sense	5'- CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG -3'
	Primer-anti-sense	5'- GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA -3'

Tab.3: Für die LightCycler-PCR verwendete Primer

Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer idealerweise zwischen 20 und 30 Basenpaaren (bp) lang waren. Von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)

wurden sie in lyophilisierter Form geliefert. Um cDNA verlässlich von genomischer DNA unterscheiden zu können, wurden Intron-überspannende Primer eingesetzt. Die Primerpaare wurden entsprechend der Angaben des Herstellers in sterilem Aqua destillata gelöst und in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt (10µl sense-Primer + 10µl anti-sense-Primer + 80µl Aqua dest.). In verschiedenen Vorversuchen wurde bei unterschiedlichen PCR-Bedingungen die optimale Hybridisierungs-Temperatur (T_a) der Primer getestet. Dabei lieferte folgende Formel annäherungsweise die gesuchte Temperatur [42]:

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C} = 2^\circ\text{C} \times (A + T) + 4^\circ\text{C} \times (G + C) - 5^\circ\text{C}$$

T_m = Schmelzpunkt, A = Adenosin, T = Thyrosin, G = Guanidin, C = Cytosin

2.4.2.3 Durchführung

Verwendet wurde der QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dieser enthielt eine HotStarTaq DNS-Polymerase, den QuantiTect SYBR Green PCR Puffer (inkl. MgCl_2), einen Nukleotidtriphosphat-Mix (inkl. dUTP) sowie die Farbstoffe SYBR Green I und 6-Carboxy-X-rhodamin; kurz: ROX. Letzterer stellt einen passiven internen Referenzfarbstoff dar, durch den systeminterne Konzentrationsschwankungen ausgeglichen werden konnten. Die HotStarTaq DNS-Polymerase ist eine modifizierte DNS-Polymerase, die erst durch eine 15minütige Inkubation bei 95°C aktiviert wird. Dadurch wurde die Bildung von Primer-Dimeren unterbunden. Als Referenzgen (Housekeeper) wurde das ubiquitär vorkommende β -Aktin gewählt. Dieses Gen dient der Zelle zur Aufrechterhaltung verschiedener Grundfunktionen [41] und ist ein Hauptbestandteil der Mikrofilamente, die in der Zelle vor allem für die Gerüststruktur benötigt werden. Darüber hinaus wird es in den meisten humanen Zellen konstant exprimiert [43], wodurch es – zumindest theoretisch – in allen Proben dieselbe Quantität aufweisen sollte. Vor dem Gebrauch wurden alle Reagenzien aufgetaut, gevortext und kurz abzentrifugiert. Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Jeweils 5µl cDNS wurden in Glaskapillaren vorgelegt und mit 15µl Primer – SybrGreen-Mix aufgefüllt. Der SybrGreen-Mix setzte sich aus 4µl Aqua destillata, 10µl SybrGreen Mix (QuantiTect SYBR Green PCR Kit) und 1µl Primer-Mix (für Zielgen spezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer) zusammen. Die Kapillaren wurden verschlossen, kurz abzentrifugiert (30 Sekunden bei 3000 U/min) und in das Probenkarussell eingesetzt. Nachdem der LightCycler mit diesem bestückt war, wurde das Programm (LC Software 3.5, Roche, Mannheim, Deutschland) gestartet. Für die gewählten Primer wurde folgendes Temperaturprofil gefahren (Tab. 4):

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95°C	15min
Amplifizierung		
1. Denaturierung	95°C	15s
2. Hybridisierung	56°C	20s
3. Elongation	72°C	25s
<hr/>		
Anzahl der Zyklen : 40		

Tab. 4: Temperaturprofil für quantitative Echtzeit-PCR (LightCycler)

2.4.2.4 Auswertung (rel. Quantifizierung)

Um die Expression eines Gens in verschiedenen Proben messen zu können, wurde die Strategie der relativen Quantifizierung gewählt. Dabei wird nicht ein absoluter Wert bestimmt, sondern die Genexpression in Bezug zu einem zweiten Gen, dem sogenannten Referenzgen (β -Aktin), auch Housekeeper genannt. Sowohl für das Zielgen als auch für das Referenzgen wurde jedem LightCycler-Lauf eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:5, 1:10, 1:100) beigefügt, aus der sich später die Standardgerade erstellen ließ. Von den unbekannt Proben waren nur die Zyklenzahlen des C_T -Wertes bekannt. Diese wurden ebenfalls in die Standardkurve integriert, wodurch die zugehörigen relativen Verdünnungswerte (calculated values) ermittelt werden konnten. Um cDNS-Schwankungen im Reaktionsansatz auszugleichen, wurde der Expressionswert von β -Aktin des Mittelwerts der Kontrollgruppe als Kalibrator auf den Wert „1“ gesetzt. Alle anderen Proben wurden auf diesen Wert rechnerisch normalisiert, indem sie mit dem entsprechenden Korrekturfaktor multipliziert wurden. Anschließend wurden die korrigierten Werte ins Verhältnis zur Kontrollgruppe gesetzt und somit das relative Expressionsniveau bestimmt. Die rechnerische Auswertung fand analog der in Abschnitt 2.4.1. beschriebenen Methode statt.

2.4.3 Genexpressionsanalyse mittels Taqman – Technologie

2.4.3.1 Allgemeines

Zur Detektion der Sequenz-spezifischen Amplifikation wurde erstmals 1991 von Holland et al. ein Verfahren beschrieben, das die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase ausnützt [44]. In der Weiterentwicklung dieses Verfahrens setzten Lee et al. 1993 fluorogene Sonden ein, die eine Echt-Zeit-Detektion ermöglichten [45]. Dabei lagert sich die sequenz-spezifische Oligonukleotidsonde zwischen den Bindungsstellen der Primer an die Ziel-DNS an. Während das 5'-Ende der Sonde mit einem Reporterfarbstoff (6-Carboxy-Fluorescein, FAM) versehen ist, befindet sich am 3'-Ende ein Quencherfarbstoff (6-Carboxy-tetramethylrhodamin, TAMRA) und zusätzlich ein Phosphatrest, der das 3'-Ende blockiert [46].

Am Ende jeder Hybridisierungs-Phase wird der Reporterfarbstoff FAM durch blaues Licht (488nm) der LED angeregt. Seine Fluoreszenz wird jedoch bei intakter Sonde aufgrund der unmittelbaren räumlichen Nähe des zweiten Farbstoffes (Quencherfarbstoff) durch den Fluoreszenz Resonanz Emissions Transfer (FRET) [47,48] unterdrückt. Stattdessen wird der Quencherfarbstoff TAMRA durch die abstrahlende Energie angeregt und emittiert daraufhin Licht der Wellenlänge 582nm (Abb. 8).

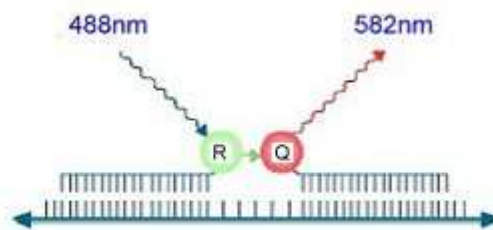


Abb. 8: Prinzip der fluorogenen Sonden beim Taqman. Am Ende jeder Hybridisierungsphase wird der Reporterfarbstoff FAM (R) angeregt. Durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen wird die Energie auf den Quencherfarbstoff TAMRA (Q) übertragen, der daraufhin die ihm typische Wellenlänge 582nm emittiert (aus Stryer [49]).

Während der Neustrangsynthese trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde und verdrängt diese, wodurch eine Y-förmige Sekundärstruktur entsteht. Dadurch wird die 5'-3' – Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert. Die Sonde wird in kleine Fragmente zerschnitten und damit die räumliche Nähe zwischen Quencher und Reporter aufgehoben. Der FRET ist dadurch ebenfalls aufgehoben, d.h. die Fluoreszenz von FAM wird nicht mehr unterdrückt, sondern der Reporter gibt sein eigenes Fluoreszenzsignal ab [44,50,51] (Abb.9).

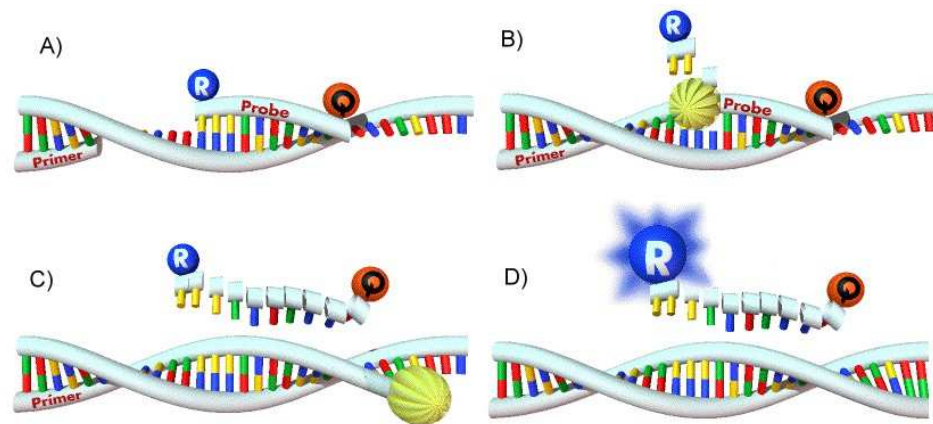


Abb. 9: Wirkprinzip der fluorogenen Sonde im Taqman. (entnommen von Applied Biosystems)

- A) Sequenzspezifische Anlagerung von Sonde und Primer
- B) Beginn der Sondenhydrolyse
- C) Komplette Hydrolyse der Sonde und damit verbundene räumliche Trennung der Farbstoffe (R+Q)
- D) Das Reporter-Signal wird nicht mehr unterbunden und kann detektiert werden

Nach jedem PCR-Zyklus detektiert die CCD Kamera des ABI PRISIM 7900HT Sequence Detection Systems (Applied Biosystem, Weiterstadt, Deutschland) die Zunahme der Reporterfluoreszenz.

2.4.3.2 Primer-/Sonden - Design

Bei den verwendeten Primern handelte es sich um vorgefertigte Assays, sog. Assays on demand der Firma Applied Biosystems bei denen eine Effizienz von 2 garantiert wurde (Tab. 5). Folgende Kriterien für das optimale Primerdesign wurden dabei eingehalten:

Zielgen	Primernummer
ET ₁	Rn 00561129_m1
ET _A	Rn 00561137_m1
ET _B	Rn 00561139_m1
18sRNS	4352656-0507004

Tab. 5: Verwendete Primer und Taqman-Sonden

Der optimierte Primer hatte eine Länge von 15 – 20 Basen, einen Anteil von 20-70% an Guanin und Cytosin und einen Schmelzpunkt (T_M -Wert) zwischen 58 und 60°C. Die Sonde dagegen hatte eine Länge von 24 – 30 Basen, einen Anteil von 40-60% an Guanin und Cytosin und einen T_M -Wert von 5-10°C über dem der Primer. Desweiteren wurde darauf

geachtet, dass die Sonde mit den Primern nicht überlappt oder komplementär zu ihnen war. Die Base Guanin durfte nicht das 5'-Ende der Sonde darstellen, da dies zur Folge gehabt hätte, dass die Reporterfarbstoff-Fluoreszenz nach der Abspaltung immer noch unterdrückt würde. Auch das mehr als 3-malige Verwenden derselben Base musste vermieden werden. Schließlich war noch darauf zu achten, dass Primer und Sonden über Exon-Grenzen hinwegreichten, um eine Amplifikation eventuell vorhandener genomischer DNS zu verhindern [30]. Als fluoreszierender Reporterfarbstoff wurde FAM eingesetzt, das kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft wurde. Demgegenüber wurde der Quencher-Farbstoff TAMRA an das 3'-Ende gebunden (Abb. 10). Um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu verhindern, wurde die Sonde dort noch abschließend phosphoryliert.

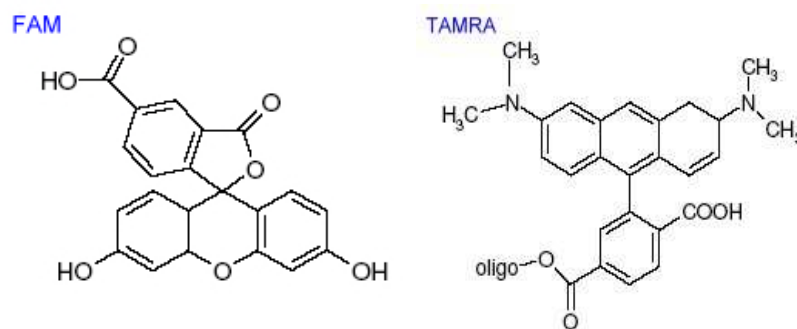


Abb. 10: Die Sonden tragen den Reporterfarbstoff FAM am 5'-Ende. Er absorbiert Licht der Wellenlänge 488nm und emittiert bei 518nm. Am 3'-Ende der Sonde befindet sich TAMRA, ein Quencherfarbstoff, mit einem Absorptionsmaximum von 555nm und einer Emmision von 582nm. Bei räumlicher Nähe zu einem Reporter nimmt er dessen Energie auf (es kommt zum FRET) und emittiert sie bei höherer Wellenlänge.

2.4.3.3 Durchführung

Der verwendete QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Deutschland) bestand aus der HotStarTaq DNS-Polymerase, dem QuantiTect Probe PCR Puffer (inkl. $MgCl_2$), einem Nukleotidtriphosphat-Mix und einem passiven Referenzfarbstoff (ROX). Die HotStarTaq DNS-Polymerase ist eine modifizierte DNS-Polymerase, die erst durch eine 10-minütige Inkubation bei 95°C aktiviert wurde. Dadurch wurde die Bildung von Primer-Dimeren unterbunden. Der Referenzfarbstoff ROX diente dem systeminternen Ausgleich von Konzentrationsschwankungen der Reporterfluoreszenz. Als endogene Kontrolle wurde 18sRNS verwendet, die eine konstante Expression gewährleistete [52]. Für jeden Taqman-Lauf wurde eine 386-well Mikrotiterplatte (MicroAmp Optical 386 well reaction plate, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) verwendet, in der sowohl für das entsprechende Zielgen (ET-1, ET-A, ET-B) als auch für den internen, endogenen Standard (18sRNS) Doppelbestimmungen angesetzt wurden. Die verwendeten Substanzen wurden jeweils erst kurz vor dem Gebrauch aufgetaut und zusammengemischt. Insgesamt ergab sich ein

Reaktionsvolumen von 20µl. Dabei wurden zunächst 9µl cDNS der jeweiligen Zielgene bzw. der endogenen Kontrolle vorgelegt und 30 Sekunden bei 3000 U/min abzentrifugiert, bevor 1µl vom Primer-Mix (Assay-on-Demand Gene Expression Assay Mix, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und 10µl QuantiTect Probe PCR Master Mix zugefügt wurden. Der komplette Ansatz wurde nochmals abzentrifugiert (3000 U/min, 60s) und mit einer optischen Deckfolie (ABI PRISIM® Optical Adhesive Cover, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) verschlossen. Schließlich wurde der TaqMan-Lauf in folgenden Arbeitsschritten von dem Programm GeneAmp SDS Software, Version 2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt (Tab.6):

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit
Initiale Aktivierung von HotStarTaq DNS-Polymerase	95°C	10min
Amplifizierung		
1. Denaturierung	95°C	15s
2. Hybridisierung/Elongation	60°C	1min
<hr/>		
Anzahl der Zyklen : 40		

Tab. 6: Temperaturprofil für quantitative Echtzeit-PCR (TaqMan)

2.4.3.4 Auswertung

Die Rohdaten wurden durch das Analyse-Programm GeneAmp SDS Software, Version 2.1 ausgewertet. Dazu wurden sie zunächst gegen den passiven Referenzfarbstoff ROX abgeglichen. Aus den abgeglichenen Reportersignalen und den zugehörigen Zyklenzahlen ließ sich für jede Probe eine Amplifikationskurve ermitteln. Manuell wurde ein Schwellenwert festgelegt, bei dem sich alle Amplifikationskurven in dem linearen Abschnitt der exponentiellen Phase der PCR befanden. Diese exponentielle Phase erlaubte quantitative Rückschlüsse auf die eingesetzte cDNS, weil hier die Fluoreszenzemission direkt proportional zur gebildeten Amplifikationsmenge war. Aus dem Schwellenwert konnte das Programm für jede Probe den C_T -Wert für die jeweilige Ziel-cDNS (ET1, ET-A, ET-B) bzw. für das Referenzgen (18sRNS) berechnen. Durch die Subtraktion der C_T -Werte von Ziel-cDNS und 18sRNS ($C_{T \text{ Ziel}} - C_{T \text{ 18sRNS}}$) ergab sich für jede Probe der ΔC_T -Wert, der den normalisierten Expressionswert darstellte, den das Gen in der Lunge hatte. Er ermöglichte

auch erstmals einen relativ-quantitativen Vergleich der Zielgen-Expressionsstärke der Proben untereinander [30].

Um schließlich auch Tiere aus verschiedenen Versuchsgruppen zu vergleichen und um damit die Auswirkungen der unterschiedlichen Behandlungsmethoden (Bleomycin vs. Bleomycin und Bosentan) zu verdeutlichen, wurde der $\Delta\Delta C_T$ -Wert erhoben. Dieser ergab sich aus der Differenz des normalisierten ΔC_T -Wertes eines behandelten Tieres und dem ΔC_T -Wert eines Kontrolltieres, der auch als Kalibrator bezeichnet wird [30].

Da Applied Biosystems für den Assay on demand eine Effizienz von 2 gewährleistete, konnte der relative Quantifizierungswert einer Probe, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf einen Kalibrator, mathematisch mit der arithmetischen Formel

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

errechnet werden [53].

2.5 Plasmauntersuchung mittels Endothelin-1 ELISA

2.5.1 Allgemeines

Heutzutage sind zahlreiche Varianten des „Enzyme linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) im Gebrauch. In dieser Arbeit wurde auf einen Sandwich-ELISA zurückgegriffen, dessen Mikrotiterplatte schon mit immobilisierten polyklonalen Antikörpern gegen ET-1 beschichtet war. Der Ablauf des ELISA-Verfahrens gliederte sich in drei Phasen.

In der ersten Phase wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit dem Antigen ET-1, in Form des Standards bzw. der Proben, befüllt. Nach der Inkubation wurde durch mehrmaliges Waschen das nicht gebundene ET-1 entfernt, so dass in den Vertiefungen ausschließlich Antigen-Antikörper-Komplexe verblieben. In der zweiten Phase wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase markierter sekundärer polyklonaler Antikörper gegen ET-1 dazugegeben, der ebenfalls an das gebundene Antigen, das durch den primären Antikörper an der Platte fixiert war, binden sollte. Wiederum wurde inkubiert und anschließend mehrmals gewaschen, um den nicht-gebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. In der dritten Phase wurde dem Ansatz noch eine Substrat-Lösung zugesetzt, die vor allem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Tetramethylbenzidin (TMB) enthielt. In der anschließenden Inkubationszeit setzte die am sekundären AK fixierte Meerrettich-Peroxidase das H_2O_2 in Wasser (H_2O) um (Abb. 11). Dadurch wurde der Elektronendonator, das Tetramethylbenzidin, oxidiert und zeigte einen Farbumschlag von farblos nach blau. Mit Hilfe der Schwefelsäure wurde die Reaktion gestoppt und der, wegen der pH-Erniedrigung auftretende, erneute Farbumschlag nach gelb mittels Photometer bei 450nm detektiert.

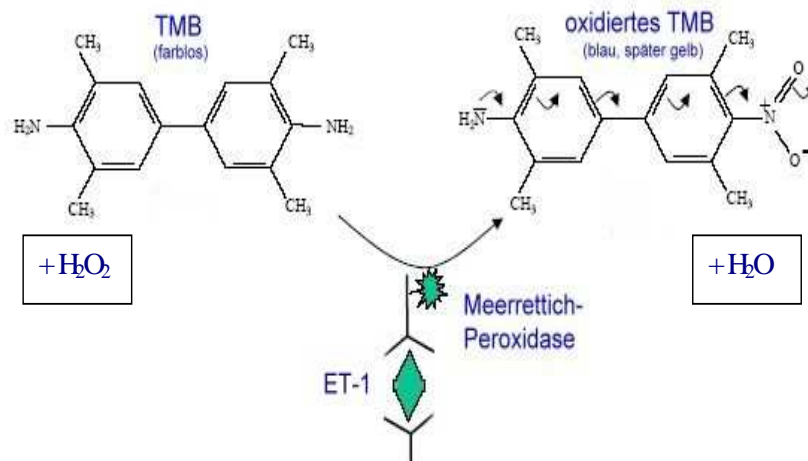


Abb. 11: Aufbau des ET-1 ELISAs; Oxidationsreaktion, die den Farbumschlag von farblos nach blau bedingt. Der abschließende Farbwechsel von blau nach gelb geschieht, wenn die Reaktion durch Schwefelsäure gestoppt wird.

2.5.2 Durchführung

Zur Bestimmung der Konzentration von ET-1 wurde der „human Endothelin-1 Enzyme Immunometric Assay Kit“ (Assay Designs, Ann Arbor, USA) verwendet. Alle Reagenzien wurden vor dem Versuch auf Zimmertemperatur gebracht. Standards und Proben wurden doppelt bestimmt.

Der mitgelieferte ET-1 Standard wurde zuerst mit 500µl Aqua destillata vermischt. Die resultierende Lösung enthielt ET-1 in einer Konzentration von 200 pg/ml. In acht nummerierten Eppendorf-Cups wurde daraus eine absteigende Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 und 0,78pg/ml, die für das Erstellen der Standardgeraden benötigt wurden.

Der eigentliche Versuch begann mit dem Waschen der Mikrotiterplatte, indem in jede Vertiefung 400µl Waschlösung gegeben wurde. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und die Waschlösung anschließend gründlich von der Platte entfernt. Leerwert, Standards und Proben bekamen jeweils eigene Vertiefungen zugeteilt. In die Leerwert-Vertiefung wurde 100µl Leerwert (Assay Buffer) pipettiert. Die acht verschiedenen konzentrierten Standardlösungen wurden in einem Volumen von ebenfalls 100µl in ihre jeweilige Vertiefung pipettiert und auch jeweils 100µl der zu untersuchenden Proben wurde in deren Vertiefungen pipettiert. Die anschließende Inkubation dauerte eine Stunde bei 37°C. Durch 7-maliges Waschen aller Vertiefungen mit jeweils 400µl Waschlösung wurde der Antigen-Überschuss entfernt. Nach Reinigen der Platte wurde der mit Meerrettich-Peroxidase markierte sekundäre Antikörper zu den Standards und Proben, nicht jedoch zum Leerwert, hinzugefügt und bei 37°C 30min inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz gevortext.

Während der Inkubation hat der sekundäre Antikörper ebenfalls an das Antigen ET-1 gebunden. Der Antikörper-Überschuss wurde durch 9-maliges Waschen entfernt. Nach Entfernen der Waschlösung, wurde in jede Vertiefung 100µl der vorbereiteten Substratlösung pipettiert. In einer Dunkelkammer setzte die Meerrettich-Peroxidase das Substrat in einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Zimmertemperatur um. Mit der jeweiligen Zugabe von 100µl 1-molariger Schwefelsäure wurden die Reaktionen gestoppt. Die nach dem Farbumschlag gelben Lösungen wurden am Photometer (ELISA Reader Emax, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) bei 450nm detektiert und um den Leerwert bereinigt. Bei Doppelbestimmungen wurden die optischen Dichten gemittelt.

2.5.3 Auswertung

Die OD der Proben wurde am ELISA-Reader vermessen. Genullt wurde gegen den Leerwert. Die gemittelte, um den Leerwert bereinigte OD der einzelnen Standardverdünnungen wurde mit Hilfe des Programms ELISA Reader gegen ihre jeweilige ET-1 Konzentration halblogarithmisch aufgetragen und zu einer Standardgeraden interpoliert. Nach Auftragen der optischen Proben-Dichten konnte nun mittels der Standardgeraden die Konzentration der Proben bestimmt werden. Die OD war dabei direkt proportional zur ET-1 Konzentration.

2.6 Statistische Auswertung

Die Erfassung der Daten und deren statistische Auswertung erfolgten mittels des Programms SPSS für Windows®, Version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Die Ergebnisse wurden angegeben als Mittelwerte ± 1 Standardabweichung. Als Signifikanzprüfung wurde der Mann-Whitney-Test bzw. der Posthoc Bonferronitest durchgeführt. Die graphische Darstellung der Laufdaten erfolgte mit MS Excel 2001 (Microsoft, Redmond, USA)

Das Ausmaß des Verhältnisses zweier Variablen wurde mittels Berechnung des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten r bestimmt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für Fehler erster Art (Niveau α) wurde nach internationaler Konvention auf 5% gesetzt. Dementsprechend wurde die Signifikanzschwelle als $p \leq 0,05$ definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Bosentan verbessert die Leistungsfähigkeit im Bleomycin-Modell

3.1.1 Leistungsfähigkeit im Verlauf

Die Leistung in der Bleomycingruppe fiel in den ersten beiden Tagen nach der Bleomycin-Applikation auf 70% der Ausgangsleistung im Vergleich zu der Kontrollgruppe. So ergab sich ab t1./2. nach Bleomycingabe eine Signifikanz ($p < 0,05$) der Bleomycingruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die Laufleistung der Bleomycingruppe stieg im weiteren Verlauf wieder an und lag für den gemittelten Wert t7./8. bei $p = 0,028$. Beginnend mit dem 9./10. Tag kam es in der Bleomycingruppe zu einem rapiden Leistungsabfall, sodass die Ratten am 13./14. Tag nur noch 26% der Ausgangsleistung im Vergleich zu der Kontrollgruppe erreichten (Bleomycingruppe vs. Kontrolle, $p = 0,001$).

Die Maximalleistung der Bleomycin+Bosentangruppe reduzierte sich hingegen kontinuierlich moderat. Bedingt durch den deutlichen Einbruch der Bleomycingruppe ergab sich an den Tagen t1./2. und t3./4. Signifikanzen ($p < 0,05$) gegenüber der Bleomycingruppe. Am 7./8. Tag lag die Leistungsfähigkeit bei 87% und zeigte keine Signifikanz zur Bleomycingruppe. Im Weiteren nahm die Leistungsfähigkeit der Bleomycin+Bosentangruppe bis zum 13./14. Tag auf 78% der Ausgangsleistung ab. Damit bestand zwar auch in der Bleomycin+Bosentangruppe eine signifikante ($p = 0,028$) Verschlechterung der Leistungsfähigkeit, jedoch gleichzeitig eine signifikante ($p = 0,039$) Differenz zu der Verschlechterung der Bleomycingruppe (Abb.12).

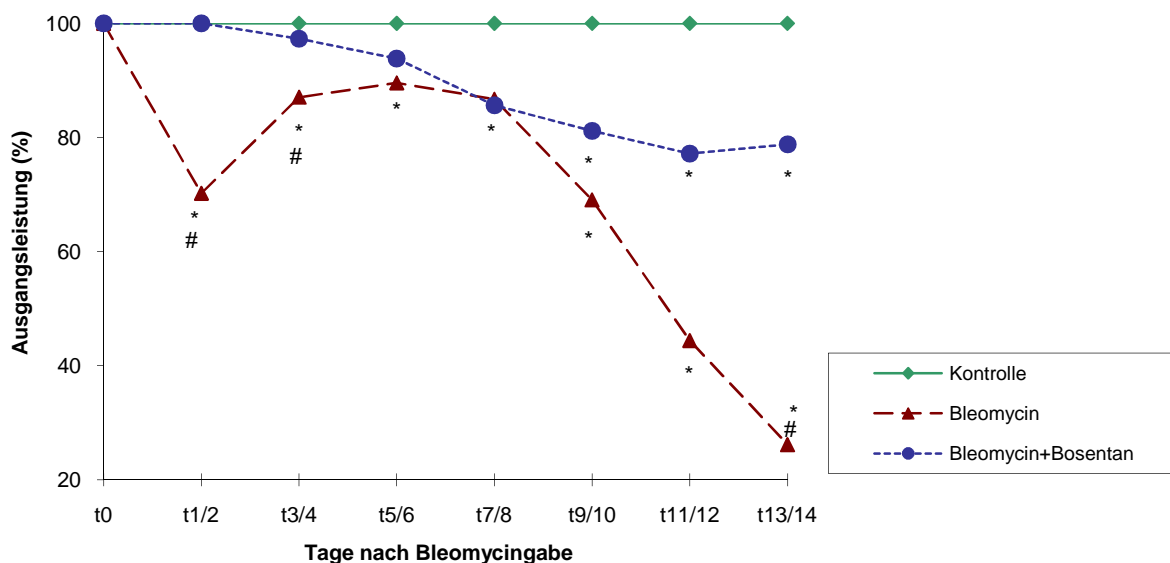


Abb. 12: Verlauf der Leistungsfähigkeit der drei Versuchsgruppen bei einer Geschwindigkeit von 25m/min und einem Winkel von 12° innerhalb der Tage 1-14.

Nach Reevaluierung an Tag 15 konnte die Bleomycingruppe an Tag 16 wieder 86% der Maximalleistung erbringen, fiel im weiteren Verlauf jedoch rasch auf 43% zurück (Abb.13). Damit ergaben sich für alle Messtage Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe (t24./25.: $p=0,009$).

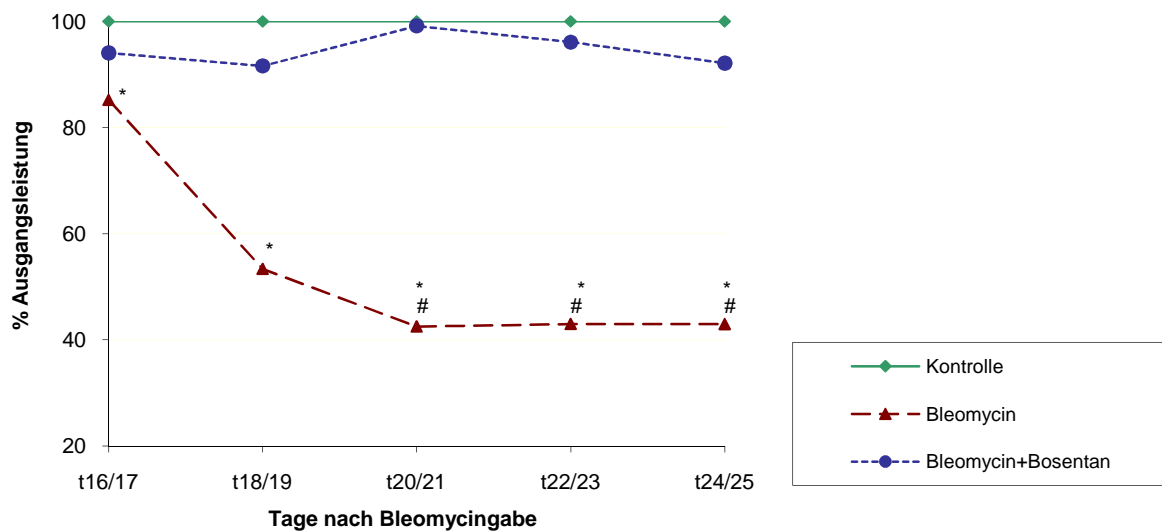


Abb. 13: Weiterer Verlauf der Leistungsfähigkeit der drei Versuchsgruppen bei einer reduzierten Geschwindigkeit von 20m/min und einem (weiter konstanten) Winkel von 12° innerhalb der Tage 16-25.

Die Leistung der Bleomycin+Bosentangruppe erreichte an Tag 16./17. 95% der Ausgangsleistung und blieb bis zum Ende des Versuchs am 25. Tag annähernd konstant bei zuletzt (t24/25) 92%. Damit zeigte sich eine Signifikanz zwischen der Laufleistung im Vergleich zur Bleomycingruppe, während zwischen der Kontrolle und der Bleomycin+Bosentangruppe keine signifikante ($p=0,232$) Verschlechterung der Leistungsfähigkeit mehr zu erkennen war.

3.1.2 Korrelationen zur Laufleistung

Um die Aussagekraft der Laufleistung zu untersuchen, wurde die Endlaufleistung jeder Ratte am Tag 24/25 mit ihren spezifischen Organveränderungen in Relation gebracht. Zugrunde liegt die Annahme, dass die verschlechterte Laufleistung durch die Schwere der Erkrankung bzw. das Ausmaß der pathologischen Veränderung bestimmt wird.

Dabei zeigte sich sowohl für das relative Lungengewicht ($p=0,024$) wie auch für die später bestimmte Hydroxyprolinkonzentration ($p=0,005$) eine signifikante Korrelation zu der Laufleistung (Abb.14,15). Zwischen dem RVSP und der Endlaufleistung zeigte sich ebenfalls eine Korrelation ($p=0,045$).

Ergebnisse

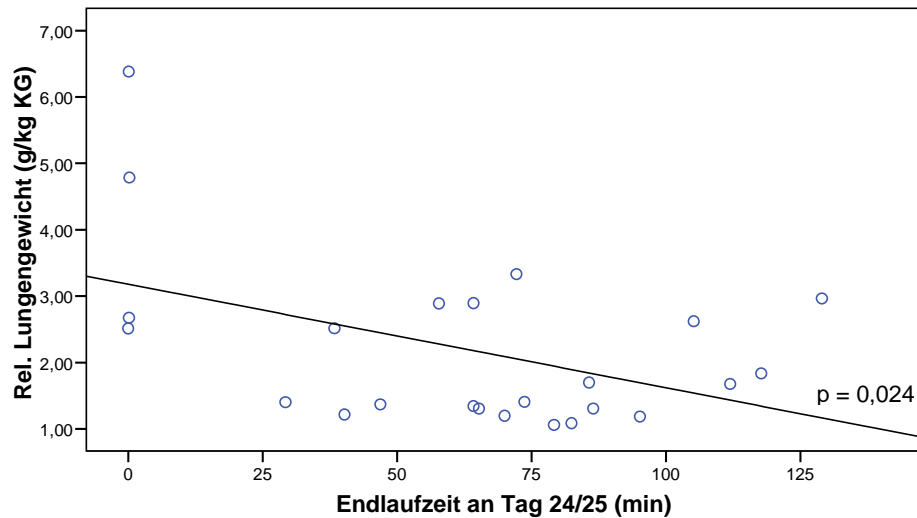


Abb. 14: Signifikante inverse Korrelation zwischen dem relativen Lungengewicht und der Laufleistung am Ende des Versuchs

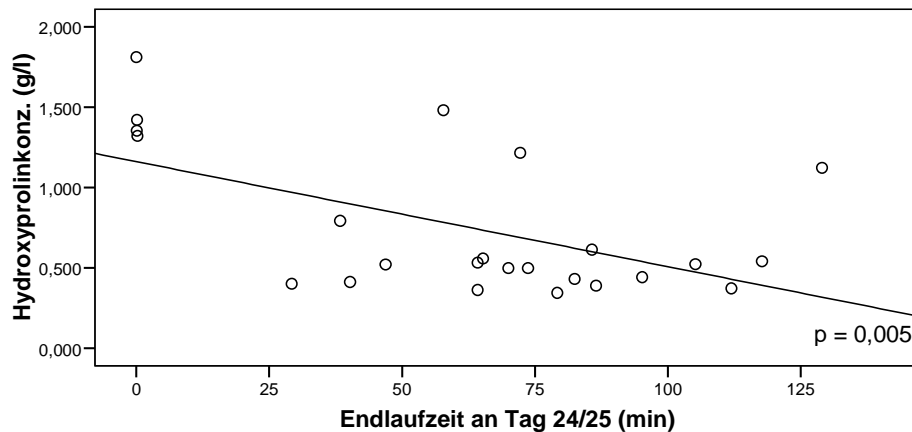


Abb. 15: Signifikante inverse Korrelation zwischen der Hydroxyprolinkonzentration der Lunge und der Laufleistung am Ende des Versuchs.

3.1.3 Veränderungen des Körpergewichts

Durch Bleomycingabe kam es zur signifikanten Reduktion des Endgewichts (Abb.16) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Durchschnittsgewicht Bleomycingruppe [299g] versus Durchschnittsgewicht Kontrollgruppe [403g]). Damit zeigte sich eine signifikante Differenz der relativen Gewichtszunahme (Abb.17) beider Gruppen ($p=0,002$). In der Bleomycin+Bosentangruppe zeigte sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Gewichtszunahme im Vergleich zur Bleomycingruppe ($p=0,003$). Zwischen der Bleomycin+Bosentangruppe und der Kontrollgruppe gab es dagegen keine signifikante Gewichtszunahme ($p=0,494$).

Ergebnisse

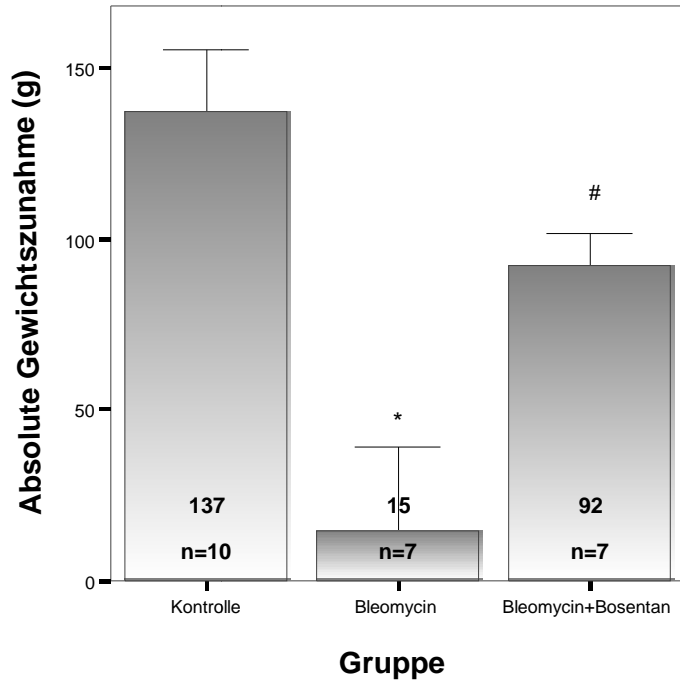


Abb. 16: Absolute Gewichtszunahme in den drei Versuchsgruppen im Vergleich zum Ausgangstag (t_0)

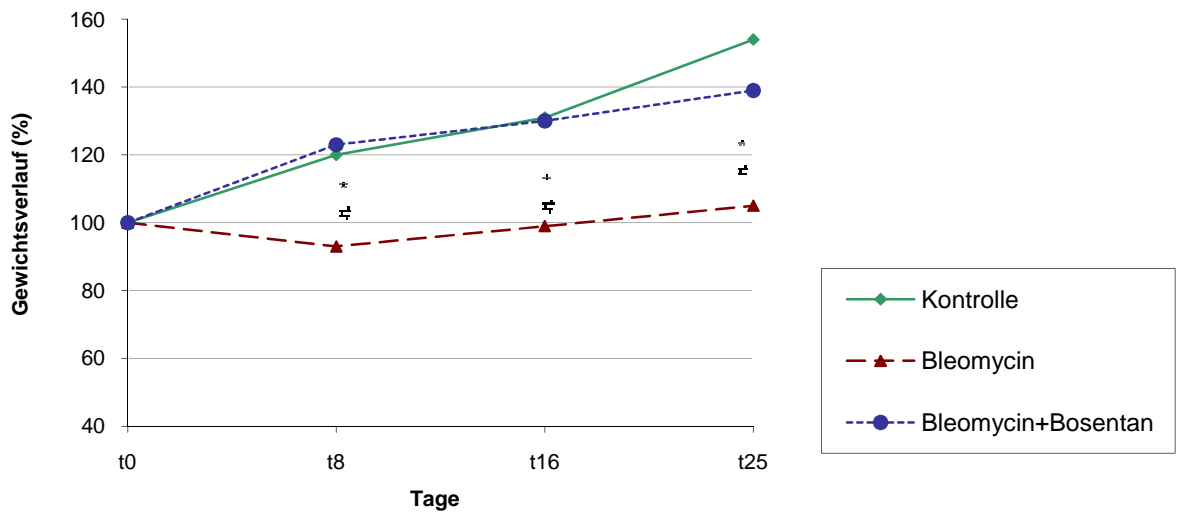


Abb. 17: Gewichtsverlauf in den drei Versuchsgruppen über den Zeitraum des Versuchs.

3.2 Verbesserung der Lungenfibrose

3.2.1 Relatives Lungengewicht

Wird das Lungengewicht auf das Körperendgewicht der Ratten bezogen, resultiert daraus das relative Lungengewicht (Abb. 18). Die Kontrolltiere hatten durchschnittlich ein Lungengewicht von 510mg. Die Bleomycintieren hatten im Vergleich dazu mit 1020mg ein doppelt so großes Lungengewicht ($p=0,001$ zur Kontrolle). Durch die Gabe von Bosentan bei mit Bleomycin behandelten Tieren war das durchschnittliche Lungengewicht mit 670mg im Vergleich zu der Bleomycingruppe signifikant niedriger ($p=0,013$).

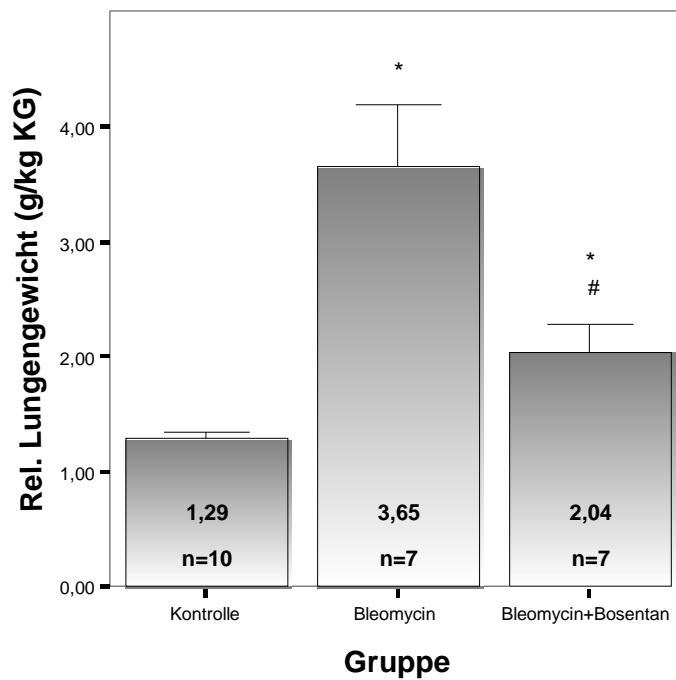


Abb. 18: relatives Lungengewicht im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen

3.2.2 Hydroxyprolinegehalt der Lunge

Eine signifikante Erhöhung des Hydroxyprolinegehalts (Abb. 19) zeigte sich in den Lungen der Bleomycintiere gegenüber denen der Kontrolle ($p=0,001$). Durch die Applikation von Bosentan kam es bei den mit Bleomycin behandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion des Hydroxyprolinegehaltes im Vergleich zu den ausschließlich mit Bleomycin behandelten Tieren (1,39 g/l vs. 0,58 g/l, $p=0,002$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe lag der Hydroxyprolinegehalt in der Bosentangruppe signifikant höher ($p=0,001$).

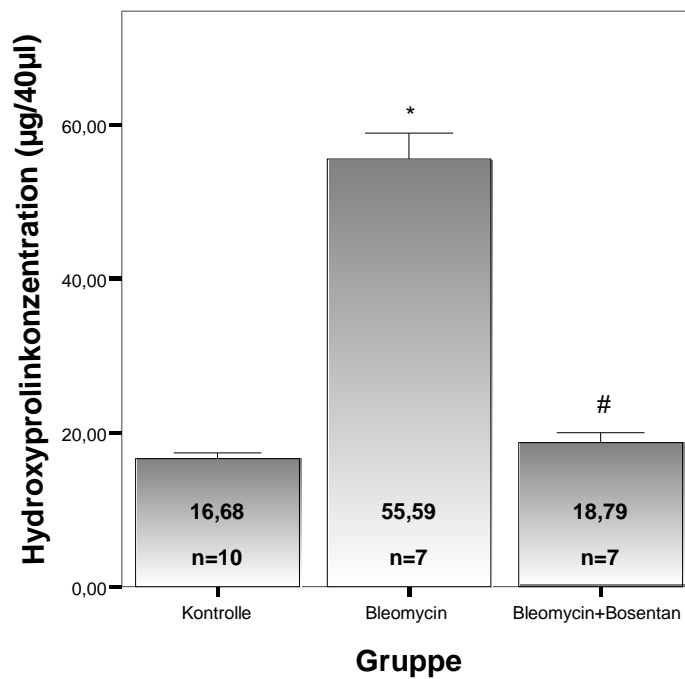


Abb. 19: Hydroxyprolinegehalt der Lungen der Versuchstiere

3.3 Pulmonalen Hypertonie

3.3.1 Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck (RVSP)

Der RVSP lag nach 25 Tagen sowohl in der Bleomycingruppe mit 65mmHg ($p=0,001$), als auch in der Bleomycin+Bosentan­gruppe mit 52mmHg ($p=0,001$) gegenüber der Kontrolle (23mmHg) signifikant erhöht (Abb. 20). Der direkte Vergleich zwischen Bleomycingruppe und Bosentan­gruppe brachte eine signifikante ($p=0,017$) Drucksenkung unter Bosentan.

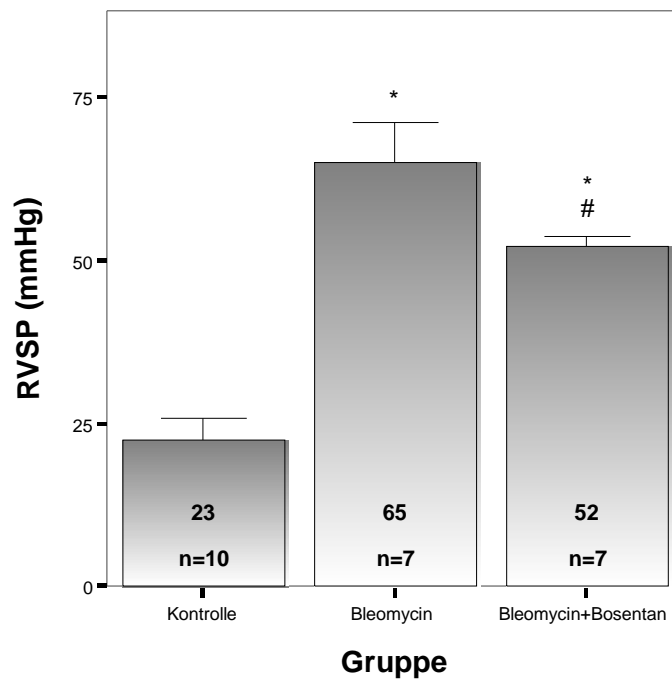


Abb. 20: Systolischer Blutdruck im rechten Ventrikel;

3.3.2 Relatives Herzgesamtgewicht

Das relative Herzgewicht, das auf das Körperendgewicht bezogen ist, zeigte sowohl in der Bleomycingruppe ($p=0,011$) wie auch in der Bosentan­gruppe ($p=0,019$) eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontroll­gruppe (Abb. 21). Zwischen Bleomycingruppe und Bosentan­gruppe ergab sich keine Signifikanz ($p=0,277$).

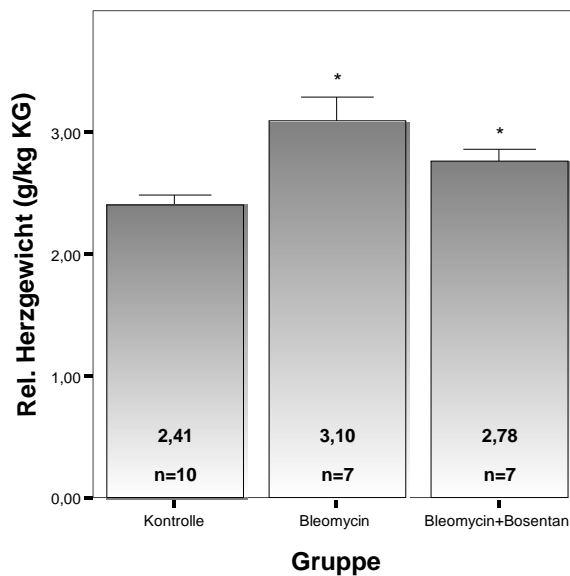


Abb. 21: Unterschiede im relativen Herzgewicht zwischen den drei Versuchsgruppen

3.3.3 Rechtsventrikuläre Hypertrophie

Die rechtsventrikuläre Hypertrophie (Abb.22) war bei den Bleomycintieren deutlich erhöht. Der $RV/(LV+S)$ – Quotient war mit 0,61 (Bleomycingruppe) und 0,32 (Bleomycin+Bosentan) jeweils signifikant ($p = 0,001$) höher als in der Kontrollgruppe. Jedoch konnte durch die zusätzliche Behandlung mit Bosentan eine signifikante ($p = 0,002$) Verminderung der rechtsventrikulären Hypertrophie erreicht werden.

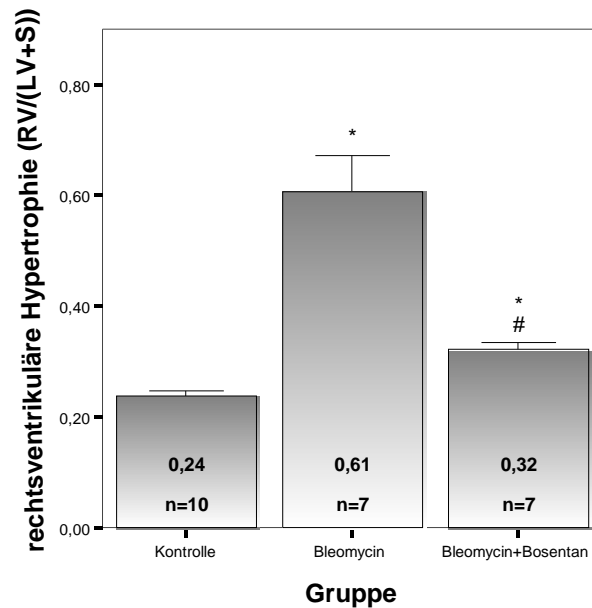


Abb. 22: Rechtsventrikulärer Anteil am Herzgesamtgewicht im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen.

Das relative linksventrikuläre Gewicht (rel. LV-Gewicht) blieb in allen drei Gruppen annähernd gleich und zeigte keine Signifikanzen (Abb. 23).

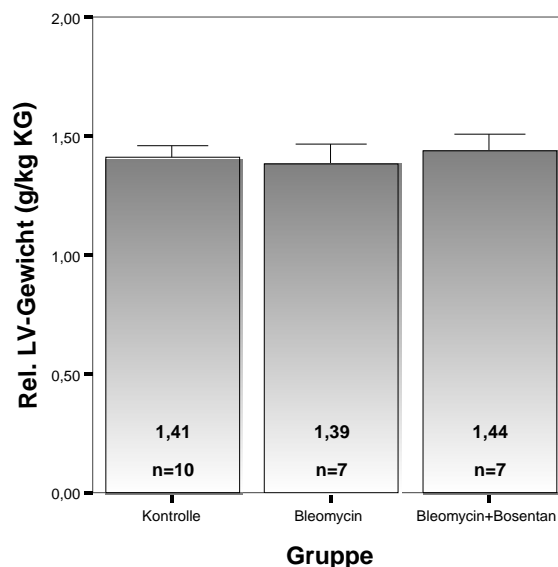


Abb. 23: Nicht signifikante Änderung im relativen linksventrikulären Gewicht zwischen den drei Versuchsgruppen.

3.3.4 Korrelationen des rechtsventrikulären Gewichtes

Der RV/(LV+S) – Quotient korreliert sowohl signifikant ($p=0,006$) mit dem RVSP (Abb. 24), wie auch invers mit der Laufbandleistung ($p=0,037$; Abb. 25)

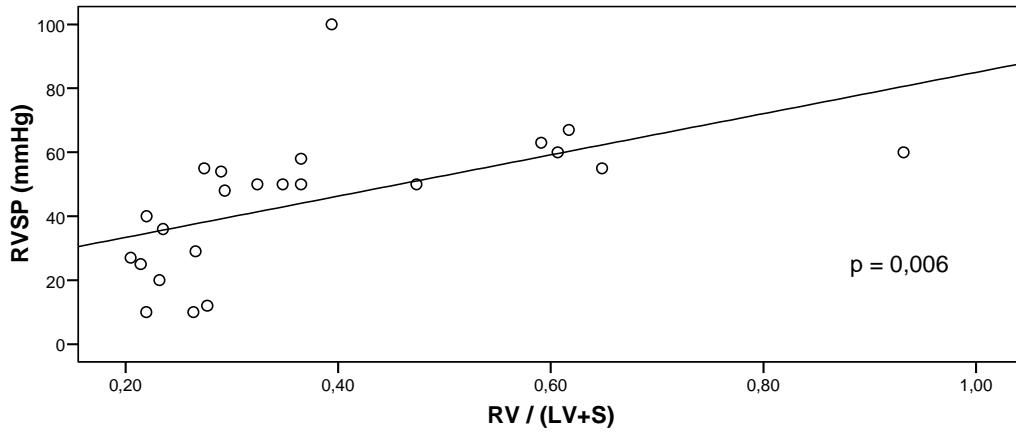


Abb. 24: Signifikante Korrelation zwischen dem RVSP und dem rechtsventrikulären Gewicht

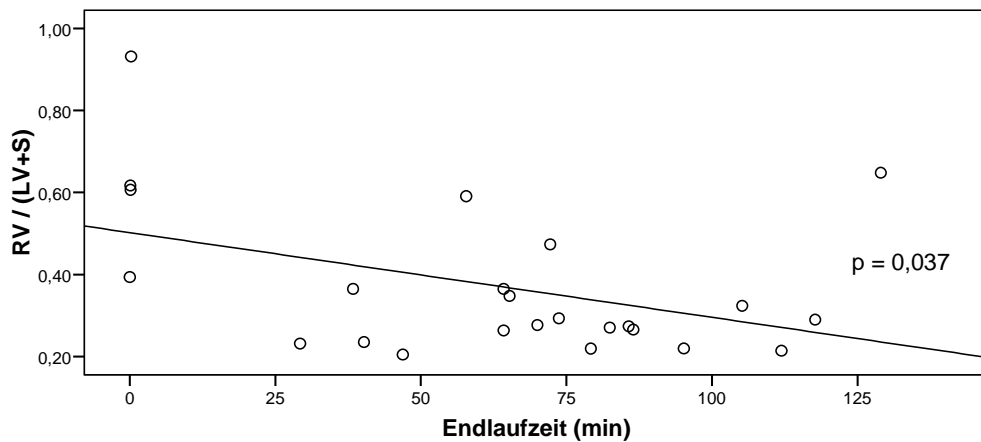


Abb. 25: Signifikante inverse Korrelation zwischen der Endlaufleistung und dem rechtsventrikulären Gewicht

3.3.5 Arterieller systolischer Blutdruck

Unter Normalbedingungen beträgt der systolische Blutdruck der Ratte zwischen 116-145mmHg [28]. Indirekt gemessen über den Verschlussdruck der Schwanzarterie (siehe Methodenteil 2.1.5.1) hatten die Versuchsratten einen durchschnittlichen systolischen Blutdruck von 108 ± 2 mmHg. Damit lag bei keiner Ratte ein systemischer Hypertonus vor, der den Ausschluss von dem Versuch bedeutet hätte. Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede der systolischen Drücke (Abb. 26).

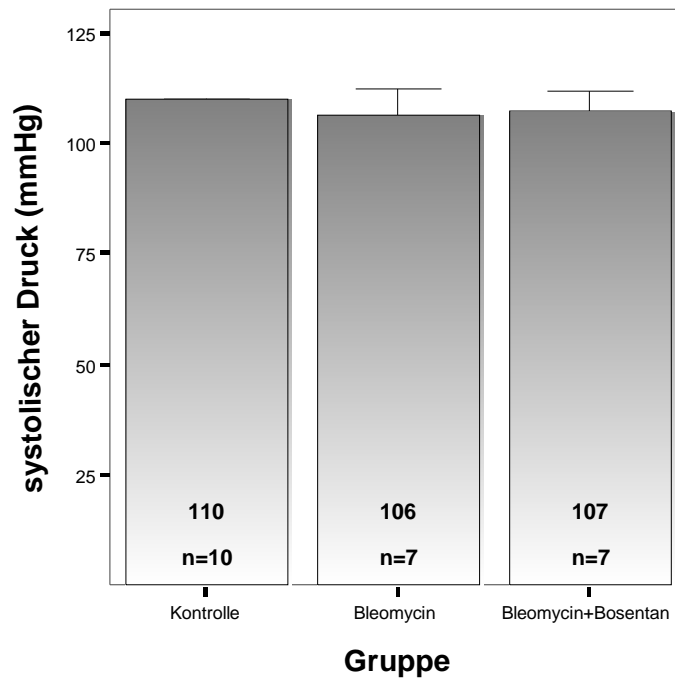


Abb. 26: Mittlerer systolischer Blutdruck der Versuchstiere, aufgeteilt nach Gruppen.

3.4 Neurohumorale Regulation

3.4.1 eNOS – mRNS Expression in der Lunge

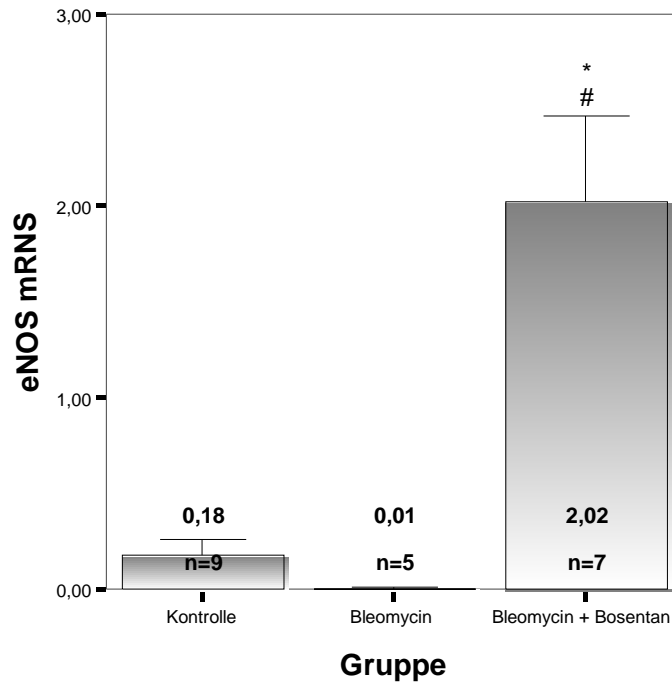


Abb. 27: Genexpression von eNOS

Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Bleomycingruppe und der Kontrolle (Abb. 27). Durch die Gabe von Bosentan kommt es zur signifikanten Erhöhung der eNOS–mRNS. Diese ist sowohl gegenüber Bleomycin 202fach erhöht ($p=0,004$), wie auch gegenüber der Kontrolle 11fach erhöht ($p=0,001$).

3.4.2 Endothelin-1 (ET-1)–mRNS in der Lunge

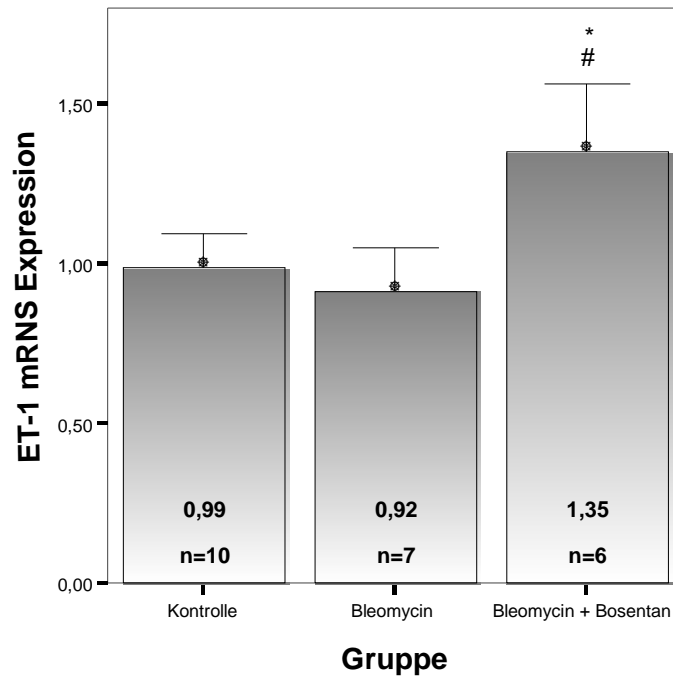


Abb. 28: Genexpression von ET-1 mRNS

Hierbei gab es keine signifikante Differenz zwischen der Bleomycingruppe und der Kontrolle (Abb. 28). Die Bosentangruppe hatte eine signifikante Erhöhung der ET-1–Konzentration sowohl gegenüber Bleomycin ($p=0,007$), wie auch gegenüber der Kontrolle ($p=0,005$).

3.4.3 Endothelin-A–Rezeptor mRNA in der Lunge

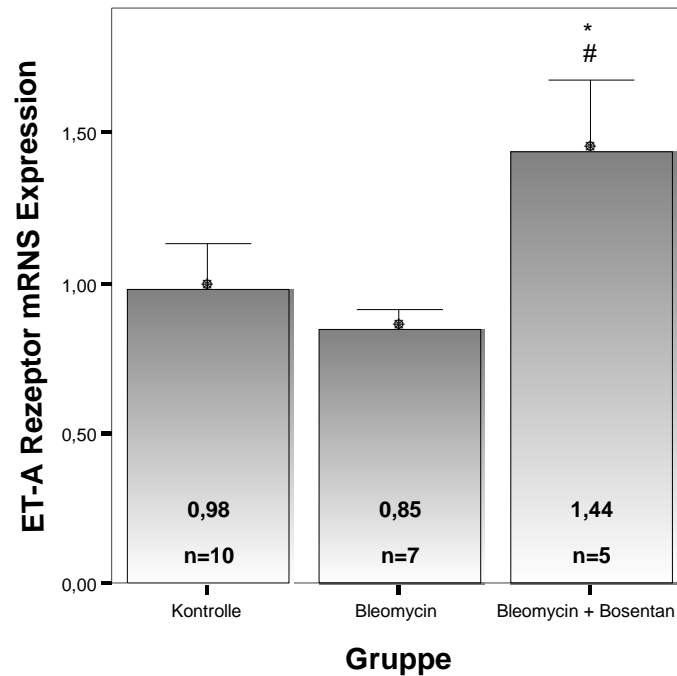


Abb. 29: Genexpression von ET-A Rezeptor mRNA

Die Konzentration des ET-A–Rezeptors der Bleomycingruppe war gegenüber der Kontrolle nicht signifikant erniedrigt (Abb. 29). Durch die zusätzliche Gabe von Bosentan kam es jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der ET-A–Rezeptor mRNA Expression sowohl gegenüber Bleomycin ($p=0,004$) wie auch gegenüber der Kontrolle ($p=0,007$).

3.4.4 Endothelin-B–Rezeptor mRNA in der Lunge

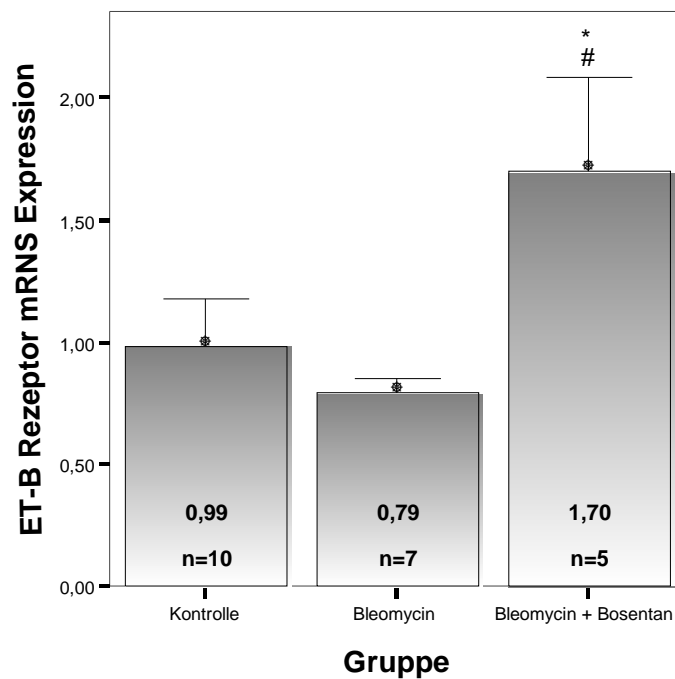


Abb. 30: Genexpression von ET-B Rezeptor mRNA

Die Konzentration des ET-B–Rezeptors der Bleomycingruppe war gegenüber der Kontrolle nicht signifikant erniedrigt (Abb. 30). Durch die zusätzliche Gabe von Bosentan kam es zu einer signifikanten Erhöhung der ET-B–Rezeptor mRNA Expression sowohl gegenüber Bleomycin ($p=0,004$), wie auch gegenüber der Kontrolle ($p=0,007$).

3.4.5 ET-1 Konzentration im Plasma

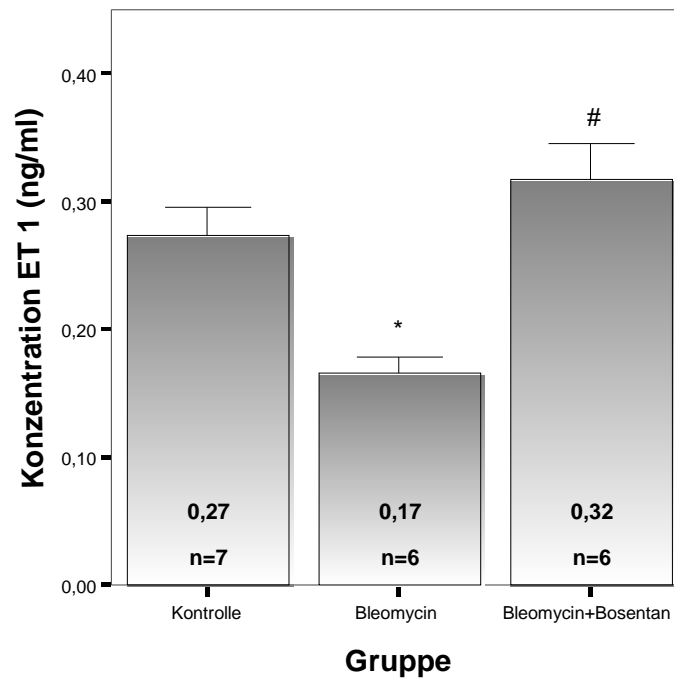


Abb. 31: Plasmakonzentration von ET-1

Die Plasmakonzentration von ET-1 ergab eine signifikante Erniedrigung bei der Bleomycingruppe im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,012$; Abb. 31). Nach Bosentaneinwirkung stieg die ET-1 Konzentration im Plasma wieder signifikant ($p=0,019$) gegenüber der Bleomycingruppe an und erreichte einen Wert, der sich nicht signifikant von der Kontrolle unterschied.

4 Diskussion

4.1 Bosentan verbessert die Leistungsfähigkeit im Bleomycin-Modell

Die vorliegende Studie zeigt, dass der ET-Rezeptorantagonist Bosentan die Leistungsfähigkeit der Ratten im Modell der Bleomycin-induzierten PF signifikant verbessert. Diese Verbesserung ging mit einer signifikanten Reduktion der pulmonalen Fibrose (PF) und der PH unter Bosentan einher. Die Entwicklung der PF konnten wir an steigenden Konzentrationen von Hydroxyprolin (HyP) in den Lungen der mit Bleomycin behandelten Tiere nachweisen [15,21]. Ebenso war das relative Lungengewicht dieser Tiere signifikant erhöht. Die Entwicklung der PF wurde von einer entstehenden PH und einer Rechtsherzhypertrophie begleitet [54,55]. Es konnte gezeigt werden, dass die mit Bosentan behandelten Bleomycin-Tiere einen deutlich niedrigeren RVSP, sowie eine signifikant reduzierte Rechtsherzhypertrophie ausbildeten.

Mehrere Studien bewiesen, dass die Leistungsfähigkeit einen der aussagekräftigsten Parameter des Langzeitüberlebens bei chronisch progressiven Erkrankungen darstellt. So besteht eine Beziehung zwischen der Leistungsfähigkeit einerseits und dem Langzeit-Überleben und der Ausprägtheit der Erkrankung andererseits [56,57,58,59]. Im Vergleich zur Genexpressionanalyse oder zu histologischen Studien hat die Evaluation der Leistungsfähigkeit den Vorteil, das funktionelle Ergebnis einschließlich der Interaktion des kardiopulmonalen, sowie des muskulären Systems, widerzuspiegeln. Unsere Daten zeigen, dass die Applikation des ET-Rezeptorantagonisten Bosentan bei Ratten mit Bleomycin-induzierten PF nach 4 Wochen zu einer signifikanten Verbesserung der Leistungsfähigkeit im Vergleich zu der Bleomycingruppe führte.

Dabei zeigte sich im Verlauf bereits ab dem zehnten Tag ein deutlicher Leistungseinbruch der Bleomycingruppe. Zu diesem Zeitpunkt findet eine vermehrte Einlagerung von Kollagen ins Interstitium statt, was den Beginn der Lungenfibrose markiert [60,61,62].

4.2 Verbesserung der Lungenfibrose

Ebenso wie in anderen Studien [15,21,63] kam es auch in dieser Studie nach intratrachialer Bleomycin-Applikation zur Ausbildung einer PF. Diese wurde durch Analyse des HyP-Gehaltes der Lungen und durch die Bestimmung der Lungengewichte untersucht.

Die Ergebnisse stimmen mit zahlreichen Untersuchungen über den HyP-Gehalt der Lungen im Bleomycintiermodell überein. Mutsaers et al. untersuchten den Kollagengehalt der Lungen – mittels HyP – im Verlauf von drei Wochen und zeigten die zunehmende Kollagenvermehrung über diesen Zeitraum bei Tieren, die Bleomycin erhalten haben [15]. Im Unterschied zur Kontrolle lag die HyP-Konzentration etwa 2fach erhöht, was mit dem Gros der Ergebnisse anderer Arbeiten übereinstimmt [64,65]. Unsere Daten zeigen hingegen einen etwa 3fachen Anstieg der HyP-Konzentration. Diese Differenz ist auf die unterschiedliche Applikationsmenge von Bleomycin zurückzuführen. Mutsaers et al. applizierten Bleomycin in einer Dosis von 1,5U/kg KG, in unseren Untersuchungen wurden den Ratten dagegen 2,5U/kg KG verabreicht. Serrano-Mollar et al., die ebenso eine Dosis von 2,5U/kg KG verwendet haben, untersuchen ihre Tiere nur 15 Tage, kommen jedoch zu ähnlich hohen HyP-Konzentrationen wie in dieser Arbeit [63].

Durch die Gabe von Bosentan kam es hingegen zur Reduktion des HyP-Gehaltes nach Bleomycin-Instillation. Dies stimmt mit früheren Studien überein, die zeigten dass die Blockade der ET-Rezeptoren zu einem verringerten Remodeling führt. Von Zellkultur-Untersuchungen wissen wir, dass ET als profibrotische Zytokine fungieren können, indem sie die Chemotaxis und Proliferation der Fibroblasten stimulieren [20,66,67] und die Prokollagen Produktion fördern [16,68,].

Battistini et al. zeigten, dass vor allem die vasoaktiven, proinflammatorischen und proliferativen Aspekte der ET durch Bosentan inhibiert werden. Dies führt unter anderem zu einer verminderten DNS-Synthese von Fibroblasten, wirkt sich aber auch positiv auf das Remodeling aus [69].

Die beiden früheren Studien, die sich mit dem Effekt von ET-Rezeptorantagonisten auf die Bleomycin-induzierte pulmonale Fibrose beschäftigt haben, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen [15,21]. Mutsaers et al. konnte keine erniedrigte HyP-Konzentration durch Bosentan nachweisen, während Park et al. bei identischer, applizierter Bleomycin- und Bosentanmenge (im Vergleich zu Mutsaers et al.) anhand von morphologischen Messungen eine signifikant reduzierte Lungenfibrose durch Bosentan nachweisen konnte. In unseren Versuchen wurde eine höhere Applikationsdosis für Bleomycin verwendet (2,5U/kg KG, anstatt 1,5U/kg KG bei Park et al. und Mutsaers et al.). Der Fibrosegrad der Lunge wurde sowohl durch die HyP-Bestimmung (im Vergleich zu Mutsaers et al.), als auch durch eine

immun-histologische Bestimmung (im Vergleich zu Park et al.) quantifiziert. Beide Untersuchungen zeigten eine signifikante Reduktion der PF unter Bosentan.

Auch das relative Lungengewicht nahm, wie bereits in anderen Studien beschrieben [63], unter Bleomycin-Instillation signifikant zu und konnte unter Bosentangebe signifikant vermindert werden.

4.3 Verbesserung der pulmonalen Hypertonie

Es ist anerkannt, dass der potente Vasokonstriktor ET-1 das pulmonale Gefäßremodeling mitverursacht [70]. Diese Studie zeigt, dass – gemessen an der rechtsventrikulären Hypertrophie und dem RVSP – der Endothelinrezeptorantagonist Bosentan zu signifikanter Verbesserung der pulmonalen Hypertonie im Modell der Bleomycin induzierten PF führt.

Die, nach der Messung des RVSP entnommenen Herzen der Versuchstiere zeigten bei der Untersuchung des relativen Herzgesamtgewichtes eine signifikante Gewichtszunahme bei den Bleomycintieren. Bei makroskopischer Betrachtung der Ventrikel fiel bereits eine deutliche, konzentrische Hypertrophie der rechten Ventrikel auf. Durch die Gewichtsvermessung der Ventrikel wurde diese Beobachtung quantifiziert. Es zeigte sich, dass die relative Herzgesamtgewichtszunahme ausschließlich aufgrund der Rechtsherzhypertrophie zustande kam. Das relative LV-Gewicht zeigte indes keine Unterschiede zur Kontrolle. Auch die Berechnung des rechtsventrikulären Anteils am Gesamtgewicht des Herzens bestätigt nochmals die signifikante Rechtsherzhypertrophie der mit Bleomycin behandelten Tiere. Die Ergebnisse stehen sowohl bezüglich der relativen Ventrikelgewichte wie auch der Ratios ($RV/(LV+S)$ – Quotient) in Einklang mit anderen Untersuchungen [71,72,73,74,75,76].

Bedingt durch die Rechtsherzhypertrophie lag auch der RVSP der mit Bleomycin behandelten Tiere signifikant erhöht gegenüber den Werten der Kontrolltiere.

Unter Bosentan wurde dagegen sowohl die Rechtsherzhypertrophie, wie auch der RVSP gegenüber der Bleomycingruppe signifikant reduziert. Desweiteren zeigen unsere Daten, dass das verminderte relative Herzgesamtgewicht ausschließlich auf der signifikanten Reduktion des relativen rechtsventrikulären Gewichts unter Bosentan beruht. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die wichtige Rolle des Rezeptorantagonisten bei der Entwicklung der PH auf dem Boden einer PF. Vergleichbare Daten konnten Hill et al. am MCT-Tiermodell demonstrieren [75]. Nach 3 Wochen reduzierte sich der Lungenhochdruck signifikant, allerdings nur bei der Gabe einer Dosis von 200mg/kg KG. Dagegen konnten Chen et al. anhand des Hypoxie-Modells schon bei 100mg/kg KG, identisch zu unserer Dosis, eine signifikante Reduktion des RVSP erreichen [77].

Dennoch haben die Tiere der Bosentangruppe immer noch eine pulmonale Hypertonie. So zeigen auch die Daten, dass Bosentan die Fibrosierung der Lunge unter Bleomycin nicht komplett aufhebt. Es besteht weiterhin ein signifikant erhöhter HyP-Gehalt der Lungen der Bosentangruppe im Vergleich zu den Kontrollen. Es liegt daher nahe, dass der immer noch erhöhte RVSP der Bosentantiere das direkte Korrelat der, zwar verminderten, jedoch immer noch existenten Lungenfibrose dieser Tiere darstellt.

Klinische Relevanz haben diese Ergebnisse z.B. bei prophylaktischer Gabe von Bosentan im Rahmen einer Zytostatika-Therapie mit Bleomycin, das etwa bei der Therapie von Seminomen Einsatz findet und typischerweise als Nebenwirkung eine Lungenfibrose verursachen kann.

4.4 Veränderungen des Körpergewichtes

Durch die Bleomycingabe kam es in der Bleomycingruppe zu einem signifikanten Unterschied der relativen Gewichtszunahme sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch im Vergleich zur Bleomycin+Bosentangruppe.

Während die Kontrolltiere und die Tiere aus der Bleomycin+Bosentangruppe stetig an Gewicht zunahmen, verloren die Tiere der Bleomycingruppe innerhalb der ersten 8 Tage an Gewicht und nahmen erst anschließend wieder zu. Auch Park et al., Sugahara et al. und Gong et al. untersuchten die Einwirkung von Bleomycin auf das Körpergewicht und kamen zu vergleichbaren Ergebnissen. Während Sugahara et al. nur die Endgewichte verglich, zeigten Park et al. und Gong et al., dass die Ratten zunächst 1 – 2 Wochen nach Bleomycininstillation an Gewicht verloren, sich nach 28 Tagen aber wieder knapp über ihrem Ausgangsgewicht befanden [21,65,78].

4.5 Veränderungen auf molekular-biologischer Ebene

In der Lunge spielt ET-1 vorwiegend am Anfang der Schädigung eine Rolle, indem es die Aktivierung von Neutrophilen und Mastzellen sowie die Zytokin-Produktion der Monozyten induziert [79,80,81,82,83,84,85,86]. Darüber hinaus stimuliert ET-1 die Replikation von Fibroblasten und die Kollagensynthese [20,66,67,87,88,89]. Die genaue pathophysiologische Bedeutung des Endothelin-Systems ist bis heute jedoch unklar.

Eine frühere Studie [90] zeigte, dass es im Bleomycin-Modell ab dem 7. Tag nach der Applikation von Bleomycin zu einer erhöhten Expression von ET-1 in alveolären Makrophagen und im Epithelium kommt. Dieser Anstieg treibt die Ausbildung der pulmonalen Fibrose voran [15,17,21,91]. Wendel et al. zeigten, dass die Zahl der Prokollagen I-positiven Fibroblasten und ED-1 positiven mononukleären Zellen am 7. Tag nach Bleomycinapplikation signifikant erhöht waren und bis zum Tag 28 wieder auf Ebene der Kontrollen lagen [90]. Auch unsere Ergebnisse zeigen am Tag 26 nach Bleomycingabe keine veränderte ET-1 Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Das Ergebnis ist zunächst überraschend, gelten doch gerade erhöhte ET-1 Konzentrationen als Anzeiger für die Krankheitsprogredienz. So finden auch Park et al. am Tag 28 nach Bleomycinapplikation erhöhte ET-1 Expressionen im Epithel der Luftwege und in inflammatorischen Zellen – nicht aber in Typ II Pneumocyten und vaskulären Endothelzellen [21].

Die Untersuchungen dieser Studie basieren auf der Analyse eines Lungenhomogenisates, in dem unselektiv alle Zelltypen der Lunge vorhanden sind. Eine erhöhte ET-1 Expression in einzelnen Zellen muss daher nicht zwangsläufig eine gleich bleibende ET-1 Genexpression im Lungenhomogenisat ausschließen. Ebenso spielt die Frage, in welchem Gefäßabschnitt es zu einer Erhöhung der ET-1 Spiegel kommt, eine Rolle. So konnten Giaid et al. [13] in den Lungen von Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH) gerade in den kleinen Widerstandgefäßen die deutlichste Erhöhung der ET-1 Spiegel feststellen. Bezogen auf das gesamte Homogenisat der Lunge mag sich diese Veränderung aber kaum auswirken. Mutsaers et al., die Lungenhomogenisate im Zeitverlauf an einem Bleomycin-Modell untersucht haben, berichten von rasch ansteigenden ET-1 Spiegel, die schon am siebten Tag nach Bleomycingabe 3fach erhöht im Vergleich zur Kontrolle sind und im weiteren Verlauf unverändert bis zum 21. Tag bleiben [15]. Die Studie endet hier, so dass kein direkter Vergleich zu unserer Studie gezogen werden kann, in der die ET-1 Spiegel erst am 26. Tag bestimmt wurden. Dennoch sieht man anhand der publizierten Daten von Mutsaers et al., dass sich die Erhöhung der ET-1-Werte im Vergleich zu den Kontrollen von Tag 7 bis zum Tag 21 nahezu halbiert hat und zeigt damit einen deutlichen Trend zu niedrigeren ET-1-Spiegeln im Verlauf der Erkrankung [15].

Es stellt sich daher die Frage warum die ET-1 Genexpression vier Wochen nach der Bleomycinexposition vermindert ist. Einen interessanten Hinweis, liefern Clarke et al. mit der Entdeckung, dass es bei persistierend erhöhten Ca^{2+} -Spiegeln auch zu einer Vasokonstriktion kommt, wenn das ET-1 bereits vom Rezeptor entfernt wurde und damit die dem ET-1 zugeordnete Wirkung auch bei niedrigen ET-1-Spiegeln aufrechterhalten werden kann [92]. Eine begründende Hypothese ist damit, dass sich am 26. Tag nach Bleomycingabe ein Status quo eingestellt hat, bei dem die Vasokonstriktion auch ohne die erhöhten ET-1 Konzentrationen bewerkstelligt wird. Zudem zeigen unsere Daten, dass auch die ET_B -Rezeptor Genexpression sich nicht von derjenigen, der Kontrolltiere unterscheidet. Über eine Reduktion der cAMP-Spiegel und der damit verbundenen Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration greift der ET_B -Rezeptor direkt in die Regulierung des Kalzium-Haushaltes ein [93,94,95,96]. Da es jedoch nicht zu einer vermehrten Expression von ET_B kommt, besteht offensichtlich auch nicht die Notwendigkeit die ET-1 Genexpression bzw. die Genexpression des ET_A -Rezeptors, über den der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel erfolgt, zu erhöhen.

So spricht vieles dafür, dass sich nach 26 Tagen Bleomycin ein Status quo eingestellt hat und das ET-System zu diesem Zeitpunkt keine große Aktivität besitzt.

Die Rolle des NO in der Pathogenese der Lungenfibrose bzw. in der pulmonalen Hypertonie ist ebenfalls bis heute unklar. Giaid et al. konnten in einer klinischen Studie erhöhte eNOS-Genexpressionen in gesunden Lungen, nicht aber in solchen von Patienten mit sekundärer pulmonaler Hypertonie finden [97]. Weitere Untersuchungen an kultivierten Endothelzellen [98,99], normotensiven Lungen [100,101,102,103] und klinischen Studien mit NOS-Blockern [98,104,105] stützen diese Ergebnisse. Trotzdem gibt es auch Studien, bei denen es zu keiner Veränderung [106,107] oder aber zu einer Zunahme der eNOS Genexpression kommt [108,109,110]. Das Hauptproblem ist auch hier die direkte Vergleichbarkeit der Daten, da es eine große Varianz bezüglich Versuchsdauer, Versuchstieren, der Krankheitsinduktion und der Auswertungsverfahren gibt.

Unsere Daten zeigen eine verminderte Genexpression der eNOS in der Bleomycingruppe, die jedoch nicht signifikant war. Dabei zeigt diese Untersuchung ebenfalls wieder keinen Verlauf, sondern die Endpunktbestimmung an Tag 26 nach Bleomycingabe. Eine verminderte NO-Produktion zu diesem Zeitpunkt kann anhand mehrerer anderer Forschungsergebnisse nachvollzogen werden. In diesem Stadium ist es schon zu deutlichen Anpassungsmechanismen gekommen. Die Lungenfibrose hat sich manifestiert, der RVSP ist angestiegen, und der rechte Herzventrikel ist hypertrophiert. Hampl et al. zeigten mit der Fokussierung auf die iNOS eine mögliche Erklärung auf [111,112]. Dieses Enzym wird bei

einer Entzündungsreaktion im Rahmen der Zellimmunität vermehrt induziert [113], kann aber auch von pulmonalen glatten Muskelzellen während der chronisch hypoxischen pulmonalen Hypertonie neu gebildet werden [112]. Dabei ist seine Umsatzrate um ein Vielfaches höher als die der eNOS [114]. In Endothelzellen stimulieren proinflammatorische Zytokine [115], wie beispielsweise Interleukine, ihre Aktivität, die dann über Tage erhalten bleiben kann [116]. Von der Ca^{2+} -Konzentration ist die iNOS völlig unabhängig. Die durch sie erreichten NO-Konzentrationen sind zytotoxisch [117] und schädigen neben den Mikroorganismen auch die umliegenden Zellen. Da die eNOS wegen ihrer Kinetik im Vergleich zur iNOS wesentlich schneller auf sich verändernde NO-Spiegel reagieren kann [114], könnte die Reduktion der eNOS Genexpression einen weiteren Kompensationsmechanismus darstellen, der einer progredienten Schädigung der körpereigenen Zellverbände vorbeugen könnte [111]. Darüber hinaus erklären verminderte eNOS-Konzentrationen auch, warum eine Therapie mit NOS-Blockern, wie z.B. dem Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester, zu keiner Verbesserung der Erkrankung führt [104], wohingegen schon kleine Mengen von inhaliertem NO eine deutliche Besserung erbringen [118,119,120].

Der unselektive Endothelinrezeptorantagonist Bosentan führte in dieser Studie zu einer generellen Aktivierung des NO- und ET-Systems. Durch die Blockierung der ET_A - und ET_B -Rezeptoren mittels Bosentan kann ET-1 seine Wirkung nicht mehr vermitteln. Der Körper reagiert darauf mit einer vermehrten Genexpression der ET_A - und ET_B -Rezeptoren und des ET-1 selbst. Diese Rückkopplungsreaktionen finden sich beispielsweise ebenso im Schilddrüsensystem oder dem Insulinsystem [121], bei dem es mangels dieser Rückkopplung zu einer vermehrten Ausschüttung der Substanz kommt. Über die vermehrte ET_B -Genexpression kommt es schließlich auch zu einer vermehrten NO-Freisetzung, was wiederum mit einer Vasodilatation einhergeht [119,122,123,124,125].

Durch die signifikante Erhöhung der eNOS-Expression unter Bosentan kommt es am Tag 26 zu vasodilatatorischen Effekten, die sich parallel dazu an den signifikant verbesserten Laufergebnissen der Bosentangruppe zeigen. Allerdings kann anhand unserer Studie die typische Wechselwirkung zum Endothelinsystem nicht nachvollzogen werden, da die Daten zeigen, dass gerade beide Systeme (eNOS und ET-1) unter Bosentan hochreguliert sind. Möglicherweise ist diese Entkopplung beider Systeme auf die vermehrte Zellschädigung und die damit in Mitleidenschaft gezogene Signaltransduktion zurückzuführen. Die Studie von Mathew et al. konnte dies anhand des Verlustes von Caveolin-1 zeigen [126].

Zudem zeigt die Dissertation, dass die ET-1 Plasmakonzentration unter Bosentan im Vergleich zu der Bleomycingruppe signifikant ansteigt. Die dabei im Vergleich zur ET-1 Genexpression der Lunge deutlich verminderte Erhöhung der ET-1 Plasmakonzentration kann durch die Verzögerung bedingt sein, bis das ET-1 im Plasma angelangt.

Auch Hill et al. und Löffler et al. haben als Reaktion auf die Bosentangabe eine Konzentrationserhöhung des ET-1 im Plasma nachgewiesen [75,127].

4.6 Ausblick

Es stellt sich die Frage, warum es unter Bosentan zu einer vermehrten Expression von ET-1 und eNOS, also zweier relativ gegensätzlicher Mechanismen kommt und warum sich daraus eine so deutliche klinische Besserung der Beschwerdesymptomatik ergibt. Abgesehen von dem vasodilatatorischen Effekt, den eNOS durch die Synthese des Mediators NO bewirkt, wird damit auch die von ET-1 vermittelte Vasokonstriktion gefördert, welche eigentlich zu keiner Verbesserung der Symptomatik führen dürfte. Auch wenn unsere Untersuchungsergebnisse zeigen, dass der ET_B-Rezeptor, der eine gesteigerte Freisetzung von NO bewirken kann, im Vergleich zum ET_A-Rezeptor vermehrt exprimiert wurde, dürfte dieser relativ kleine Unterschied (1,70 vs. 1,44) wohl nicht die signifikante Leistungsverbesserung unter Bosentan erklären. Aufklärung dürfte vielmehr die differenzierte Betrachtung der Genexpressionen in verschiedenen Zelltypen und Gefäßabschnitten zu unterschiedlichen Zeitpunkten bringen, wie das in einigen Arbeiten ansatzweise schon geschehen ist [124,125,128].

5 Zusammenfassung

Die Dissertation verdeutlicht, dass die signifikante Steigerung der Leistungsfähigkeit unter Bosentan der mit Bleomycin behandelten Ratten mit einer signifikant reduzierten Rechtsherzhypertrophie und einem signifikant reduzierten RVSP einhergeht. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass die Ausbildung der PF unter Bosentan signifikant reduziert ist im Vergleich zu Ratten, die nur mit Bleomycin behandelt wurden. Dies spiegelt die wichtige Rolle von Endothelinen bei der Entstehung der PH auf dem Boden einer PF wider.

Die zugrundeliegenden Genexpressionen ließen in dieser Studie jedoch keine eindeutigen Schlußfolgerungen zu. Die Ergebnisse zeigten, dass die Genexpression von ET-1 und deren Rezeptoren ETA und ETB sich unter Bosentangebe signifikant hochregulieren ließen, dass jedoch unter dem alleinigen Einfluß von Bleomycin keine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrolltieren stattfand. Das gleiche Bild zeigte sich bei der Untersuchung der eNOS, die ebenfalls unter Bosentangebe signifikant vermehrt exprimiert wurde, jedoch unter alleiniger Bleomycingabe keine signifikante Änderung zu den Kontrollen erkennen ließ. Aufgrund des Studiendesigns wurden jedoch die Genexpressionen am 26. Tag und nicht im Verlauf untersucht. Welche Regulationsmechanismen sich bis dahin abspielten, konnte im Rahmen meiner Dissertation nicht erforscht werden und gibt Raum für weitere Studien.

6 Literaturnachweis

- 1 Teder P, Noble PW
A Cytokine Reborn? Endothelin-1 in Pulmonary Inflammation and Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 23: 7-10.
- 2 Tukiaine et al., zitiert in
Prognosis of cryptogenic fibrosing alveolitis. / ATS 2002 /Mason RJ et al. Am J Resp Crit Care Med 1999;160:1771-7.
- 3 Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK et al.
Prognostic significance of histo-pathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 199-203
- 4 ATS Statement.
Guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med 2002; 166: 111–117.
- 5 Walter N, Collard HR, King TE
Current Perspectives on the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Proc Am Thorac Soc 2006; 3(4): 330-8
- 6 Nadrous HF, Pellikka PA, Krowka MJ et al.
Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Chest 2005; 128: 2393–2399.
- 7 Lettieri CJ, Nathan SD, Barnett S, Ahmad S, Shorr AF.
Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis. Chest 2006; 129: 746–752.
- 8 Olschewski H, Ardeschir H, Ghofrani HA et al.
Inhaled Prostacyclin and Iloprost in Severe Pulmonary Hypertension Secondary to Lung Fibrosis. Am J Resp Crit Care 1999; 160; 600-7.
- 9 Nathan SD, Noble PW, Tuder RM.
Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Pulmonary Hypertension. Connecting the Dots. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175: 875-880.
- 10 Chua F, Gauldie J, Laurent GJ.
Pulmonary Fibrosis. Searching for Model Answers. Am J Respir Cell Mol Biol 2005; 33: 9-13.
- 11 Channick RN, Sitbon O, Barst RJ.
Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. J. Am. Coll. Cardiol. 2004; 43; 62-67
- 12 Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G.
Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. Circulation 1996; 94: 1578–84.
- 13 Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP et al.
Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med 1993; 328: 1732–1739.
- 14 Trakada G, Nikolaou E, Pouli A, et al.
Endothelin-1 levels in interstitial lung disease patients during sleep. Sleep Breath 2003; 7(3): 111-8

- 15 Mutsaers SE, Foster ML, Chambers RC, Laurent GJ, McAnulty RJ.
Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 18: 611-619.
- 16 Dawes KE, Cambrey AD, Campa JS et al.
Changes in collagen metabolism in response to endothelin-1: Evidence for fibroblast heterogeneity. The Internat J Biochem & Cell Bio 1996; 28(2): 229-38
- 17 Hocher B, Schwarz A, Fagan KA et al.
Pulmonary Fibrosis and Chronic Lung Inflammation in ET-1 Transgenic Mice. Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 23: 19-26.
- 18 Saleh D, Furukawa K, Tsao M et al.
Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines. Am J Respir Cell Mol Biol 1997; 16(2): 187-93
- 19 Uguccioni M, Pulsatelli L, Grigolo B et al.
Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. Clin Pathol 1995;48:330-334
- 20 Cambrey AD, Harrison NK, Dawes KE, Southcott AM et al.
Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast migration and activity in vitro. Am J Respir Cell Mol Biol 1994; 11: 439–445.
- 21 Park S, Saleh D, Giaid A, Michel RP.
Increased Endothelin-1 in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis and the Effect of an Endothelin Receptor Antagonist. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 600-608
- 22 King TE, Behr J, Brown KK et al.
BUILD-1 : A Randomized Placebo-controlled Trial o Bosentan in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2008; 177: 75-81
- 23 Olschewski H, Ghofrani A, Enke B et al.
Medikamentöse Therapie der pulmonalen Hypertonie. Internist 2005; 46: 341-349.
- 24 Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al.
Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. N Engl J Med 2002; 346: 896–903
- 25 Fachinformation Bleomycin, www.fachinfo.de/data
- 26 Fachinformation Bosentan, www.fachinfo.de/data
- 27 Rhoden CH, Leeper DB, Smith IM, Evans TC, Duling BR.
Blood pressure changes in mice after lethal staphylococcal infection and endotoxin challenge. Experimental Biology and Medicine, 1975; 149(3): 622-5.
- 28 Krinke, G.
The Laboratory Rat. Academic Press ¹2000.
- 29 Chomczynski P, Sacchi N.
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987; 162(1): 156-9.
- 30 Mülhardt C.
Molekularbiologie/Genomics. Spektrum ⁴2003; 73-100.

- 31 Mullis KB, Faloona FA.
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. 1987; 155: 335-50.
- 32 Heinig J, Wilhelm S, Bittorf T et al.
Semiquantitative determination of IL-1 alpha, TNF-alpha, PDGF-A, PDGF-B, and PDGF-receptor in term human placenta using polymerase chain reaction (PCR).
Zentralbl. Gynakol. 1993; 115: 317 – 322.
- 33 Newton CR, Graham A
PCR. Introduction to Scientific Techniques. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford 1997.
- 34 Souazé F, Ntodou-Thomé A, Tran CY et al
Quantitative RT-PCR : Limits and Accuracy. BioTechniques 1996; 21: 280-285.
- 35 Peccoud J, Jacob C.
Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. Biophys J. 1996; 71(1): 101-108.
- 36 Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW
Real-time PCR efficiency standardized estimation from single reaction setup.
Nucleic Acids Res., 2003; 31(20): e122.
- 37 Rasmussen R.
Quantification on the LightCycler. In:
Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds.
Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. Springer Press,
Heidelberg; 2001; ISBN 3-540-66736-9, 21-34.
- 38 Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP.
Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.
Biotechniques 1997; 22: 130-131, 134-138.
- 38 Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV et al.
The Lightcycler™: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. BioTechniques 1997; 22: 176–81.
- 39 Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT.
Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. Biotechniques 1998; 24: 954-8, 960, 962.
- 40 Roche Applied Science
Technical Note. No. LC 18/2004. Roche Diagnostics 2004. www.roche-applied-science.com.
- 41 Wieland S.
Genexpression. Grundlagen und Pathogenese. Dtsch Med Wochenschr 1997; 122: 1457-60.
- 42 Sambrook JE, Fritsch EF, Maniatis T.
Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
U.S., New York 1989.
- 43 Rogers B, McKenzie D.
Control RT-PCR Primers for Human Gene Transcripts with Varying Abundance.
http://www.stratagene.com/vol11_3/p100-102.htm 2002; 100-102.
- 44 Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH.
Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. PNAS, 1991; 7688(16): 7276-80.

- 45 Lee LG et al.
Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucl. Acids. Res. 1993; 21: 3761-3766.
- 46 Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giustu W et al.
Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods and Applications 1995; 4: 357-362.
- 47 Förster, T.
Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Ann Phys 1948; 6: 55-75.
- 48 Clegg RM.
Fluorescence resonance energy transfer. Curr. Opin. Biotechnol. 1995; 6: 103-110.
- 49 Stryer L.
Fluorescence Energy Transfer As A Spectroscopic Ruler. Ann Rev Biochem 1978; 47: 819-46
- 50 Gibson UE, Heid CA, Williams PM
A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 1996; 6: 995-1001.
- 51 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.
Real time quantitative PCR. Genome Res 1996; 6: 986-994.
- 52 Goidin D et al
Ribosomal 18S RNA Prevails over GAPDH and β -Actin Genes as Internal Standard for Quantitative Comparison of mRNA Levels in Invasive and Noninvasive Human Melanoma Cell Subpopulations. Analytical Biochemistry 2001; 295: 17-21.
- 53 Livak KJ, Schmittgen TD.
Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C(T)$} Method. Methods., 2001; 25(4): 402-408.
- 54 Williams JH, Jr., Bodell P, Hosseini S, et al.
Haemodynamic sequelae of pulmonary fibrosis following intratracheal bleomycin in rats. Cardiovasc Res 1992; 26(4): 401-8
- 55 Sato S, Kato S, Arisaka Y, et al.
Changes in pulmonary hemodynamics during normoxia and hypoxia in awake rats treated with intratracheal bleomycin. Tohoku J Exp Med 1993; 169(3): 233-44
- 56 Hallstrand TS, Boitano LJ, Johnson WC, Spada CA, Hayes JG, Raghu G.
The timed walk test as a measure of severity and survival in idiopathic pulmonary fibrosis. Eur Respir J 2005;25(1):96-103.
- 57 Miki K, Maekura R, Hiraga T et al.
Impairments and prognostic factors for survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Med 2003;97(5):482-90.
- 58 Lederer DJ, Arcasoy SM, Wilt JS, D'Ovidio F, Sonett JR, Kawut SM.
Six-minutewalk distance predicts waiting list survival in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2006;174(6):659-64.
- 59 King TE, Tooze JA, Schwarz MI et al.
Predicting Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Resp Crit Care Med 2001; 164(7) :1171-1181.

- 60 Hay JG, Haslam PL, Dewer A, Addis B, Laurent GJ
The development of acute lung injury following the combination of intravenous bleomycin and exposure to hyperoxia in rats. Thorax 1987a; 42: 374-382
- 61 Heldin C-H, Westermark B
Mechanism of action and in vivo role of platelet derived growth factor. Physiological Reviews 1999; 79 (4)
- 62 Rossi P, Karsenty G, Roberts AB, Roche NS et al.
A nuclear factor 1 binding site mediated the Transcriptional activation of a type I collagen promoter by TGF- β . Cell 1988; 52[3]: 405 –414
- 63 Serrano-Mollar A, Closa D, Prats N et al.
In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats. British Journal of Pharmacology 2003; 138: 1037–1048
- 64 Kolb M, Margetts PJ, Galt T et al.
Transient Transgene Expression of Decorin in the Lung Reduces the Fibrotic Response to Bleomycin. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 770-777.
- 65 Gong LK, Li XH, Wang H et al.
Feitai Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats. Biol. Pharm. Bull. 2004; 27(5) 634–640
- 66 Shahar I, Fireman E, Topilsky M, Grief J, Schwarz Y et al.
Effect of endothelin-1 on alpha smooth muscle actin expression and on alveolar fibroblast proliferation in interstitial lung diseases. Int J Immunopharmacol 1999; 21: 759–775.
- 67 Peacock AJ, Dawes KE, Shock A, Gray AJ et al.
Endothelin 1 and endothelin 3 induced chemotaxis and replication of pulmonary fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 7: 492–499.
- 68 Kaheleh, M.B.
Endothelin, an endothelial- dependent vasoconstrictor in scleroderma: enhanced production and profibrotic action. Arthritis Rheum. 1991; 34: 978-983.
- 69 Battistini B, Chailier P, D'Orléans-Juste P et al.
Growth regulatory properties of endothelins. Peptides 1993; 14: 385–399.
- 70 Perros F, Dorfmueller P, Humbert M.
Current insights on the pathogenesis of pulmonary arterial hytertension. Semin Respir Crit Care Med 2005; 26(4): 355-64
- 71 Le Cras TD, Tyler RC, Horan MP, Morris KG et al.
Effects of chronic hypoxia and altered hemodynamics on endothelial nitric oxide synthase expression in the adult rat lung. J Clin Invest. 1998; 101: 795-801.
- 72 Nishida M, Okada Y, Akiyoshia K.
Role of endothelin ETB receptor in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Eur J Pharmacol 2004; 496: 159–165
- 73 Stessel H, Brunner F.
Effect of Endothelin Antagonism on Contractility, Intracellular Calcium Regulation and Calcium Regulatory Protein Expression in Right Ventricular Hypertrophy of the Rat. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2004; 94: 37–45.
- 74 Jasmin JF, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J.
Effectiveness of a Nonselective ETA/B and a Selective ETA Antagonist in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. Circulation 2001;103:314-318

- 75 Hill NS, Warburton RR, Pietras L, Klinger JR.
Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. J Appl Physiol 1997; 83:1209-1215.
- 76 Horstman DJ, Frank DU, Rich GF.
Prolonged Inhaled NO Attenuates Hypoxic, but Not Monocrotaline-Induced, Pulmonary Vascular Remodeling in Rats. Anesth Analg 1998; 86: 74-81
- 77 Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Dicarolo VS, Oparil S.
Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. J Appl Physiol 1995; 79: 2122-31
- 78 Sugahara K, Iyama KI, Kuroda MJ, Sano K.
Double Intratracheal Instillation of Keratinocyte Growth Factor Prevents Bleomycin-induced Lung Fibrosis in Rats. J. Pathol. 1998; 186: 90-98
- 79 Helset E, Lindal S, Olsen R, Myklebust R, Jorgensen L.
Endothelin-1 causes sequential trapping of platelets and neutrophils in pulmonary microcirculation in rats. Am J Physiol 1996; 271: L538-L546.
- 80 Helset E, Ytrehus K, Tveita T, Kjaeve J, Jorgensen L.
Endothelin-1 causes accumulation of leukocytes in the pulmonary circulation. Circ Shock 1994; 44: 201-209.
- 81 Halim A, Kanayama N, El Maradny E, Maehara K et al.
Activated neutrophils by endothelin-1 caused tissue damage in human umbilical cord. Thromb Res 1995; 77: 321-327.
- 82 Ishida K, Takeshige K, Minakami S.
Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenalanine. Biochem Biophys Res Commun 1990; 173: 496-500.
- 83 McMillen MA, Sumpio BE.
Endothelins: polyfunctional peptides. J Am Coll Surg 1995; 180: 621-637.
- 84 Chanez P, Vignola AM, Albat B.
Involvement of endothelin in mononuclear phagocyte inflammation in asthma. J Allergy Clin Immunol 1996; 98: 412-420.
- 85 Ruetten H, Thiemermann C.
Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. J Physiol Pharmacol 1997; 48: 675-688.
- 86 Gomez-Garre D, Guerra M, Gonzalez E, Lopez-Farre A et al.
Aggregation of human polymorphonuclear leukocytes by endothelium: role of platelet activating factor. Eur J Pharmacol 1992; 224: 167-172.
- 87 Shi-wen X, Denton CP, Dashwood MR et al.
Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. J Invest Dermatol 2001; 116: 417-425.
- 88 Guidry C, Hook M.
Endothelin produced by endothelial cells promotes collagen gel contraction by fibroblasts. J Cell Biol 1991; 115: 873-880.
- 89 Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT.
Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. Cardiovasc Res 1993; 27: 2130-2134.

- 90 Wendel M, Petzold A, Koslowski R et al.
Localization of endothelin receptors in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. Histochem Cell Biol 2004; 122: 507-517.
- 91 Tani K, Yasuoka S, Ogushi F, Asada K et al.
Thrombin enhances lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 1991; 5: 34–40.
- 92 Clarke J, Benjamin N, Larkin W, Webb DJ, Davies GJ, Maseri A.
Endothelin is a potent long lasting vasoconstrictor in men. Am J Physiol 1989; 257: H2033–5.
- 93 Ackermann M, Ritthaler T, Riegger G, Kurtz A, Kramer BK.
Endothelin inhibits cAMP-induced renin release from isolated renal juxtaglomerular cells. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1995; 26: S135-7.
- 94 Bausher LP.
Endothelins inhibit cyclic AMP production in rabbit and human ciliary processes. J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 1995; 11: 135- 43.
- 95 Jones LG.
Inhibition of cyclic AMP accumulation by endothelin is pertussis toxin sensitive and calcium independent in isolated adult feline cardiac myocytes. Life. Sci. 1996, 58: 115-123.
- 96 Ritthaler T, Della Bruna R, Kramer BK, Kurtz A.
Endothelins inhibit cyclic AMP induced renin gene expression in cultured mouse juxtaglomerular cells. Kidney Int. 1996; 50: 108-15.
- 97 Giaid A, Saleh D.
Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med 1995; 333: 214-221.
- 98 Whorton AR, Simonds DB, Piantadosi CA.
Regulation of nitric oxide synthesis by oxygen in vascular endothelial cells. Am. J. Physiol. 1997; 272 (Lung Cell. Mol. Physiol. 16): L1161–L1166.
- 99 Arnet UA, McMillan A, Dinerman JL, Ballermann B, Lowenstein CJ.
Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia. J. Biol. Chem. 1996; 271: 15069–15073.
- 100 Carlin RE, Ferrario L, Boyd JT, Camporesi EM, McGraw DJ, Hakim TS.
Determinants of nitric oxide in exhaled gas in the isolated rabbit lung. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997; 155: 922–927.
- 101 Cremona G, Higenbottam T, Takao M, Hall L, Bower EA.
Exhaled nitric oxide in isolated pig lungs. J. Appl. Physiol. 1995; 78: 59–63.
- 102 Grimminger F, Priestersbach R, Weissmann N, Walmrath D, Seeger W.
Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. J. Appl. Physiol. 1995; 78: 1509–1515.
- 103 Kantrow SP, Huang YCT, Whorton AR, Grayck EN et al.
Hypoxia inhibits nitric oxide synthesis in isolated rabbit lung. Am. J. Physiol. 1997; 272 (Lung Cell. Mol. Physiol. 16): L1167–L1173.
- 104 Hampl V, Archer SL, Nelson DP, Weir EK.
Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. J. Appl. Physiol. 1993; 75: 1748–1757.

- 105 Roos CM, Frank DU, Xue C, Johns RA, Rich GF.
Chronic inhaled nitric oxide: effects on pulmonary vascular endothelial function and pathology in rats. J. Appl. Physiol. 1996; 80: 252–260.
- 106 Everett AD, LeCras TD, Xue C, Johns RA.
eNOS expression is not altered in pulmonary vascular remodeling due to increased pulmonary blood flow. Am. J. Physiol. 1998; 274: L1058-1065.
- 107 Rondelet B, Kerbaul F, Motte S et al.
Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. Circulation 2003; 107: 1329-1335.
- 108 Shaul PW, North AJ, Brannon TS et al.
Prolonged in vivo hypoxia enhances nitric oxide synthase type I and type III gene expression in adult rat lung. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995; 13: 167–174.
- 109 Xue C, Johns RA.
Upregulation of nitric oxide synthase correlates temporally with onset of pulmonary vascular remodeling in the hypoxic rat. Hypertension 1996; 28: 743-753.
- 110 Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA.
Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. Am J Physiol. 1996; 270: L164-L170.
- 111 Hampl V, Herget J.
Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. Physiological reviews 2000; 80: 1337-1372.
- 112 Hampl V, Bibova J, Banasova A et al.
Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. Am. J. Physiol. Lung cellular and molecular physiology 2006; 290: L11-20.
- 113 Jang AS, Lee JU, Choi IS et al
Expression of nitric oxide synthase, aquaporin 1 and aquaporin 5 in rat after bleomycin inhalation. Intensive Care Med 2004; 30: 489-495.
- 114 Nathan C.
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992; 6: 3051-64.
- 115 Kanno K, Hirata Y, Imai T, Iwashina M, Marumo F.
Regulation of inducible nitric oxide synthase gene by interleukin-1 beta in rat vascular endothelial cells. Am. J. Physiol. 1994; 267: 2318-24.
- 116 Nathan C, Xie QW.
Nitric oxide Synthases: Roles, Tolls and Controls. Cell 1994; 78: 915-8.
- 117 Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C.
Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to Leishmania major. J. Exp. Med. 1994; 180: 783-93.
- 118 Li H, Chen S, Chen Y, Meng QC et al.
Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. J. Appl. Physiol. 1994; 77: 1451–1459.
- 119 Muramatsu M, Rodman DM, Oka M, McMurtry IF.
Endothelin-1 mediates nitro-L-arginine vasoconstriction of hypertensive rat lungs. Am. J. Physiol. 1997; 272 (Lung Cell. Mol. Physiol. 16): L807–L812.

- 120 Blumberg FC, Wolf K, Sandner P, Lorenz C, Riegger GAJ, Pfeifer M.
The NO donor molsidomine reduces endothelin-1 gene expression in chronic hypoxic rat lungs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 280: L258-263.
- 121 Schmidt RF, Thews G.
Physiologie des Menschen. Springer Verlag ²⁷1997: 588
- 122 Soma S, Takahashi H, Muramatsu M, Oka M, Fukudu Y.
Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia exposed rats. Am J Respir Cell Mol Biol 1999, 20: 620–630.
- 123 Muramatsu M, Oka M, Morio Y, Soma S, Takahashi H, Fukuchi Y.
Chronic hypoxia augments endothelin-B receptor mediated vasodilation in isolated perfused rat lung. Am J Physiol 1999; 276: L358–L364.
- 124 Sato K, Rodman DM, McMurtry IF.
Hypoxia inhibits increased ETB receptor-mediated NO synthesis in hypertensive rat lungs. Am. J. Physiol. 1999; 276: L571-581.
- 125 Sato K, Rodman, DM McMurtry IF.
Hypoxia inhibits ETB receptor mediated NO synthesis in hypoxic rat lungs. Am J Physiol 1999; 270: L511–L518.
- 126 Mathew R, Huang J, Gewitz MH.
Pulmonary artery hypertension: caveolin-1 and eNOS interrelationship: a new perspective. Cardiology in Review 2007; 15: 143-149.
- 127 Löffler BM, Breu V, Clozel M.
Effect of different endothelin receptor antagonists and of the novel non-peptide antagonist RO 46-2005 on endothelin levels in rat plasma. FEBS 13147. 1993; 333 (1,2): 108-110.
- 128 Fukuroda T, Kobayashi M, Ozaki S et al.
Endothelin receptor subtypes in human vs rabbit pulmonary arteries. J Appl Physiol 1994; 76: 1976–1982.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

*	Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe
#	Signifikanz zwischen Bleomycingruppe und Bleomycin+Bosentangruppe
A	Startkopienzahl am Anfang der PCR
ACE	Angiotensin Converting Enzym
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Aqua dest	Aqua destillata
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BigET-1	Big Endothelin-1
Bos	Bosentan
bp	Basenpaaren
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (Charge-coupled Device)
cDNS	komplementäre DNS
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
C _P	Schwellenwert (Crossing Point)
C _T	Schwellenwert (Cycle threshold)
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylprocarbonat
DG	Diacylglycerol
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMAP	4-Dimethylamino-Pyridin
DNS	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-Triphosphat
DPLD	diffuse Lungenparenchymerkrankung
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Effizienz
ECE	Endothelin Converting Enzyme
EDRF	Endothelium derived relaxing factor

Anhang

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzym-Immunoassay (Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay)
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ET-1	Endothelin-1
ET _A -Rezeptor	Endothelin A – Rezeptor
ET _B -Rezeptor	Endothelin B – Rezeptor
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FRET	Fluoreszenz Resonanz Emissions Transfer
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTC	Guanidinisothiocyanat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HR-CT	Hochauflösende Lungen-Computertomographie
HyP	Hydroxyprolin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
iU	Internationales Unit
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LED	Lichtemittierende Diode (Leuchtdiode)
log	logarithmisch
LV	linksventrikulär bzw. linker Ventrikel
MCT	Monocrotalin
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
MPF	Multiplikationsfaktor
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NCBI	National Center of Biotechnology Information
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NYHA	New York Heart Association
OD	Optische Dichte
P	Amplifikationsmenge
p	Signifikanz
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion

Anhang

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGI	Prostaglandin
PGT	Pendel-Gehtest
pH	pondus Hydrogenii bzw. Potentia Hydrogenii
PräproET-1	Präpro-Endothelin-1
PVR	pulmonal-vaskulärer Widerstand
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten Reaktion (quantitative real time polymerase chain reaction)
rel.	relativ
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
RT	Reverse Transkriptase
RV	Rechtsventrikulär bzw. rechter Ventrikel
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Druck
s	Sekunde
st	Steigung
t_0	Tag 0
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T_a	Hybridisierungs-Temperatur
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus – Polymerase
TGF	Transforming Growth Factor
T_m	<i>Schmelzpunkt</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TTE	Transthorakale Echokardiographie
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UIP	Gewöhnliche interstitielle Pneumonie (Usual interstitial pneumonia)
VG	Verdünnungen
VO_{2max}	maximalen Sauerstoffaufnahme
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
ZVK	Zentraler Venenkatheter
ΔC_T -Wert	delta- C_T -Wert (relativer C_T -Wert)

7.2 Danksagung

Für die interessante Themenstellung meiner Dissertation und für das Heranführen an die wissenschaftliche Tätigkeit danke ich meinen Betreuern Herrn Dr. Stefan Schroll und Herrn PD. Dr. Friedrich Blumberg.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Pfeifer möchte ich besonders für sein großes Interesse am Gelingen meiner Arbeit und für seine Erreichbarkeit danken.

Bei den experimentellen Untersuchungen stand unsere MTA Daniela Sebah mit wertvoller Unterstützung und vielen praktischen Ratschläge parat. Hierfür danke ich von Herzen. Allen anderen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und den Mitarbeitern der Abteilung für Innere Medizin II im H1-Forschungsbau, die durch ihre Hilfe zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben, gilt mein Dank nicht minder.

7.3 Eigenständigkeitserklärung

ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Kammerstein, den 19. November 2013

Martin Nüchterlein