

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Jens W. Fischer

**Prostazyklin-Rezeptor- und sGC-Aktivator-vermittelte Signalwege:
Bedeutung für die Therapie der pulmonalen Hypertonie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sebastian Willgeroth

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Jutta Meyer

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Für meine Familie

Zusammenfassung

Die pulmonale arterielle Hypertonie ist definiert als pathologische Erhöhung des pulmonalarteriellen Widerstandes, charakterisiert durch Vasokonstriktion, vaskuläre Proliferation und Remodelling. An der Pathogenese ist maßgeblich beteiligt das Ungleichgewicht zwischen protektiven (Prostazykline, NO) und aggressiven (Thromboxan, Endothelin) Faktoren. Die medikamentöse Therapie zielt darauf ab, das Verhältnis günstig zu beeinflussen. Zur Verfügung stehen Endothelin-Rezeptorantagonisten, Prostazyklinderivate und PDE5-Hemmstoffe. Prostazyklinderivate wie Iloprost entfalten ihre Wirkung über Bindung an den IP-Rezeptor, hierdurch kommt es zur Aktivierung der Adenylatzyklase und zur Bildung des second messengers cAMP. PDE5-Hemmer stabilisieren das intrazelluläre cGMP. Dies entsteht nach Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch NO. cAMP und cGMP vermitteln in der Folge vasodilatatorische Effekte, cAMP führt weiterhin zu antiproliferativen Effekten. Ein relativ neuer und vielversprechender Therapieansatz ist die NO-unabhängige Aktivierung der sGC, 2014 wurde das Riociguat zur Therapie der PAH zugelassen. In dieser Arbeit wurde das Bay 41-2272 untersucht. Bei der Therapie mit Iloprost werden bei Langzeitanwendung stetig höhere Dosierungen notwendig, um den gewünschten Effekt zu vermitteln. Dies ist einer Desensibilisierung des IP-R zuzuordnen. In dieser Arbeit wurde untersucht, in welchem Maß die Iloprost-Dosis und die Dauer der Anwendung Einfluss auf die Desensibilisierung haben. Hierfür wurden Zellen über verschieden lange Zeiträume mit ansteigenden Dosierungen des Iloprost stimuliert, die cAMP-Messung erfolgte nach erneuter Stimulation. Es wurde gezeigt, dass die Minderantwort auf erneute Stimulation maßgeblich von der Dauer und der Dosis abhängig ist. Bei Stimulation von Zellen mit Bay 41-2272 kommt es durch Aktivierung der sGC zu erhöhten cGMP-Spiegeln. Es ist zuvor schon beschrieben worden, dass cGMP ein Hemmstoff der PDE3 ist, welche das cAMP hydrolisiert. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Bay 41-2272 durch Aktivierung der sGC und erhöhtes cGMP auch das cAMP zu erhöhen vermag. Hierfür wurde zunächst mittels RT-PCR und Western blot nachgewiesen, dass die untersuchten humanen pulmonalen Fibroblasten und glatten Muskelzellen die PDE3 überhaupt exprimieren. In der Folge wurde durch Western-blot-Analyse des VASP-Proteins gezeigt, dass sobald cGMP vermehrt gebildet wurde, auch der cAMP-Spiegel erhöht war. Durch direkte cAMP-Messungen konnte demonstriert werden, dass Bay 41-2272 sowohl den basalen, als auch den Iloprost-induzierten intrazellulären cAMP-Gehalt zu erhöhen in der Lage war. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob diese erhöhten cAMP-Spiegel sich auch in vermehrter Aktivität der nachgeschalteten Signalkaskaden ausdrückte. Hierfür wurde zum einen eine Aktivitätsmessung der PKA durchgeführt, diese zeigte sich signifikant erhöht nach Stimulation durch Bay 41-2272. Weiterhin wurde der antiproliferative Effekt des Bay 41-2272 untersucht. Hierfür wurde der Einbau von [³H]-markiertem Thymidin in Anwesenheit der Substanz gemessen. Iloprost und Bay 41-2272 waren beide in der Lage, den Einbau des Thymidins signifikant zu senken, auch hier konnte ein additiver Effekt des Bay 41-2272 zur Wirkung des Iloprost gezeigt werden. Im weiteren Verlauf wurde durch Versuche mit dem PKG-Inhibitor DT2, dem PKA-Hemmstoff PKI_{myr}, dem PKA-spezifischen cAMP-Analogen dbcAMP und dem Epac-spezifischen cAMP-Analogen 8-pCTP demonstriert, dass die antiproliferative Wirkung eindeutig erhöhten cAMP-Spiegeln zuzuordnen ist und über die cAMP-Epac-Kaskade vermittelt wird. sGC-Aktivatoren stellen daher eine neue Möglichkeit in der Behandlung der PAH dar. In Kombination mit Iloprost könnte es ggf. einer Desensibilisierung des IP-R entgegenwirken, da bei Kombination durch die Erhöhung des cAMP durch Bay 41-2272 geringere Iloprost-Dosierungen notwendig sein könnten.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin 3',5'-Monophosphat
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenase
CTEPH	chronisch-thromboembolische pulmonale Therapie
dbcAMP	Dibutyryl-cAMP
DT2	DT-2 trifluoroacetate salt
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Epac	exchange protein directly activated by cAMP
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
HPF	Humane pulmonale Fibroblasten
HPSMC	Humane pulmonale glatte Muskelzellen
IBMX	Isobuthylmethylxanthin
IP-R	Prostazyklin-Rezeptor
kDa	Kilo Dalton
µM	Mikromolar (µMol/l)
nM	Nanomolar (nMol/l)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet derived growth factor
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostazyklin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C

PKG	Proteinkinase G
PKI _{myr}	Peptid-Inhibitor der PKA, myristoylierte Form
RIA	Radioimmunassay
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
sGC	soluble guanylate cyclase, lösliche Guanylatzyklase
VASP	vasodilatator-stimulated phosphoprotein
8-pCTP	8-pCTP-2'-O-Me-cAMP (Epac-spez. cAMP-Analagon)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pulmonale arterielle Hypertonie	1
1.2	Prostazyklin und dessen Analoga	5
1.3	Der Prostazyklin-Rezeptor (IP-Rezeptor)	7
1.4	Die Desensibilisierung des IP-Rezeptors durch repetitive Agonistenstimulation	9
1.5	Stickstoffmonoxid	10
1.6	Die lösliche Guanylatzyklase	11
1.7	Aktivatoren und Stimulatoren der sGc	12
1.8	Phosphodiesterasen	14
1.9	Ziele der Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.2	Zellkultur	18
2.3	cAMP-Bestimmungen	19
2.4	Proteinbestimmung nach Bradford	19
2.5	Western Blot	20
2.6	Proliferationsbestimmung	21
2.7	Expression der PDE3A und PDE3B	22
2.8	Messung der PKA-Aktivität	22
2.9	Statistik	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Konzentrationsabhängige cAMP-Bildung durch Iloprost in humanen pulmonalen Fibroblasten	24
3.2	Die Desensibilisierung des IP-Rezeptors durch Iloprost in humanen pulmonalen Fibroblasten	25
3.3	Expression der PDE3A und PDE3B in humanen pulmonalen Fibroblasten und glatten Muskelzellen	27
3.4	Phosphorylierung des vasodilatator-stimulated phosphoprotein durch Bay 41-2272 in humanen pulmonalen Fibroblasten	28

3.5	Der Einfluss verschiedener PDE-Hemmstoffe und des Bay 41-2272 auf den intrazellulären cAMP-Spiegel in humanen pulmonalen Fibroblasten und humanen pulmonalen glatten Muskelzellen	29
3.6	Einfluss von Iloprost und Bay 41-2272 auf die Aktivität der PKA in humanen pulmonalen Fibroblasten	33
3.7	Einfluss des Bay 41-2272 auf die Proliferation in humanen pulmonalen Fibroblasten	35
3.8	Einfluss des Bay 41-2272 auf die Desensibilisierung des IP-Rezeptors durch Iloprost in humanen pulmonalen Fibroblasten	39
4	Diskussion	41
5	Schlussfolgerungen	48
6	Literatur	50
7	Eidesstattliche Versicherung	64

1. Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) ist definiert als eine chronische Erhöhung des pulmonararteriellen Mitteldrucks auf mehr als 25 mmHg in Ruhe verglichen mit 14 ± 3 mmHg als Normalwert [Gayat et al., 2011].

Die PAH stellt eine lebensgefährliche Erkrankung der kleinen Pulmonararterien bzw. Widerstandsgefäße dar, charakterisiert durch Vasokonstriktion, vaskuläre Proliferation und Remodelling [Morrell et al., 2009; Tuder et al., 2009]. Auch das Vorkommen von Thrombosen im pulmonalen System begünstigt die Entstehung einer PAH [Eddahibi et al., 2002]. Die Proliferation und die Produktion von Extrazellulärmatrix von vaskulären, glatten Muskelzellen und Fibroblasten tragen maßgeblich zum Prozess des Remodelling bei und führen zu Obstruktion, dadurch zu erhöhtem pulmonarvaskulärem Widerstand und letztendlich zu Rechtsherzinsuffizienz bzw. -versagen und zum Tode [Rubin et al., 2007].

Die Einteilung der PAH erfolgt nach der Dana Point Classification (Abb. 1.1) [in Galiè et al., 2009], die im Jahre 2008 auf dem 4th World Symposium on PAH beschlossen wurde. Diese löste die Venedig Classification von 2003 ab. Die Klassifizierung wurde während des 5th World Symposium on PAH 2013 nur gering modifiziert [Simonneau et al., 2013]. Sie richtet sich nach der Pathogenese der Erkrankung. Primäre Formen sind die idiopathische und die familiäre PAH (IPAH und FPAH), alle anderen Formen sind sekundär.

Dana Point Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (2008)

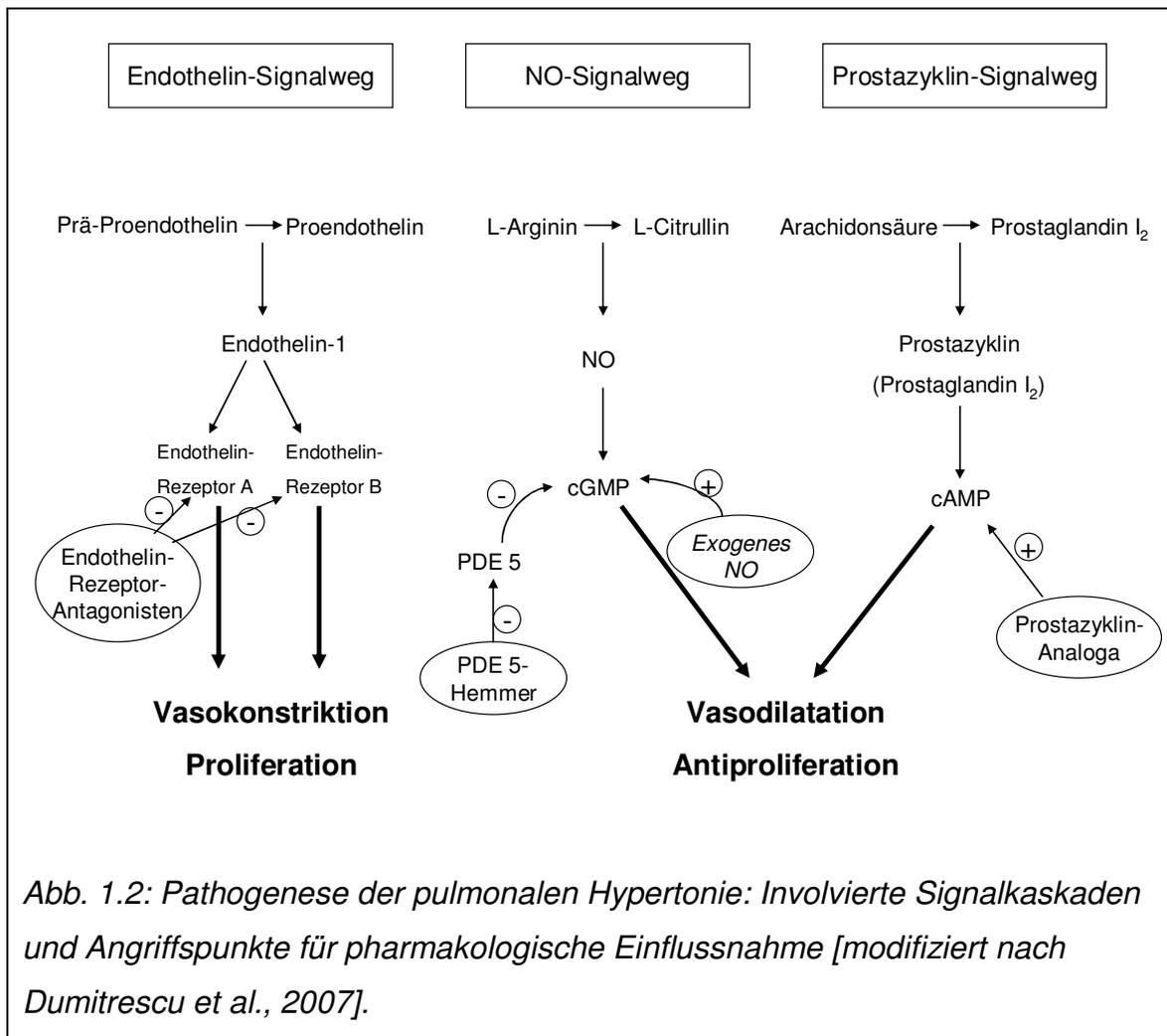
1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
 - 1.1 Idiopathisch
 - 1.2 Familiär
 - 1.2.1. BMPR2
 - 1.2.2. ALK1, Endoglin (mit oder ohne hereditärer hämorrhagischer Teleangiectasie)
 - 1.2.3. unbekannt
 - 1.3 Medikamenten- und Toxininduziert
 - 1.4 Assoziierte PAH (APAH) bei
 - 1.4.1 Kollagenosen
 - 1.4.2 HIV
 - 1.4.3 Portale Hypertonie
 - 1.4.4 Kongenitale Herzkrankheiten
 - 1.4.5 Bilharziose
 - 1.4.6 Chronisch hämolytische Anämie
 - 1.5 Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen
- 1'. pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder pulmonal kapilläre Hämangiomatose (PCH)
2. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des linken Herzens
 - 2.1 Systolische Dysfunktion
 - 2.2 Diastolische Dysfunktion
 - 2.3 Herzklappenerkrankungen (Mitral- oder Aortenklappenfehler)
3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie
 - 3.1 COPD
 - 3.2 Interstitielle Lungenerkrankung
 - 3.3 andere restriktiv und obstruktiv gemischte pulmonale Erkrankungen
 - 3.4 Schlafapnoe-Syndrom
 - 3.5 Alveolärer Hypoventilation
 - 3.6 Chronische Höhenkrankheit
 - 3.7 Anlagebedingte Fehlbildungen
4. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien
5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren u./o. multifaktoriellen Mechanismen
 - 5.1 Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
 - 5.2 Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonare Langerhanszellenhistiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
 - 5.3 Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
 - 5.4 Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronischer Nierenausfall mit Dialyse

Abb. 1.1: Einteilung der pulmonalen Hypertonie nach der Dana Point Klassifikation aus 2008.

An der Pathogenese der idiopathischen PAH, die als eher selten gilt und deren Inzidenz in der europäischen Bevölkerung mit 2,4 Fällen/1.000.000 Einwohner/Jahr angegeben wird [Humbert et al., 2006], sind verschiedene Faktoren beteiligt (Abb. 1.2). Als besonders wichtig gilt das Ungleichgewicht zwischen protektiven und aggressiven Faktoren. So führt sowohl eine herabgesetzte Synthese der natürlichen pulmonalen Vasodilatoren

Prostazyklin und Stickstoffmonoxid (NO), als auch eine Überexpression der Vasokonstriktoren Endothelin und Thromboxan zu Vasokonstriktion und vaskulärer Proliferation der pulmonararteriellen Gefäße [Tuder et al., 2009]. Insbesondere das Ungleichgewicht zwischen Prostazyklin und Thromboxan ist von Bedeutung. Des Weiteren scheinen genetische Faktoren zur Entstehung einer PAH zu prädisponieren. Diskutiert werden Mutationen des Bone-morphogenic-protein-Rezeptors 2 (BMPR2) [Cogan et al., 2005] und der Activin-receptor-like-Kinase 1 (ALK1) [Elliott, 2005; Trembath et al., 2001] sowie die Polymorphismen des Promotors des Serotonin-Transporters (SERT) [Eddahibi et al., 2002]. Die PAH kann als sekundäre Form auch auftreten in Folge verschiedener Erkrankungen, insbesondere des Herzens und der Lunge [Eddahibi et al., 2002].

Die pharmakologischen Therapieoptionen zur Behandlung der PAH verfolgen das Ziel, das Gleichgewicht zwischen vasokonstriktiven und vasorelaxierenden Faktoren günstig zu beeinflussen. Als Möglichkeiten stehen hier Endothelin-Rezeptorantagonisten (Bosentan), Prostazyklinderivate (Iloprost, Beraprost, Epoprostenol) und Inhibitoren der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase (PDE) 5 (Sildenafil) zur Verfügung [Humbert et al., 2004; Benedict et al., 2007; Ghofrani et al., 2009]. Trotz dieses medikamentösen Regimes erfährt ein großer Teil der behandelten Patienten keine oder nur geringe Besserung der Symptome. Daher steht die Kombination von Wirkstoffen mit verschiedenen Angriffspunkten zur Optimierung der Therapie in einigen Studien zur Diskussion [Simonneau et al., 2008; Voswinckel et al., 2008; Barst et al., 2009; Galiè et al., 2009].

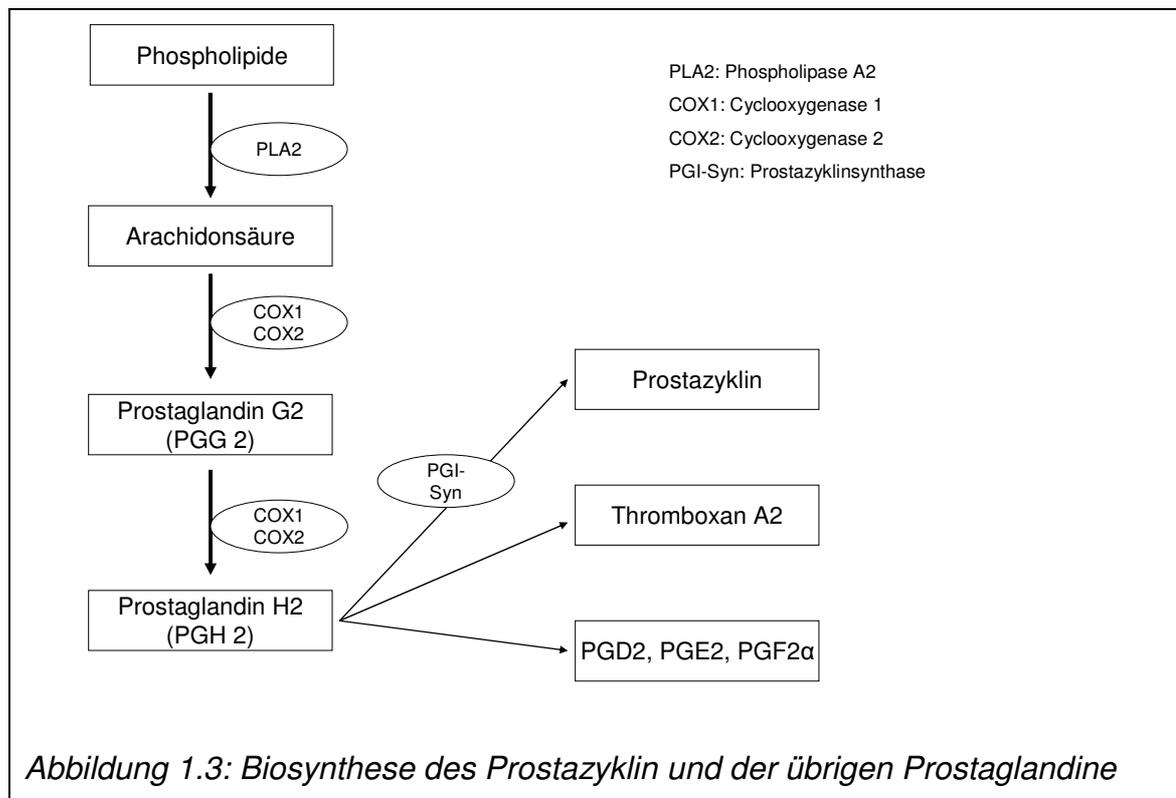


Ein neuerer, vielversprechender Therapieansatz besteht in der direkten pharmakologischen, NO-unabhängigen Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase, sGc) und der damit einhergehenden Erhöhung des intrazellulären cGMP [Stasch et al., 2002, 2009; Evgenov et al., 2006]. In Nordamerika, Japan und inzwischen auch in Europa ist der sGc-Aktivator Riociguat für die Therapie der PAH und der chronisch-thromboembolischen pulmonalen Therapie (CTEPH, siehe auch Abb 1.1) zugelassen.

Auf die genannten Therapieoptionen wird im Folgenden genauer eingegangen. Unbehandelt würde die PAH etwa 2,8 Jahre nach Diagnosestellung zum Tode führen [D'Alonzo et al., 1991].

1.2 Prostazyklin und dessen Analoga

Prostazyklin ist das am häufigsten gebildete Prostanoid (Abb. 1.3), es entsteht in den Endothelzellen [Blanco-Rivero et al., 2005]. Es handelt sich um ein Derivat der Arachidonsäure. Die Arachidonsäure ist Bestandteil der Membranphospholipide. Unter Einwirkung des Enzyms Phospholipase A₂ wird sie aus der Membran freigesetzt und durch die Cyclooxygenase (zwei Unterformen: COX₁, COX₂ [Otto et al., 1995]) über die Zwischenstufe Prostaglandin G₂ zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) metabolisiert. PGH₂ ist die Ausgangssubstanz aller Prostaglandine. Durch verschiedene Enzyme entstehen hieraus die verschiedenen Prostaglandine, ebenfalls das dem Prostazyklin funktionell gegenüberstehende Thromboxan A₂. Prostazyklin wird mit Hilfe des Enzyms Prostazyklin (PGI₂)-Synthase hauptsächlich in Endothelzellen gebildet wird, Thromboxan ist in den Thrombozyten das am häufigsten gebildete Prostaglandin [Tan et al., 2011].



Prostazyklin ruft verschiedene Wirkungen hervor. So konnte eine relaxierende Wirkung auf die Gefäßmuskulatur [Moncada et al., 1976] und eine thrombozytenaggregationshemmende Wirkung [Weiss et al., 1979] gezeigt werden. Weiterhin wird die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen inhibiert [Sinzinger et al., 1987] und Entzündungsprozesse beeinflusst [Schrör et al., 1997]. Aufgrund dieser Eigenschaften zeigt Prostazyklin gute Effekte bezogen auf die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie. Das ebenfalls aus PGH_2 entstehende Thromboxan A_2 kann als funktioneller Antagonist zu Prostazyklin gesehen werden. Seine Hauptwirkungen bestehen in der Vasokonstriktion und der Thrombozytenaggregation.

Es konnten verschiedene Mimetika des Prostazyklin synthetisiert werden, dazu zählen beispielsweise Iloprost, Epoprostenol, Treprostinil und Beraprost. Die verschiedenen Präparate können parenteral (intravenös: Epoprostenol; subkutan: Treprostinil), inhalativ (Iloprost) oder oral (Beraprost) dargereicht werden.

Vorteile der Analoga bestehen in der verlängerten Halbwertszeit, man spricht auch von stabilen Analoga. Prostazyklin weist eine Halbwertszeit von etwa 3-5 Minuten auf, bevor es in eine biologisch inaktive Form hydrolisiert wird [Negishi et al., 1993]. Die Halbwertszeit des Iloprost beträgt 20-30 Minuten [Skuballa et al., 1987].

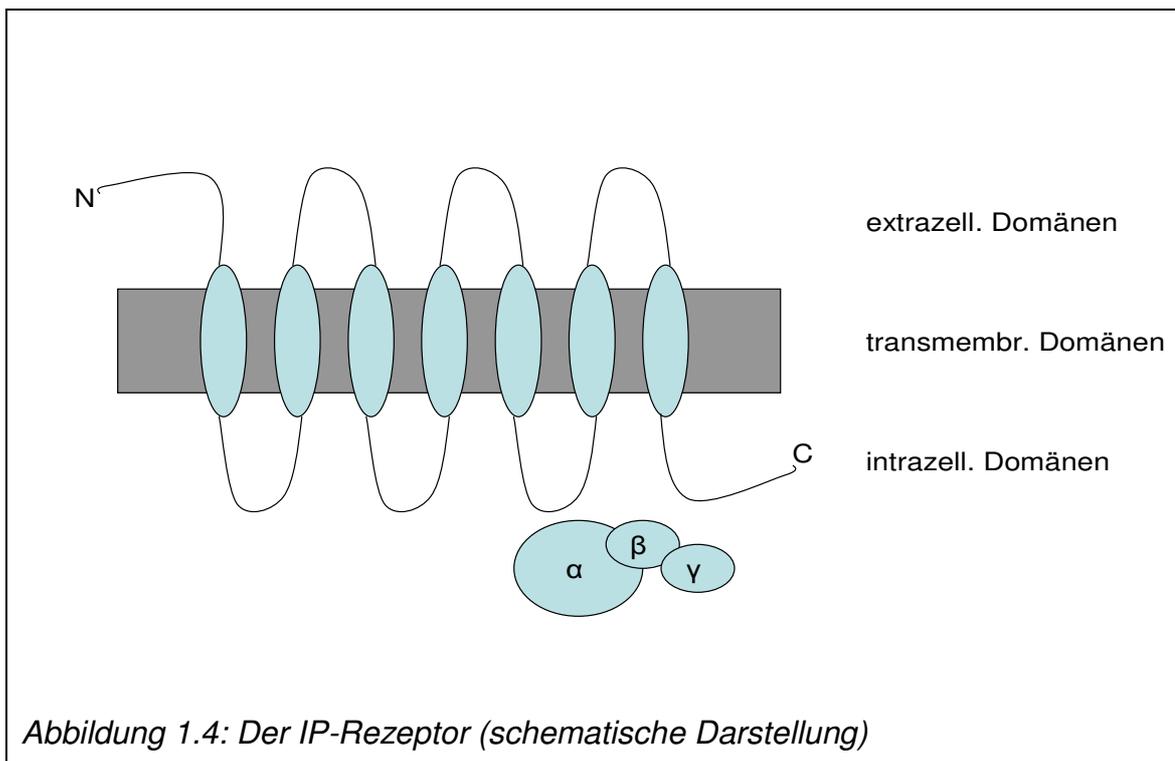
Für das Prostazyklin-Analoga Iloprost konnten in diversen Studien gute Effekte auf die Symptome und die messbaren Parameter bei Patienten mit PAH nachgewiesen werden, die Gehstrecke im 6-Minuten-Gehtest war unter Iloprost verlängert, die Herzfunktion war verbessert und der pulmonalvaskuläre Widerstand konnte reduziert werden [Hoepfer et al., 2000; Olschewski et al., 2000; He et al., 2010]. Eine Senkung des pulmonalarteriellen Drucks konnte durch Iloprost ebenfalls beobachtet werden [Olschewski et al., 2002]. Aufgrund der Applikation als Aerosol ist das Nebenwirkungsspektrum (Kopfschmerzen, gastrointestinale Symptome, Übelkeit, Gesichtsrötung, Hypotonie) nicht so ausgeprägt wie bei systemisch applizierten Prostazyklinen [Ewert et al., 2009].

Iloprost ist ein potenter pulmonaler Vasodilatator, wirkt thrombozytenaggregationshemmend und hemmt den abnormen Remodelling-Prozess bei Patienten mit PAH [Olschewski et al., 1996; Vane et al., 1995;

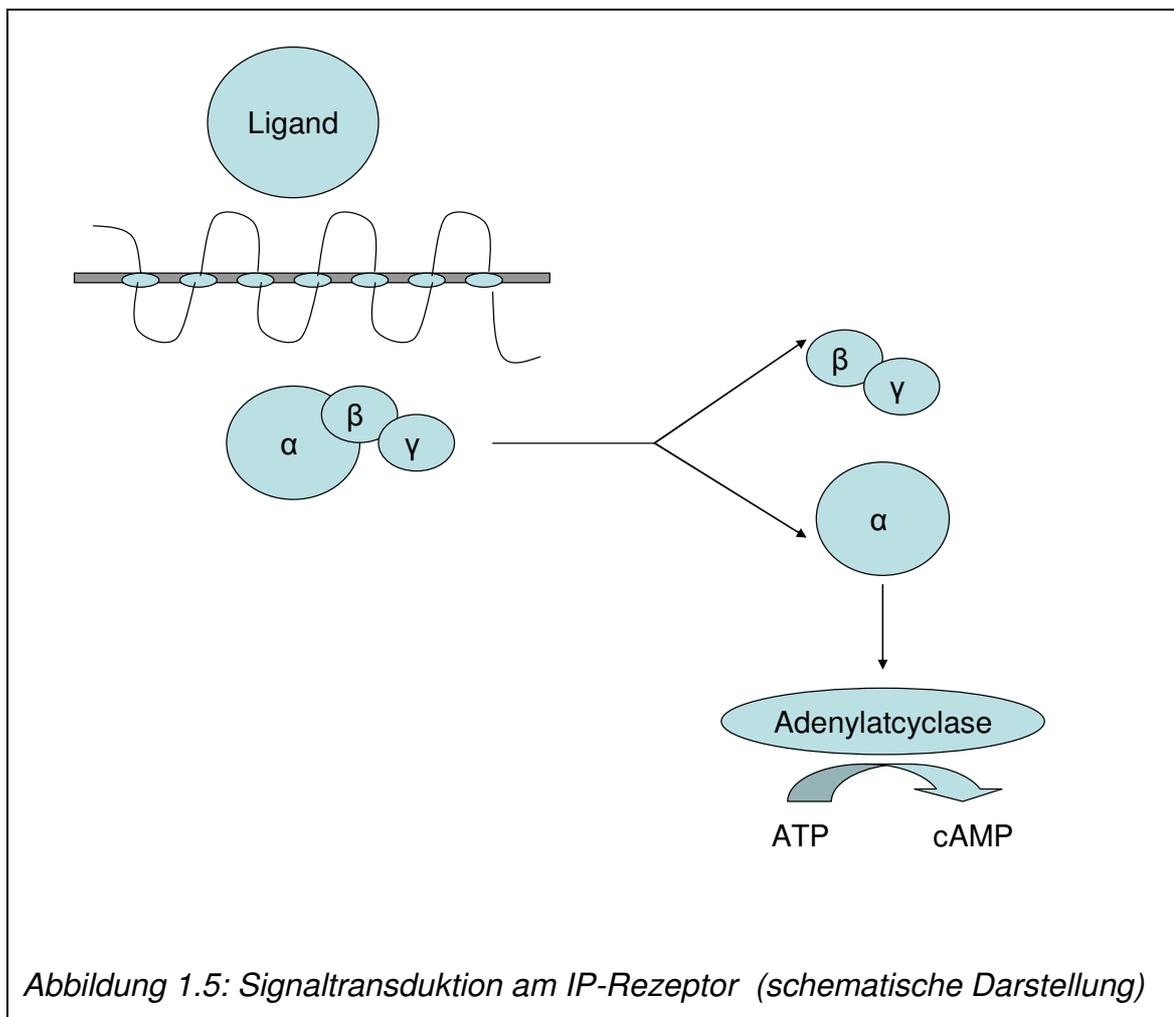
Schermuly et al., 2005]. Die profitable Wirkung bei Patienten während einer Langzeitanwendung konnte in diversen Studien gesichert werden [Hoeper et al., 2000; Olschewski et al., 1999, 2000, 2002].

1.3 Der Prostazyklin-Rezeptor (IP-Rezeptor)

Prostazyklin sowie dessen Analoga wie Iloprost entfalten ihre Wirkung über Bindung an den Prostazyklin-Rezeptor (IP-Rezeptor, IP-R) [Vane et al., 1995]. IP-R gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist funktionell verbunden mit der Adenylatzyklase [Boie et al., 1994; Coleman et al., 1994; Namba et al., 1994]. Der Rezeptor besteht aus sieben die Zellmembran durchziehenden Proteinschleifen (Transmembrandomänen), zwischen denen sich jeweils drei intra- und drei extrazelluläre Proteinschleifen ausbilden (Abb. 1.4). Hierbei bilden die extrazellulären Proteinschleifen den Hormonrezeptor [Narumiya 1999]. Auf der intrazellulären Seite befindet sich der für die Wechselwirkung mit dem Guanosintriphosphat- (GTP) bindenden G-Protein verantwortliche Rezeptorteil. Das G-Protein besteht aus drei Untereinheiten (alpha-, beta- und gamma-Untereinheit).



Nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor kommt es zu einer Freisetzung von gebundenem Guanosindiphosphat (GDP), Wiederanlagerung von GTP und einer Abdissoziation der alpha-Untereinheit von den anderen Untereinheiten [Gilman et al., 1987]. Der Komplex aus alpha-Untereinheit und GTP aktiviert in der Folge die Adenylatzyklase (Abb. 1.5).



Die Bindung eines Agonisten an IP-R führt somit über Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung des intrazellulären zyklischen Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP) [Wise et al., 1996]. cAMP dient als second messenger und aktiviert verschiedene Kaskaden wie die Proteinkinase A (PKA), wodurch eine vaskuläre Relaxation induziert wird [Weber et al., 1998], oder das exchange protein directly activated by cAMP (Epac) [de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998]. Eine Inhibition der zellulären Proliferation ist

sowohl für erhöhte Aktivität von PKA [Koyama et al., 2001] als auch von Epac [Haag et al., 2008] beobachtet worden.

Die zellulären Wirkungen der Ligandenbindung an IP-R werden jedoch nicht nur über die oben dargestellte Signalkaskade bedingt. So konnte gezeigt werden, dass IP-R zu einer Öffnung von Kalium-Kanälen in der Zellmembran führt. Der dadurch bedingte Ausstrom von Kalium aus der Zelle führt zur Hyperpolarisation und resultiert in einem verminderten Kalziumeinstrom. Hieraus resultiert ein gefäßrelaxierender Effekt [Siegel et al., 1991, 1992; Kapural et al., 1997].

1.4 Die Desensibilisierung des IP-Rezeptors durch repetitive Agonistenstimulation

Bei der Langzeitapplikation von Iloprost bei Patienten mit PAH konnte eine Toleranzentwicklung gegenüber dem Wirkstoff beobachtet werden. Aufgrund einer Minderantwort bezüglich Vasodilatation bei repetitiver Stimulation werden stetig ansteigende Dosierungen nötig, um die gewünschten Effekte zu erzielen [Barst et al., 1996; McLaughlin et al., 1998]. In einer experimentellen Studie bei Patienten mit COPD konnte demonstriert werden, dass die vasodilatatorische Antwort auf kontinuierliche Stimulation mit Prostazyklin innerhalb von 24 Stunden signifikant herabgesetzt war [Archer et al., 1996]. Zucker et al. [1998] konnte demonstrieren, dass die antimitotischen Wirkungen des Prostazyklins in koronaren arteriellen Muskelzellen nach 24 Stunden stark vermindert waren.

Die Minderantwort bei Langzeitanwendung geht zurück auf eine Desensibilisierung des IP-R. Es kommt durch repetitive Agonistenbindung zu einer Phosphorylierung – hauptsächlich durch PKC – und anschließender Sequestration und Beseitigung des Rezeptors von der Zelloberfläche [Smyth et al., 1996, 2000; Nilius et al., 2000]. Die Langzeitapplikation von Iloprost bewirkt keine Änderung der Aktivität der Adenylatzyklase oder Phosphodiesterase [Schermuly et al., 2007].

1.5 Stickstoffmonoxid:

Stickstoffmonoxid (NO) wird im menschlichen Organismus aus Endothelzellen freigesetzt [Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987a]. Die endogene Produktion des NO erfolgt durch die sogenannten NO-Synthasen (NOS). Sie sind Katalysatoren der Reaktion von reduziertem Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), L-Arginin und molekularem Sauerstoff zu NO und L-Citrullin (Abb. 1.2) [Hevel et al., 1991; Knowles und Moncada, 1994]. Von den NOS sind drei verschiedene Typen bekannt: die neuronale NOS (nNOS, Typ I), die induzierbare NOS (iNOS, Typ II) und die endotheliale NOS (eNOS, Typ III) [Nathan und Xie, 1994].

Vor der Erkenntnis, dass es sich bei dem freigesetzten Molekül um NO handelt, wurde es aufgrund seiner vasodilatatorischen Effekte als endothelium-derived relaxing factor (EDRF) bezeichnet [Furchgott et al., 1980]. Im vaskulären System reguliert NO den Gefäßtonus (Vasodilatation), die Organdurchblutung und Thrombozytenaggregationshemmung. Weiterhin konnte für endotheliales NO ein Schutz der Gefäßwand vor atherosklerotischen Veränderungen und somit der endothelialen Dysfunktion demonstriert werden [Cai und Harrison, 2000; Lucas et al., 2000].

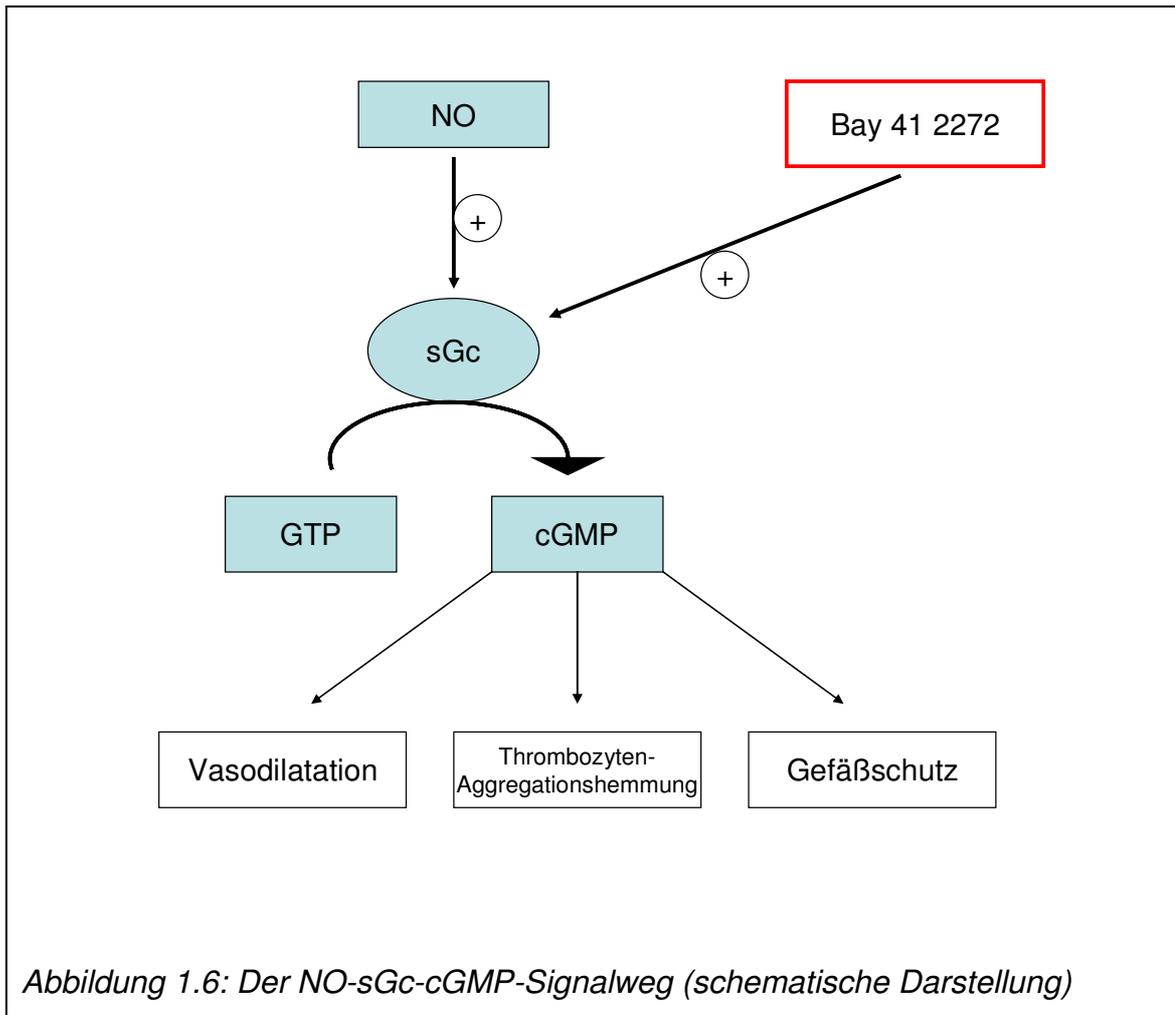
Eine reduzierte Bioverfügbarkeit von sowie ein vermindertes Antwortverhalten auf NO sind an der Entwicklung kardiovaskulärer, pulmonaler, endothelialer, hepatischer und renaler Erkrankungen sowie erektiler Dysfunktion beteiligt [Evgenov et al., 2006]. Die biologische Halbwertszeit des NO wird nur mit wenigen Sekunden angegeben [Wennmalm et al., 1993].

Auf Grund der dargestellten Eigenschaften wird NO schon seit vielen Jahren therapeutisch genutzt, beispielsweise setzt das häufig verwendete Nitroglycerin, welches zur Behandlung hypertensiver Entgleisungen verwendet wird, nach enzymatischer Metabolisierung NO frei.

1.6 Die lösliche Guanylatzyklase:

Die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase, sGc) vermittelt die Effekte des NO. Sie ist ein wichtiger Bestandteil der Regulation diverser physiologischer Prozesse. Hierzu gehören die Thrombozytenaggregationshemmung (Buechler et al., 1994), Vasodilatation (Warner et al., 1994), die neuronale Signaltransduktion sowie die Immunmodulation (Collier et al., 1989; Jaffrey et al., 1995). Sie liegt typischerweise vor als Heterodimer, welches sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzt. Für die humane sGc konnten die Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\beta 2$ identifiziert werden [Denninger et al., 1999; Koesling et al., 1999; Mayer et al., 2001; Zabel et al., 1998]. Innerhalb der sGc existieren drei unterschiedliche Domänen: die N-terminale Hämbindungsdomäne, an dessen Eisen das NO binden kann, die Dimerisierungsdomäne und die C-terminale katalytische Domäne, an der die Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosin 3',5'-Monophosphat (cGMP) stattfindet [Wedel et al., 1995; Pellicena et al., 2004]. NO kann nur dann die sGC aktivieren, wenn die Hämgruppe in reduzierter Form vorliegt. Die Oxidation des zentralen Eisenatoms der Hämgruppe bzw. die Entfernung des Häms haben zur Folge, dass NO die sGC nahezu nicht mehr zu aktivieren in der Lage ist [Ignarro et al., 1986; Foerster et al., 1996].

Eine Aktivierung der sGc führt somit zu einem Anstieg des intrazellulären second messengers cGMP (Abb. 1.6). Die zellulären Effekte des cGMP werden hauptsächlich durch drei verschiedene Effektoren vermittelt. Dies sind cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMP-abhängige Ionenkanäle und cGMP-regulierte Phosphodiesterasen [Hofmann et al., 2006; Beavo et al., 1995]. Die wichtigste Kaskade, die hierdurch aktiviert wird, stellt die Proteinkinase G (PKG) dar [Lucas et al., 2000].



1.7 Aktivatoren und Stimulatoren der sGc:

Ein neuerer, vielversprechender pharmakologischer Ansatz bei PAH stellt die direkte Aktivierung der sGC in Abwesenheit von NO dar. Die direkte, NO-unabhängige Stimulation der sGc führt ebenfalls zu einer Erhöhung des intrazellulären cGMP, welches in in pulmonalen Geweben vasodilatatorische Effekte vermittelt (Abb. 1.6) [Stasch et al., 2002; Evgenov et al., 2006].

1994 begann die Bayer AG in Wuppertal die Suche nach Substanzen, die die Synthese von cGMP stimulieren sollten. Es wurden etwa 20000 Substanzen getestet, schließlich wurden 5-substituierte-2-Furaldehyd-Hydrazone-Derivate entdeckt, diese stimulierten die sGC unabhängig von NO. Es zeigte sich weiterhin eine Wirkungsverstärkung der Substanzklasse unter dem Einfluss von Tageslicht, eine eher unvorteilhafte Eigenschaft eines Herz-Kreislauf-

Medikaments. Ebenfalls 1994 wurde das Indazolderivat YC-1 beschrieben, das eine strukturelle Ähnlichkeit zu der Bayer-Substanzklasse aufweist und durch Erhöhung des cGMP-Spiegels eine Thrombozytenaggregationshemmung bewirkt [Ko et al., 1994]. Bei der weiteren Charakterisierung konnte YC-1 als NO-unabhängiger, jedoch Häm-abhängiger Stimulator der sGC identifiziert werden [Wu et al., 1995; Friebe et al., 1996]. Es zeigte sich jedoch, dass die Wirkstärke des YC-1 eher gering ist und es weiterhin zu einer unspezifischen Inhibition von Phosphodiesterasen (PDEs) führt [Galle et al., 1999]. So wurden ausgehend von YC-1 als Leitsubstanz Substanzen mit größerer Wirkstärke und ohne PDE-Inhibition gesucht. Dies führte zu der Entdeckung der Pyrazolopyridin-Derivate Bay 41-2272 und Bay 41-8543, welche die sGC in einem NO-unabhängigem, jedoch Häm-abhängigem Mechanismus zu stimulieren vermögen [Stasch et al., 2001; Straub et al., 2001]. Sie bilden mit YC-1, sowie den später identifizierten Substanzen CMF-1571 und A-350619 die Klasse der sGC-Stimulatoren [Evgenov et al., 2006]. Gemeinsame Charakteristika sind die NO-unabhängige und selektive Aktivierung der hämhaltigen sGC [Garthwaite et al., 1995; Förster et al., 1996]. In Kombination mit NO zeigen die sGC-Stimulatoren einen synergistischen Effekt [Schmidt et al., 2004]. Aus Bay 41-2272 und Bay 41-8543 wurde zur Verbesserung des pharmakologischen und pharmakokinetischen Profils der sGC-Stimulator Bay 63-2521 (Riociguat) entdeckt. Riociguat konnte in klinischen Studien bei Patienten mit PAH (PATENT-1) sowie chronisch-thromboembolischer pulmonaler Hypertonie (CTEPH, CHEST-1) die 6-Minuten-Gehstrecke verlängern und den pulmonalen Gefäßwiderstand verbessern [Evgenov et al., 2006; Frey et al., 2008; Grimminger et al., 2009; Ghofrani et al., 2013; Archer et al., 2013]. Nach Zulassungen in Kanada, den USA und Japan wurde Riociguat 2014 auch in Europa zur Behandlung der PAH und CTEPH zugelassen.

Von den sGC-Stimulatoren wird die Substanzklasse der sGC-Aktivatoren unterschieden. Gemeinsame Charakteristika dieser Substanzklasse sind, dass sie in Kombination mit NO lediglich einen additiven Effekt auf die Enzymaktivierung ausüben. Weiterhin ist die Aktivierung des oxidierten oder hämfreien Enzyms deutlich stärker verglichen zum hämhaltigen Enzym [Stasch

et al., 2006]. Als wirkstärkster sGC-Aktivator wurde die Substanz Bay 58-2667 identifiziert.

In dieser Arbeit wurde der sGC-Stimulator Bay 41-2272 untersucht. Die Substanz Bay 41-2272 vermittelt durch Aktivierung der sGc systemische und pulmonal-vasodilatatorische Wirkungen und konnte in experimentellen Modellen eine Besserung der PAH bewirken [Dumitrascu et al, 2006; Thorsten et al., 2010], weiterhin konnten positive Effekte in Bezug auf Hypertonie und Herzversagen demonstriert werden. So konnte demonstriert werden, dass Bay 41-2272 einem Bludruckanstieg sowie einer Zunahme des Herzgewichtes bei Ratten, denen zuvor durch Gabe von Angiotensin II eine Hypertension induziert wurde, entgegenwirken konnte [Masuyama et al., 2006]. Auch antiproliferative Wirkungen auf glatte Muskelzellen und eine Inhibition der Plättchenaggregation konnten für das Bay 41-2272 nachgewiesen werden [Stasch et al., 2001; Bawankule et al., 2005; Hobbs et al., 2003; Wu et al., 2004]. So vermochte es in einem experimentellen Ansatz bei neugeborenen Ratten während chronischer Hypoxie das pulmonarvaskuläre Remodelling zu vermindern [Deruelle et al., 2006]. Auch in glatten Muskelzellen konnte ein wachstumshemmendes Potenzial der Substanz nachgewiesen werden [Mendelev et al., 2009; Joshi et al., 2011].

1.8 Phosphodiesterasen:

Phosphodiesterasen (PDE) sind Enzyme, welche die second messenger von Prostazyklin und NO – cAMP und cGMP – durch Hydrolisierung inaktivieren und damit ihre Wirkungen unterbinden [Manganiello et al., 1995; Torphy et al., 1998; Conti et al., 2007].

Verschiedene Familien mit weiteren Unterformen der PDE konnten identifiziert werden [Conti et al., 2007], die in jeweils verschiedenen Geweben exprimiert werden. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist die Fähigkeit, cAMP, cGMP oder beide zu metabolisieren, weiterhin ist die Sensitivität gegenüber selektiven Inhibitoren von Bedeutung [Manganiello et al., 1999; Beavo et al, 1995].

In dieser Arbeit sind die PDE3, PDE4 und PDE5 von Bedeutung. Die PDE3 ist in der Lage, sowohl cAMP, als auch cGMP zu hydrolisieren, PDE4 ist cAMP-spezifisch und PDE5 ist cGMP-spezifisch [Manganiello et al., 1995; Beavo et al., 1995; Conti, 2000; Maurice et al., 2003]. Es existieren verschiedene Inhibitoren der PDEs, die aufgrund ihrer Spezifität gegenüber den einzelnen Isoformen von pharmakologischer Relevanz sind. Zur weiteren Veranschaulichung werden die wichtigsten Unterschiede der PDE3, PDE4 und PDE5 in der folgenden Tabelle kurz dargestellt (Abb. 1.7).

Klasse	Substrat	Isoformen	Gewebe	Inhibition (Beispiel)
PDE3	cAMP cGMP	4	Herz, Lunge, Leber, Thrombozyten, Fettgewebe, Leukozyten	cGMP, Quazinone, Cilostamid, Milrinon
PDE4	cAMP	20	Hoden, Niere, Hirn, Leber, Lunge, Leukozyten	Rolipram, Roflumilast
PDE5	cGMP	3	Gehirn, Lunge, Thrombozyten, glatte Gefäß-muskulatur, Viszeralmuskulatur, Niere	Sildenafil, Vardenafil

Abb. 1.7: Eigenschaften der verschiedenen Phosphodiesterasen [Beavo et al., 1995; Torphy et al., 1998; Fawcett et al. 2000; Boswell-Smith et al., 2006]

In der Therapie der PAH haben selektive Hemmstoffe der PDE5 wie Sildenafil einen großen Stellenwert inne [Humbert et al., 2004]. Sildenafil hemmt die Aktivität der PDE5 und bewirkt so erhöhte Spiegel des cGMP. Diverse Studien demonstrieren die Vorteile einer PDE5-Hemmung bei PAH [Wilkins et al., 2008; Jin et al., 2010].

Das intrazelluläre cAMP wird hauptsächlich durch PDE3 und PDE4 hydrolisiert. Während PDE4 cAMP-spezifisch ist, vermag PDE3 ebenfalls cGMP zu metabolisieren. PDE4 kann durch Rolipram, PDE3 durch Quazinone selektiv

gehemmt werden. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass durch Hemmung der PDE3 eine Senkung des pulmonararteriellen Drucks und pulmonararteriellen Widerstands im Tiermodell der PAH erzielt werden konnte [Matot et al., 2004; Dony et al. 2008]. Weiterhin wurde die Potenzierung der Effekte des Prostazyklin auf das vaskuläre Remodelling [Phillips et al., 2005] und die Verstärkung der vasodilatatorischen Effekte durch inhaliertes Iloprost [Schermuly et al., 2000; 2005] durch Hemmung der PDE3 demonstriert.

Einen weiteren interessanten Gesichtspunkt stellt die Erkenntnis dar, dass PDE3 ebenfalls durch cGMP inhibiert wird [Osinski et al., 2001]. So konnte nachgewiesen werden, dass der PDE5-Inhibitor Sildenafil und NO-Donatoren durch Erhöhung des cAMP via cGMP-abhängiger Hemmung der PDE3 antimitogene Effekte in vaskulären, glatten Muskelzellen induziert [Cornwell et al. 1994; Osinski et al. 2001].

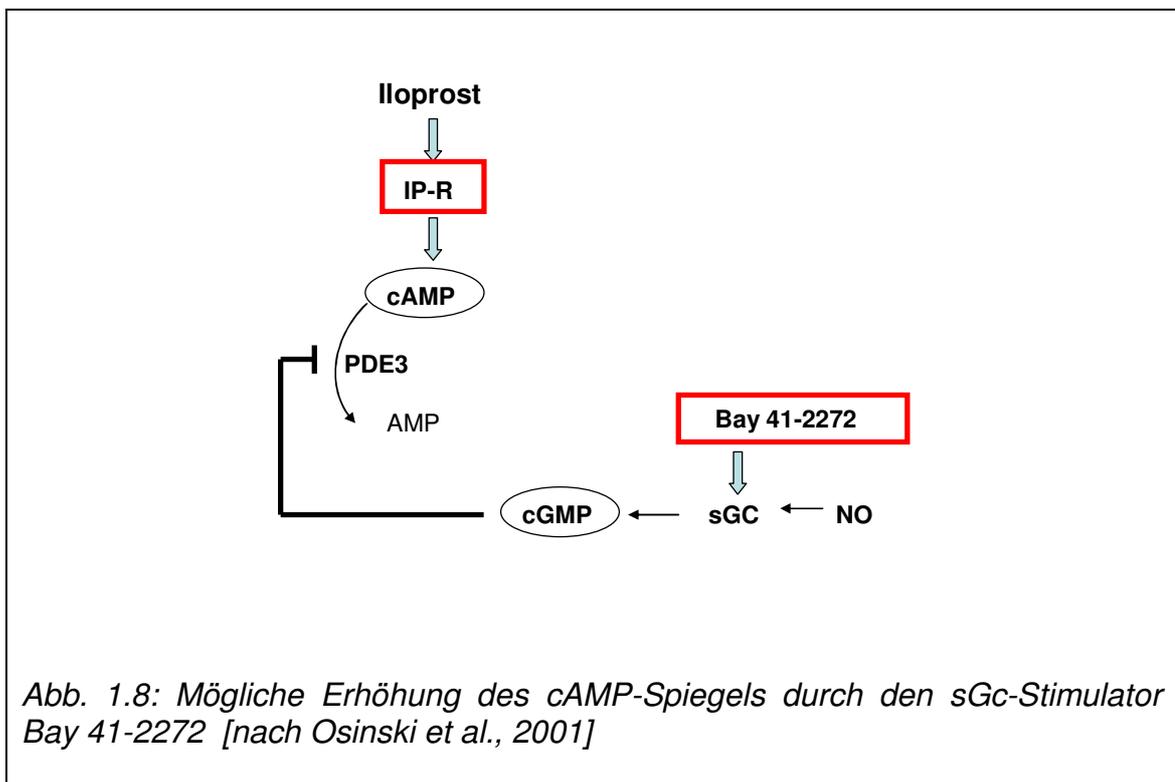
Es ist nicht untersucht worden, ob andere cGMP-hebende Wirkstoffe wie NO-unabhängige Aktivatoren der sGc ebenfalls den intrazellulären cAMP-Gehalt zu erhöhen vermögen.

1.9 Ziele der Arbeit

Die oben beschriebene Desensibilisierung des IP-R (siehe 1.4) wurde in dieser Arbeit genauer untersucht. Anhand von Desensibilisierungskinetiken sollte herausgestellt werden, ob und in welchem Maße die Dauer der Applikation und die Dosierung des Iloprost während der Langzeitapplikation die Desensibilisierung in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen und Fibroblasten beeinflussen.

Weiterhin sollte untersucht werden, inwiefern der Stimulator der sGc Bay 41-2272 via Hemmung der PDE3 durch erhöhtes cGMP das basale und Iloprost-stimulierte cAMP anzuheben vermag (Abb 1.8). Als Voraussetzung musste hierfür zunächst der Nachweis erbracht werden, dass die untersuchten Zellen PDE3 exprimieren.

Zuletzt sollte demonstriert werden, ob Bay 41-2272 Wirkungen über cAMP-spezifische Signalkaskaden vermittelt. Hierfür wurde die DNA-Synthese mittels Einbau von [³H]-markiertem Tritium unter dem Einfluss von Bay 41-2272 bestimmt.



2. Material und Methoden

2.1 Material:

Die humanen pulmonalen Fibroblasten (HPF) und die humanen pulmonalen glatten Muskelzellen (HPSMC) sowie sämtliches Zellmedium wurden von Promocell (Heidelberg, Germany) erworben.

Iloprost wurde freundlicherweise bereitgestellt von Bayer-Schering (Berlin, Germany).

Bay 41-2272 wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Stasch (Bayer health care, Wuppertal, Germany).

Das TRizol stammte von Gibco Life Technologies (Karlsruhe, Germany).

Die Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper stammten von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Die Primer für RT-PCR wurden erworben von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany).

Sämtliche anderen verwendeten Materialien wurden käuflich erworben von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany).

2.2 Zellkultur:

Die HPF wuchsen in Fibroblast Growth Medium 2 und die HPSMC in smooth muscle cell growth medium 2 (Promocell, Heidelberg, Germany). Dem Nährmedium wurde 10 % fetales Kälberserum sowie 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden gezüchtet bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Medium wurde etwa alle drei Tage gewechselt.

2.3 cAMP-Bestimmungen:

Die Zellen wurden in 24-well plates geerntet und wuchsen bis zu 90 %iger Konfluität. Für die Desensibilisierungskinetiken wurde dem Nährmedium Iloprost in angegebener Konzentration (0,1 nM, 0,3 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM) in beschriebenen Zeitabständen (24 h, 8h, 6h, 4h, 2h) vor der Versuchsdurchführung hinzugegeben. Das Nährmedium wurde abgesaugt und es folgte zweimaliges Waschen mit HBSS (1mg/ml BSA, 1mg/ml Glukose, 10 mM HEPES [pH 7,3]). Daraufhin erfolgte die 10-minütige Vorinkubation der Zellen bei 37 °C mit einem Hemmstoff der Phosphodiesterasen: Für die Desensibilisierungskinetiken wurde 1M IBMX als Standard verwendet, für den Vergleich der verschiedenen PDE-Hemmer wurden der PDE3-Hemmstoff Quazinone, der PDE4-Hemmstoff Rolipram oder der Aktivator der löslichen Guanylatzyklase Bay 41-2272 in jeweils angegebener Konzentration verwendet. Nach der 10-minütigen Präinkubation erfolgte die Stimulation durch Iloprost in angegebener Konzentration im Inkubator bei 37 °C. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten gestoppt durch Absaugen des Mediums und Zugabe von eiskaltem 96 %igem Ethanol. Nach Verdampfen des Ethanol im Inkubator erfolgte die Zugabe von 300 µl RIA-Puffer (150 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) und das Einfrieren der Proben bei -80 °C für 24 Stunden. Der cAMP-Gehalt des Überstandes wurde mittels Radioimmunoassay ermittelt. Eine Proteinbestimmung wurde nach der Methode nach Bradford durchgeführt, so dass das Ergebnis als pmol cAMP / mg Protein angegeben werden konnte. Die Kontrollgruppe wurde als 100 % bzw. = 1 gesetzt. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.4 Proteinbestimmung nach Bradford:

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach dem Protokoll von Bradford [Bradford, 1976]. Hierzu wurden jeweils 5 µl des Zelllysates in 200 µl Farbstofflösung (BioRad Coomassie Brilliantblau) gegeben. Mit einem Proteinstandard wurde eine Eichkurve erstellt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde mit dem

Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm die Absorption bestimmt. Mit Hilfe der erstellten Eichkurve konnte die Proteinmenge bestimmt werden.

2.5 Western Blot:

Die Zellen wurden in 6-well plates geerntet und 24 Stunden vor Stimulation mit der zu testenden Substanz gehungert. Es erfolgte eine Stimulation mit Iloprost oder Bay 41-2272 oder einer Kombination beider Substanzen. Nach 10-minütiger Inkubation wurden das Medium abgesaugt und die Zellen lysiert mittels Lysepuffers (Laemmli-Puffer: 50 mM TRIS, pH 7.0, 50 mM DTT, 2 % SDS, 15 % Glycerol, 0.03 % Bromphenolblau). Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen gelöst, kurz sonifiziert und anschließend für fünf Minuten erhitzt bei 95 °C.

Die Aufspaltung der Proteine aus dem Zelllysate erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierzu wurde ein Sammelgel (5 % Acrylamid) auf ein Trenngel (10 % Acrylamid) gegossen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V. Hierzu wurde weiterhin ein Laufpuffer verwendet (0,1 % SDS, 25 mM TRIS-HCl, 250 mM Glycin).

Anschließend erfolgte der Transfer auf eine methanolbenetzte Nylonmembran (PVDF, Immobilon™-P, Millipore, Bedford, MA, USA). Der Transfer erfolgte in einer „Semi-dry“-Blotting-Kammer (BioRad, München) bei 100 mA für eine Stunde. Der Transferpuffer bestand zu 80 % aus Laufpuffer und zu 20 % aus Methanol.

Die Membran wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur geblockt in TBSTM (Tris 25 mM, NaCl 0.5 mM, Tween-20 0.1 % (v/v), Magermilchpulver 5 % (w/v)), dann folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper: die primären Antikörper richteten sich gegen das vasodilatator-stimulated phosphoprotein (VASP). VASP ist ein Protein, welches an drei verschiedenen Stellen phosphoryliert wird (Serin-157, Serin-239 und Threonin-278). Die Phosphorylierung an Serin-157 ist PKA-abhängig und führt zu einem Shift des Molekulargewichts von 46 kDa zu 50 kDa. Die Phosphorylierung an Serin-239 ist PKG-abhängig [Reinhard et al., 2001; Butt et al., 1994; Smolenski et al., 1998]. Die verwendeten Antikörper

waren Anti-VASP-total gegen die phosphorylierte und unphosphorylierte Variante und Anti-VASP-P-Ser239, welches spezifisch die PKG-abhängig phosphorylierte Form detektiert (jeweils erworben von Alexis Biochemicals, Lörrach, Germany). Anschließend wurde die Membran drei mal gewaschen mit TBS + 0,1 % Tween-20, daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:3000 in TBSTM) über eine Stunde bei Raumtemperatur. Zuletzt wurden die entstandenen Banden sichtbar gemacht durch 5-minütige Inkubation mit einer Detektionslösung (ECL, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) und Auflegen eines Röntgenfilmes.

2.6 Proliferationsbestimmung:

Die Zellen wurden geerntet in 24-well plates und 48 Stunden vor der Versuchsdurchführung durch serumfreies Medium gehungert. Die Präinkubation mit den PKG-Inhibitoren DT-2 und DT-3 oder dem PKA-Inhibitor PKI_{myr} erfolgte für 10 Minuten, daraufhin wurden die Zellen mit Iloprost, Bay 41-2272, einer Kombination beider Substanzen, dbcAMP oder 8-pCTP-2'-O-Me-cAMP stimuliert. Nach einer Zeitspanne von 10 Minuten wurde dem Medium 10 ng/ml PDGF (Isoform BB, Sigma, Deisenhofen, Germany) zugegeben. Nach Ablauf von 20 Stunden wurde [³H]-markiertes Thymidin (1 μCi/ml; DuPont, Bad Homburg, Germany) in das Medium gegeben und nach Ablauf weiterer 4 Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimalig gewaschen mit 1 ml eiskaltem PBS, dann mit 0,3 ml eiskalter Perchlorsäure (0,3 M) und nochmals mit PBS. Die Zellen wurden darauf in Lösung gebracht mit 0,3 ml NaOH (0,1 M) bei 37 °C für 30 Minuten. Der Einbau des [³H]Thymidin konnte durch Flüssigkeitsszintillations-Spektroskopie bestimmt werden und erlaubte Rückschlüsse auf die proliferativen Effekte der zu testenden Substanzen. Jede Probe wurde hierbei mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und vermessen. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.7 Expression der PDE3A und PDE3B

RNA aus den humanen pulmonalen glatten Muskelzellen und Fibroblasten wurde präpariert mittels Trizol-Reagenz (Gibco, Karlsruhe, Germany) den Anweisungen des Herstellerprotokolls folgend. Die RNA wurde spektrophotometrisch quantifiziert. Die RT-PCR für PDE3A und PDE3B wurde durchgeführt mittels Qiagen One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Hierbei wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Die verwendeten Primer waren: PDE3A sense (5'CAACACTGTGTGTGTGTGTG3'), PDE3A antisense (5'CAAGTGGTGCATAGC-AGTAA3'), PDE3B sense (5'GATGAAGAAGCAAAT-CTTGG3') PDE3B antisense (5'TTCTCCACCTGCAGTTTATT3'). Für die semiquantitative Analyse wurde GAPDH um die folgenden Primer erweitert: sense (TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA); antisense (TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT).

Nach reverser Transkription für 30 Minuten bei 42 °C und einem Denaturierungsschritt für 5 Minuten bei 95 °C, wurden folgende thermale Schritte durchgeführt: 1 Minute bei 95 °C, 1 Minute bei 55 °C, 1 Minute bei 72 °C (30 Zyklen) und eine letzte Elongation bei 72 °C für 15 Minuten.

2.8 Messung der PKA-Aktivität

Die Beurteilung der Aktivität der PKA erfolgte durch Benutzung eines nicht-radioaktiven Proteinkinase Assay-Kits (assay designs, Ann Arbor, USA). Die subkonfluent gewachsenen Zellen wurden stimuliert durch Bay 41-2272, Iloprost oder eine Kombination beider Substanzen für 30 Minuten. Danach wurden die Zellen lysiert durch Zugabe eines Lysepuffers (20 mM MOPS, 50 mM β -Glycerolphosphat, 50 mM Natriumfluorid, 1 mM Natriumvanadat, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1% NP40, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM Benzamidin, 1 mM Phenylmethansulphonylfluorid (PMSF), 10 μ g/ml Leupeptin and 10 μ g/ml Aprotinin) für 10 Minuten. Danach wurden die Zellen kurz sonifiziert und

zentrifugiert bei 13.000 g für 15 Minuten bei 4°C. Die PKA-Aktivität im Überstand wurde dem Herstellerprotokoll folgend mittels ELISA ermittelt.

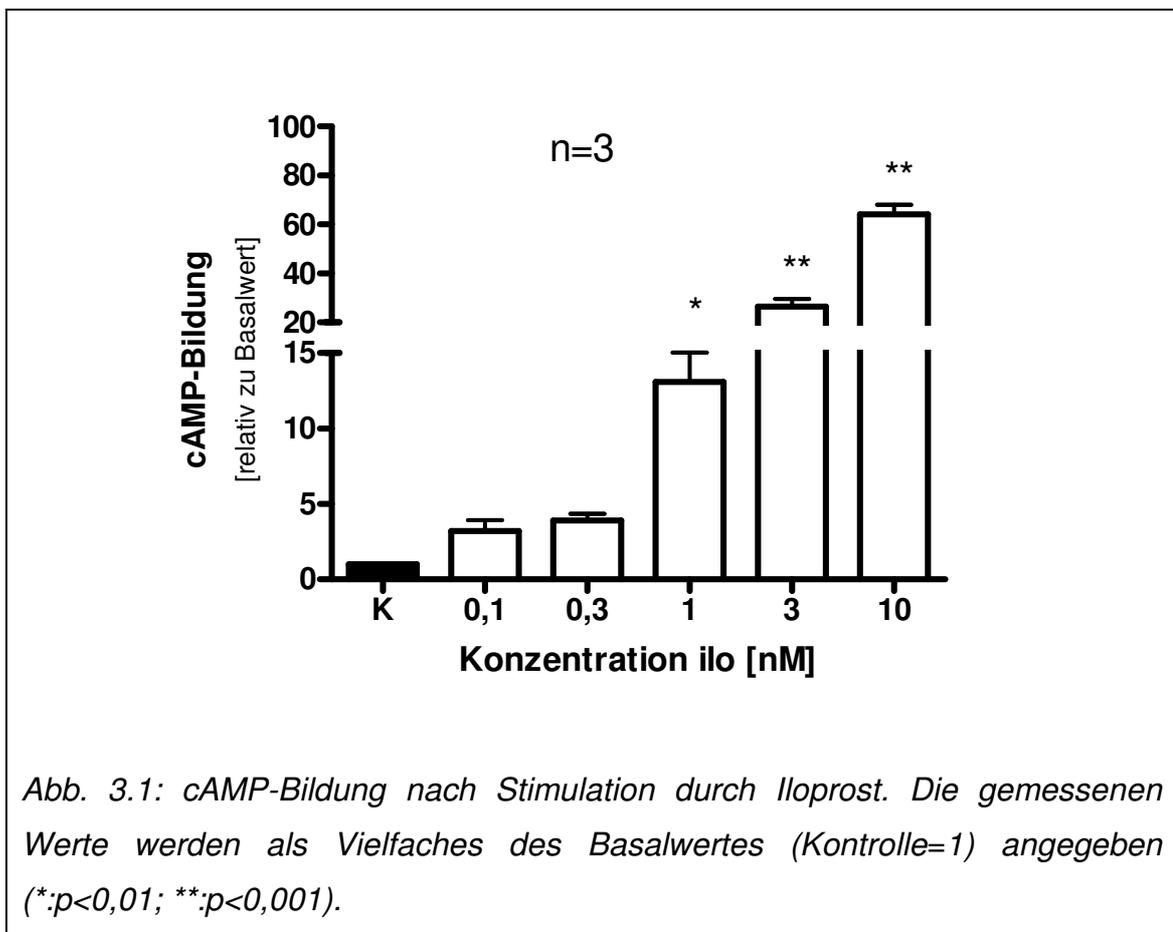
2.9 Statistik:

Die gemessenen Daten wurden angegeben als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der jeweiligen Anzahl (n) der Experimente. Die statistische Analyse erfolgte durch *one-way analysis of variance* gefolgt von *Bonferroni's multiple comparisons test*. $P < 0.05$ wurde als signifikant angesehen. Das verwendete Programm war GraphPadPrism 4.0.

Bei Western blots wurde jeweils ein repräsentativer blot von mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen mit entsprechendem Ergebnis abgebildet.

3. Ergebnisse

3.1 Konzentrationsabhängige cAMP-Bildung durch Iloprost in humanen pulmonalen Fibroblasten

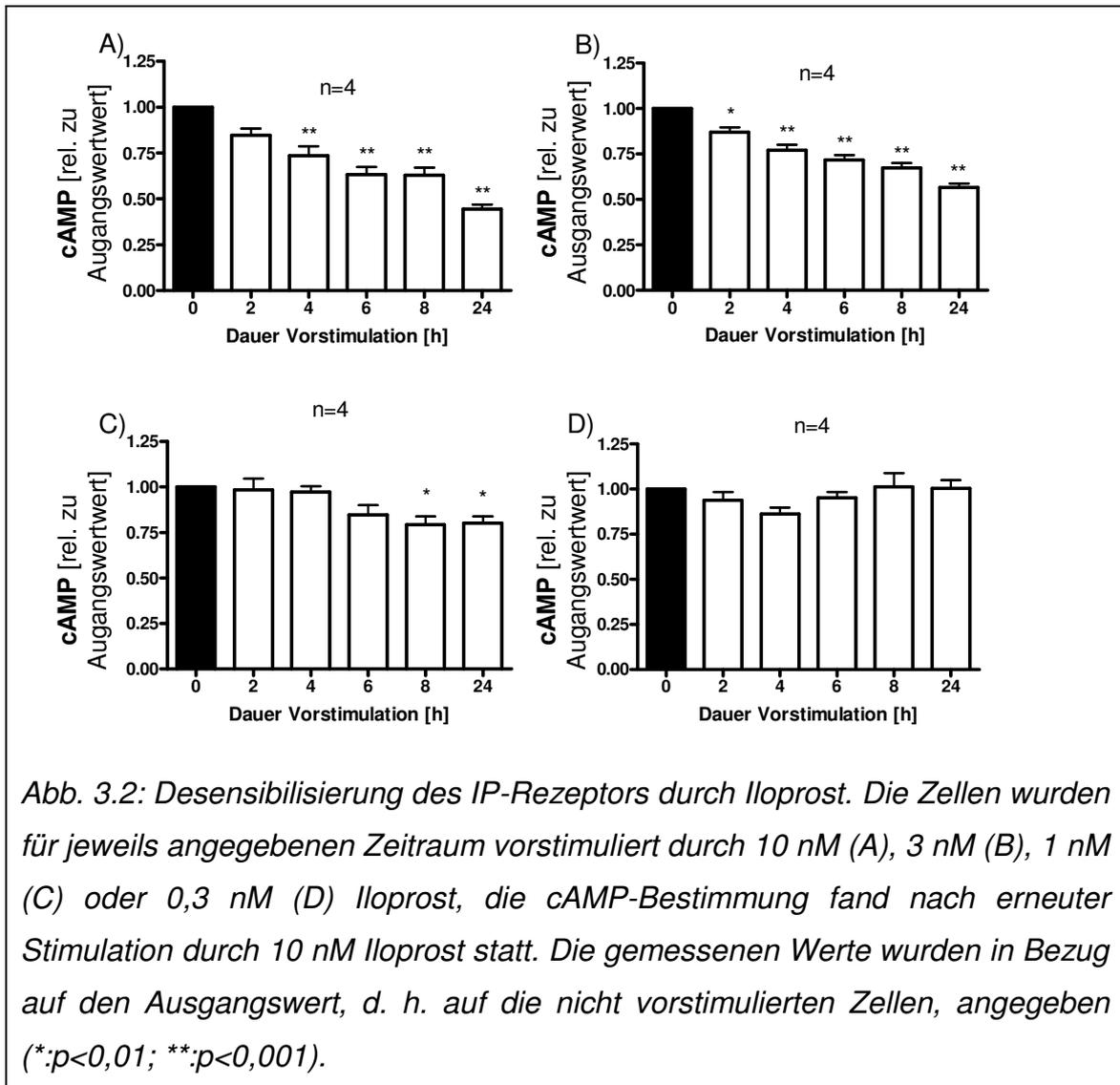


Zur Analyse der Effektivität des Iloprost wurde die Substanz in ansteigenden Konzentrationen verabreicht und der cAMP-Spiegel nach 10-minütiger Inkubation bestimmt. Die Zellen wurden zuvor für einen Zeitraum von 10 Minuten durch IBMX vorinkubiert.

Iloprost führt selbst in sehr kleinen Konzentrationen noch zu einem nachweisbaren Anstieg des cAMP. Dieser Anstieg lässt sich auch bei Stimulation durch 0,1 – 0,3 nM Iloprost zeigen.

3.2 Die Desensibilisierung des IP-Rezeptors durch Iloprost in humanen pulmonalen Fibroblasten

Hierzu wurden die Zellen für verschiedene Zeiträume (24 h, 8 h, 6 h, 4 h, 2 h) mit Iloprost in verschiedenen Konzentrationen (0,1 – 10 nM) vorinkubiert. Die cAMP-Bildung wurde nach einer erneuten Stimulation durch 10 nM Iloprost bestimmt (Abb. 3.2).



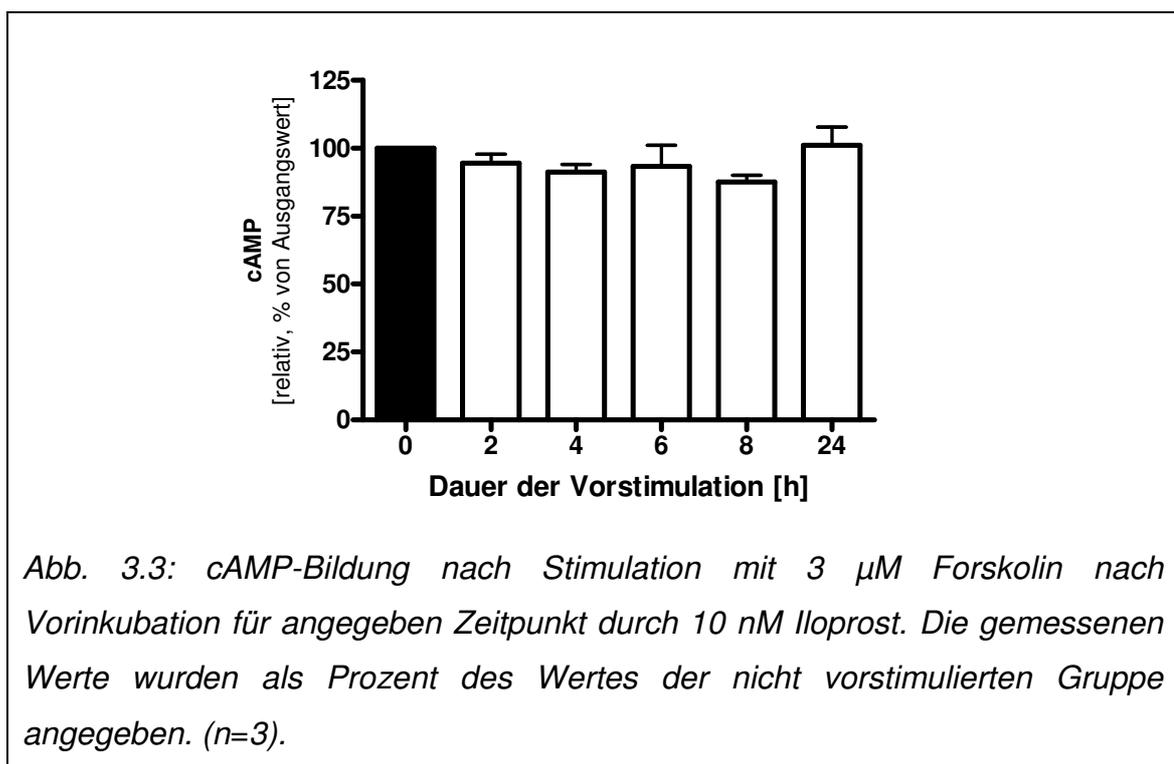
Bei den durch Iloprost vorstimulierten Zellen ließ sich im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen eine verminderte Antwort auf erneute Iloprostgabe zeigen. Diese verminderte Bildung von cAMP war umso gravierender, desto höher die Konzentration der Vorstimulierung gewählt wurde: Die Zellen, die durch hohe Dosen vorstimuliert wurden (3 oder 10 nM), zeigten eine stark verminderte Reaktion auf die Stimulation, diese Minderantwort war bei den

durch 1 nM Iloprost vorstimulierten Zellen nicht so stark ausgeprägt und bei den durch die niedrigeren Konzentrationen vorinkubierten Zellen (0,1 oder 0,3 nM) waren keine Zeichen der Minderantwort mehr nachweisbar.

Weiterhin ließ sich eine Abhängigkeit von der Dauer der Vorstimulation erkennen: Desto länger die Vorinkubation stattfand, desto geringer fiel die Antwort auf erneute Stimulation aus.

In diesen Versuchen ließ sich eindeutig die Abhängigkeit des Ausmaßes der Desensibilisierung sowohl von der Dauer der Stimulation als auch von verabreichten Dosis des Stimulus nachweisen.

Im weiteren Verlauf sollte der Nachweis erbracht werden, dass die Desensibilisierung auf Rezeptorebene stattfindet. Hierzu wurden die Zellen für den angegebenen Zeitraum durch 10 nM Iloprost vorinkubiert und anschließend stimuliert durch den Aktivator der Adenylatzyklase Forskolin (Abb. 3.3).



Durch Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin lässt sich keine Änderung der Reizantwort bei durch Iloprost vorstimulierten Zellen im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen nachweisen.

Dies lässt darauf schließen, dass der Grund für die verminderte cAMP-Bildung nach längerer Iloprostapplikation auf Rezeptorebene liegt.

3.3 Expression der PDE3A und PDE3B in humanen pulmonalen Fibroblasten und glatten Muskelzellen

Im weiteren erfolgten Versuche, um den basalen bzw. den Iloprost-induzierten cAMP-Spiegel zu erhöhen bzw. zu stabilisieren. Hierzu wurde der Aktivator der löslichen Guanylatzyklase Bay 41-2272 untersucht. Dieser sollte über erhöhtes cGMP und einer daraus resultierenden Hemmung der PDE3 ebenfalls Einfluss auf den cAMP-Gehalt ausüben. Zunächst erfolgte hierfür der Nachweis, dass die humanen pulmonalen Fibroblasten und glatten Muskelzellen PDE3 exprimieren.

PDE3, die spezifisch cAMP hydrolysiert, kommt als zwei verschiedene Isoformen vor, PDE3A ("cardiovascular type") und PDE3B ("adipocyte type") [in Chung, 2006].

Durch RT-PCR konnte gezeigt werden, dass sowohl die humanen pulmonalen Fibroblasten, als auch die humanen pulmonalen glatten Muskelzellen mRNA beider Isoformen, der PDE3A sowie der PDE3B, exprimieren (Abb. 3.4.A).

Ferner konnte per Western blot gezeigt werden, dass beide Zelltypen PDE3A- und PDE3B-spezifische Proteine exprimieren (Abb. 3.4.B).

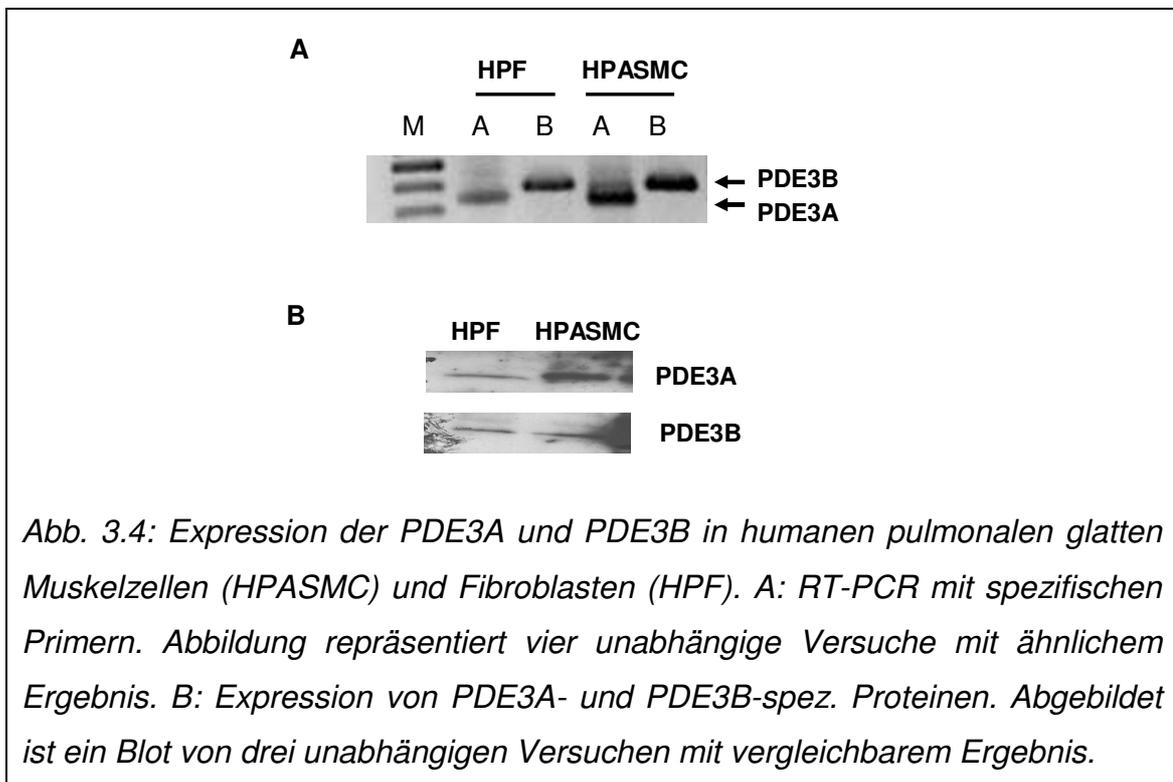
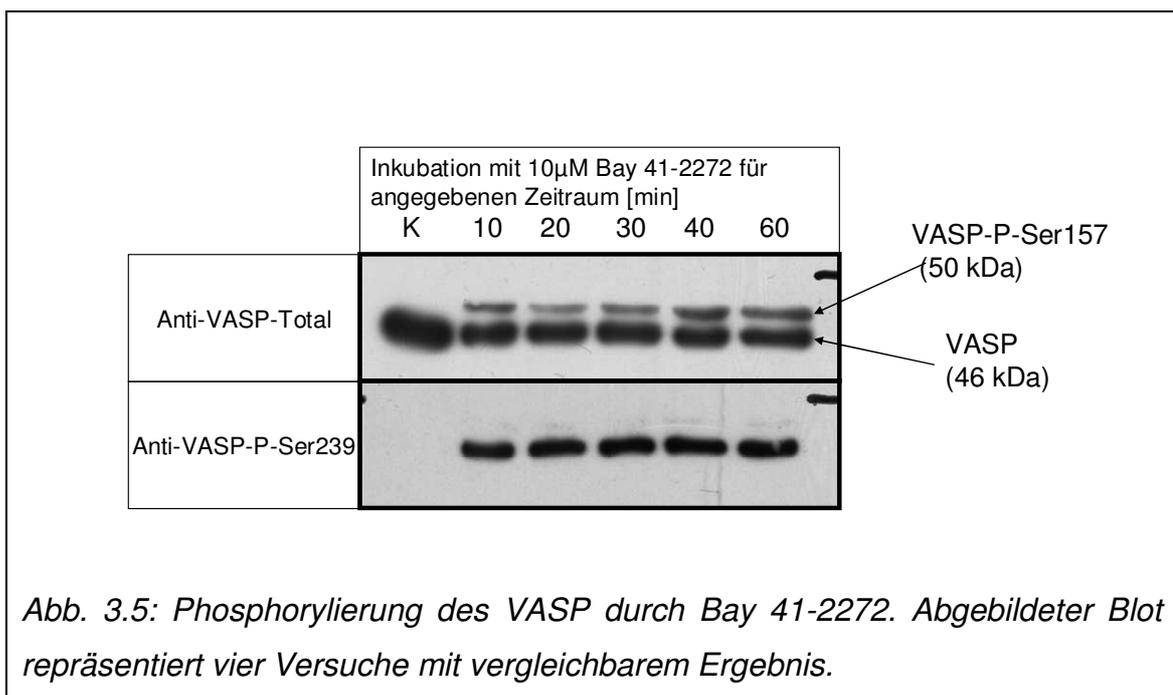


Abb. 3.4: Expression der PDE3A und PDE3B in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen (HPASMC) und Fibroblasten (HPF). A: RT-PCR mit spezifischen Primern. Abbildung repräsentiert vier unabhängige Versuche mit ähnlichem Ergebnis. B: Expression von PDE3A- und PDE3B-spez. Proteinen. Abgebildet ist ein Blot von drei unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis.

3.4 Phosphorylierung des vasodilatator-stimulated phosphoprotein durch Bay 41-2272 in humanen pulmonalen Fibroblasten

Das vasodilatator-stimulated phosphoprotein (VASP) ist ein Protein, welches an drei verschiedenen Stellen phosphoryliert wird (Serin-157, Serin-239 und Threonin-278). Die Phosphorylierung an Serin-157 ist PKA-abhängig und führt zu einem Shift des Molekulargewichts von 46 kDa zu 50 kDa. Die Phosphorylierung an Serin-239 ist PKG-abhängig. Die verwendeten Antikörper waren Anti-VASP-Total und Anti-VASP-P-Ser²³⁹ gegen die durch PKG phosphorylierte Form.

Zunächst wurden die Eigenwirkungen des Bay 41-2272 untersucht. Hierbei wurden die Zellen für den angegebenen Zeitraum mit 10 µM Bay 41-2272 stimuliert und anschließend der Western blot durchgeführt (Abb. 3.5).

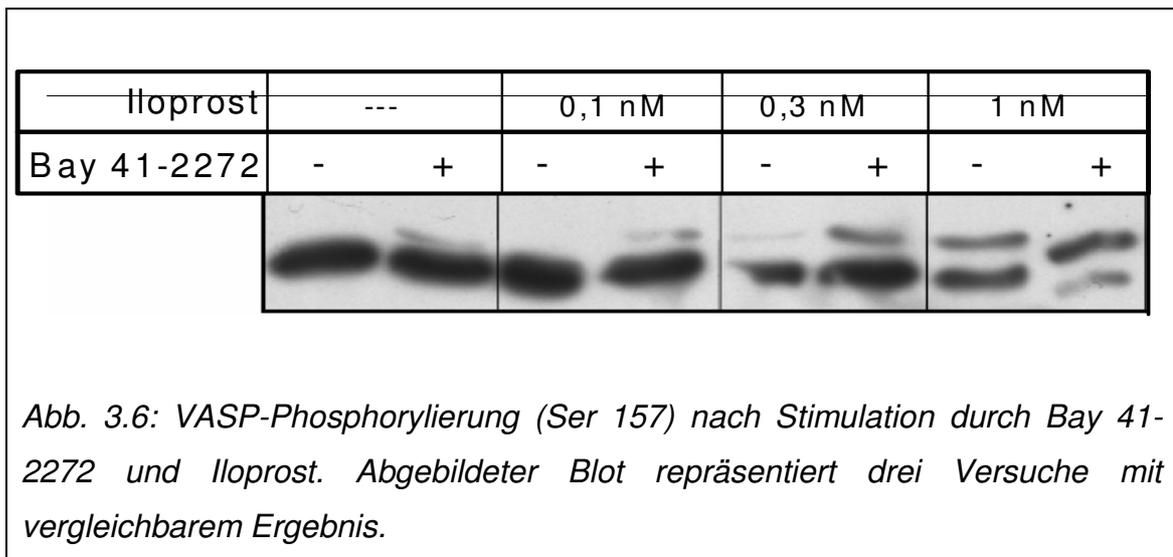


Es konnte gezeigt werden, dass Bay 41-2272 zum einen durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase zu erhöhten cGMP-Spiegeln führt. Dies wird angezeigt durch an Serin239 phosphoryliertes VASP, welches auf erhöhte Aktivität der PKG schließen lässt.

Weiterhin führte die Stimulation durch Bay 41-2272 zu einem Shift einer gewissen Proteinmenge von 46 kDa auf 50 kDa. Dieser Shift ist auf eine

Phosphorylierung an Serin157 zurückzuführen. Da diese Phosphorylierung PKA-abhängig ist, lässt sie auf erhöhte cAMP-Spiegel durch Bay 41-2272 schließen.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von Bay 41-2272 auf die Iloprost-vermittelte VASP-Phosphorylierung untersucht. Hierbei wurden die Zellen 10 Minuten mit 10 μ M Bay 41-2272 vorinkubiert und dann 10 Minuten mit Iloprost (0,1-1 nM) stimuliert. Auch hier konnte gezeigt werden, dass durch Gabe von Bay 41-2272 das Verhältnis von PKA-spezifisch phosphoryliertem zu unphosphoryliertem VASP klar zu Gunsten des phosphoryliertem VASP verschoben wird (Abb.3.6).

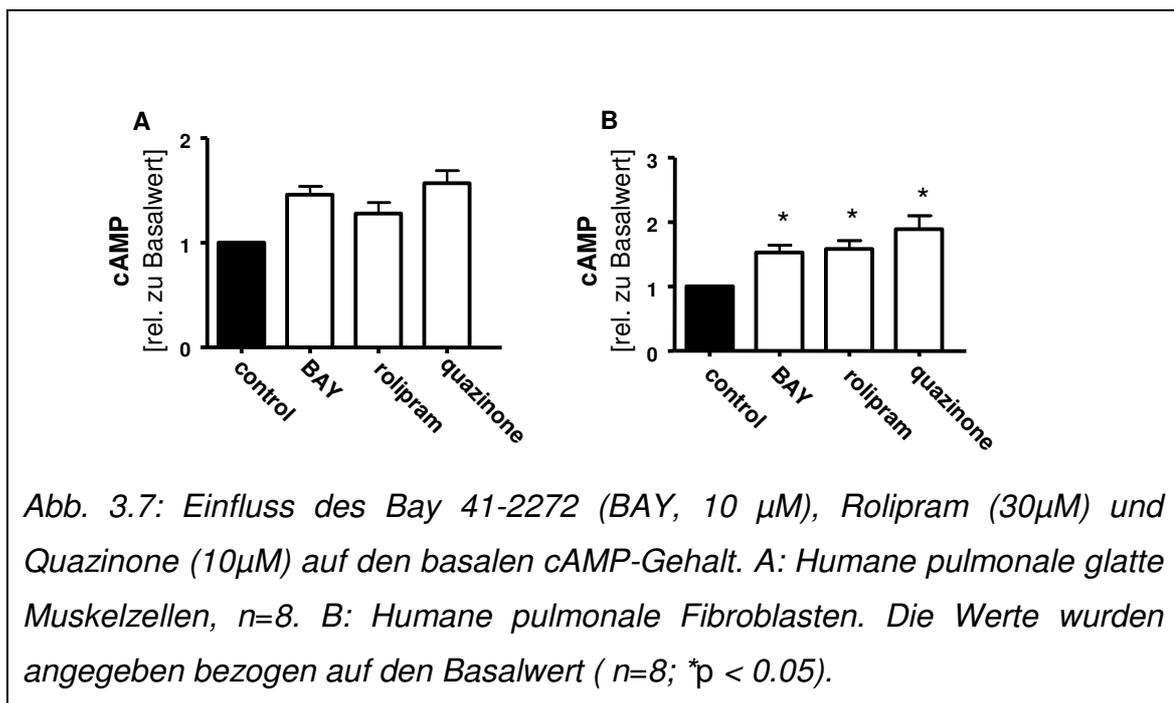


3.5 Der Einfluss verschiedener PDE-Hemmstoffe und des Bay 41-2272 auf den intrazellulären cAMP-Spiegel in humanen pulmonalen Fibroblasten und humanen pulmonalen glatten Muskelzellen

Im folgenden sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß verschiedene Hemmstoffe der PDE sowie der Aktivator der löslichen Guanylatzyklase Bay 41-2272 in der Lage sind, den basalen bzw. den Iloprost-induzierten cAMP-Gehalt von humanen pulmonalen Fibroblasten und glatten

Muskelzellen zu beeinflussen. Hierzu wurden der PDE3-Hemmer Quazinone, der PDE4-Hemmer Rolipram sowie Bay 41-2272 untersucht.

Die Zellen wurden durch die oben angegebenen Substanzen in angegebener Konzentration für einen Zeitraum von 10 Minuten stimuliert, danach wurde Iloprost (1 nM oder 10 nM) hinzugegeben und der cAMP-Gehalt bestimmt (Abb. 3.7 und 3.8).



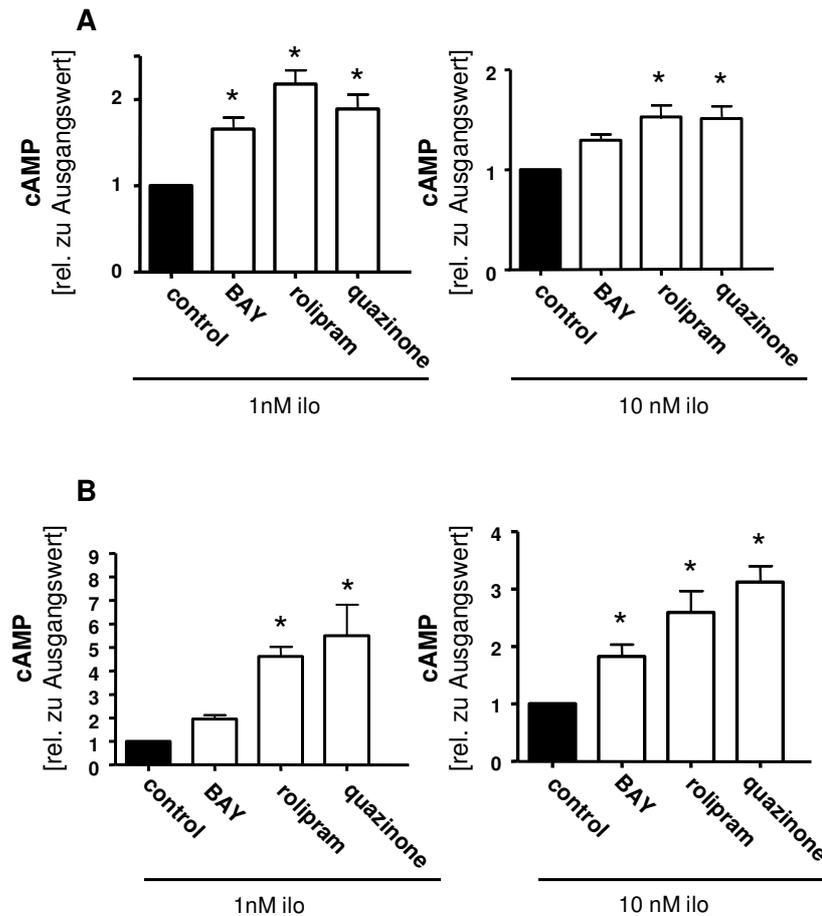


Abb. 3.8: Einfluss des Bay 41-2272 (BAY, 10 μ M), Rolipram (30 μ M) und Quazinone (10 μ M) auf den durch Iloprost (ilo, 1 oder 10 nM) stimulierten cAMP-Gehalt. Die gemessenen Werte wurden angegeben bezogen auf die Kontrollgruppe. A: Humane pulmonale glatte Muskelzellen, n=6. B: Humane pulmonale Fibroblasten, n=6. . *p < 0.05.

Zur Bestimmung der Rolle der PDE3 und PDE4 auf den intrazellulären cAMP-Gehalt in humanen pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (HPASMC) wurde zunächst der Einfluss einer Hemmung der verschiedenen PDEs analysiert. Der PDE3-selektive Hemmstoff Quazinone (10-minütige Inkubation, 10 μ M) führte in HPASMC verglichen mit einer unstimulierten Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg des basalen cAMP auf das $1,6 \pm 0,12$ -fache (n=8). Hiermit vergleichbar führte auch der PDE4-selektive Hemmstoff Rolipram (10-minütige Inkubation, 30 μ M) zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels auf das $1,3 \pm 0,10$ -fache (n=8). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die PDE3 als auch die PDE4 effektiv am Abbau des cAMP in HPASMC beteiligt sind (Abb. 3.7.A).

Weiterhin wurde überprüft, ob Bay 41-2272 durch eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und erhöhtes cGMP und daraus resultierender Hemmung der PDE3 in der Lage ist, einen messbaren Anstieg des basalen cAMP zu induzieren. Auch Bay 41-2272 (BAY, 10-minütige Inkubation, 10 μ M) erhöhte das intrazelluläre cAMP in HPASMC um das $1,5 \pm 0,1$ -fache (n=8) verglichen mit einer unstimulierten Kontrollgruppe (Abb. 3.7.A), vergleichbar mit den Werten durch direkte Hemmung der PDE3 durch Quazinone.

Die gewonnenen Ergebnisse ließen sich ebenfalls mit humanen pulmonalen Fibroblasten (HPF) reproduzieren (Abb. 3.7.B). Alle getesteten Substanzen führten bei gleicher Versuchsanordnung auch in HPF zu einem Anstieg des basalen cAMP, für Bay 41-2272 um das $1,6 \pm 0,1$ -fache (n=8), für Rolipram um das $1,6 \pm 0,1$ -fache (n=8) und für Quazinone um das $1,9 \pm 0,1$ -fache (n=8).

Es wurde schon früher gezeigt, dass die vasodilatatorischen Effekte durch Iloprost durch eine Kombination mit Hemmung der PDE3/4 verstärkt werden können [Schermuly et al., 2002, 2005]. Es wurde diesem Ansatz folgend verglichen, inwiefern Rolipram, Quazinone und Bay 41-2272 Einfluss auf den cAMP-Gehalt in Anwesenheit von Iloprost ausüben. Die HPASMC und HPF wurden für 10 Minuten präinkubiert durch Rolipram (30 μ M), Quazinone (10 μ M) oder Bay 41-2272 (10 μ M) und anschließend mit Iloprost (1 nM, 10 nM) stimuliert.

In HPASMC führte die Stimulation durch 1 nM Iloprost in Abwesenheit jeglicher PDE-Hemmstoffe zu einem signifikanten Anstieg der cAMP-Konzentration auf das $2,29 \pm 0,17$ -fache gegenüber unstimulierten Zellen (n=5). Durch Präinkubation durch den PDE3-selektiven Hemmstoff Quazinone und anschließende Stimulation durch 1 nM Iloprost wurde gegenüber nur durch Iloprost stimulierte Zellen eine Erhöhung des cAMP-Spiegels um das $1,89 \pm 0,17$ -fache (n=5) beobachtet (Abb. 3.8.A). Eine ähnliche Steigerung des cAMP wurde durch Präinkubation der HPASMC durch den PDE4-selektiven Hemmstoff Rolipram vor Iloprostgabe (1 nM) erreicht. Verglichen mit nur durch Iloprost stimulierten Zellen betrug das cAMP das $2,18 \pm 0,16$ -fache (n=6, Abb. 3.8.A). Auch eine Ko-Stimulation mit Bay 41-2272 führte zu einem signifikanten Anstieg des cAMP-Gehaltes um das $1,66 \pm 0,13$ -fache (n=6, Abb. 3.8.A).

Diesen Versuchsanordnungen entsprechend wurden die gleichen Ko-Stimulationen in Anwesenheit von 10 nM Iloprost durchgeführt (Abb. 3.8.A). Die Ergebnisse entsprachen denen bei 1 nM Iloprost: Quazinone führte zu einem $1,71 \pm 0,14$ -fachen, Rolipram zu einem $1,76 \pm 0,17$ -fachen und Bay 41-2272 zu einem $1,34 \pm 0,07$ -fachen Anstieg des cAMP-Spiegels verglichen mit nur durch Iloprost stimulierter Kontrollgruppe (jeweils $n=6$).

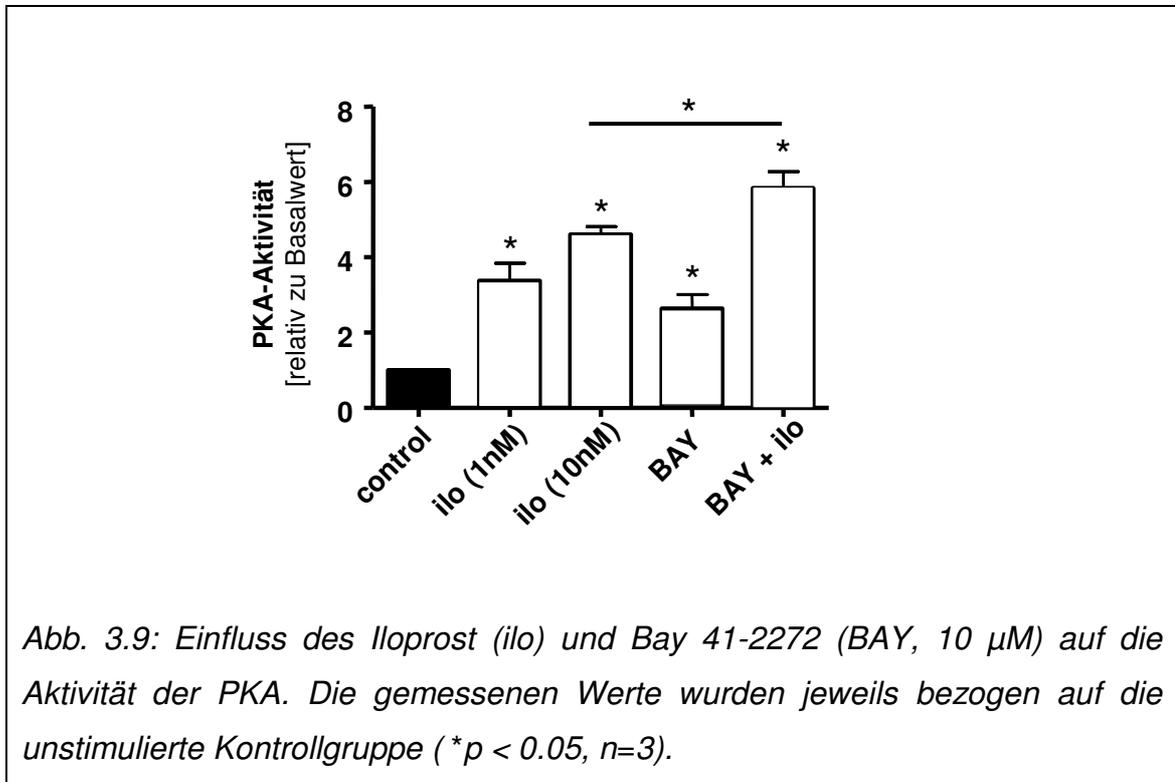
Ähnliche Ergebnisse wurden in HPF gemessen. In diesen Zellen stieg der cAMP-Gehalt durch Stimulation durch 1 nM Iloprost ohne Zugabe jeglicher PDE-Hemmstoffe um das $13,15 \pm 1,13$ -fache verglichen mit unstimulierten Zellen ($n=4$). Eine Ko-Stimulation mit dem PDE4-spezifischen Hemmstoff Quazinone ($10 \mu\text{M}$) führte in Anwesenheit von 1 nM Iloprost zu einem Anstieg des cAMP um das $5,50 \pm 1,32$ -fache ($n=6$), ein ähnlicher Anstieg wurde durch Ko-Stimulation mit dem PDE4-spezifischen Hemmstoff Rolipram ($30 \mu\text{M}$) beobachtet ($4,62 \pm 0,41$ -fach, $n=6$) (Abb. 3.8.B). Auch eine Vorinkubation durch Bay 41-2272 ($10 \mu\text{M}$) führte bei Stimulation mit 1 nM Iloprost zu einem Anstieg des cAMP um das $1,77 \pm 0,18$ -fache ($n=6$) verglichen mit nur durch Iloprost stimulierten Zellen (Abb. 3.8.B).

Entsprechende Ergebnisse ließen sich ebenfalls bei Ko-Stimulationen der Substanzen mit 10 nM Iloprost erkennen (Abb. 3.8.B). Verglichen mit nur durch Iloprost stimulierten Kontrollgruppen führten Präinkubationen durch Quazinone, Rolipram und Bay 41-2272 jeweils zu signifikanten Anstiegen des intrazellulären cAMP-Spiegels (Quazinone: $3,12 \pm 0,27$ -fach, Rolipram: $2,59 \pm 0,37$ -fach, Bay 41-2272: $1,89 \pm 0,21$ -fach, jeweils $n=6$).

3.6 Einfluss von Iloprost und Bay 41-2272 auf die Aktivität der PKA in humanen pulmonalen Fibroblasten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Bay 41-2272 in der Lage ist, erhöhte cAMP-Spiegel zu induzieren, wurde im Folgenden untersucht, ob sich diese Erhöhung ebenfalls in erhöhter PKA-Aktivität ausdrückt. Zu diesem Zweck wurden humane pulmonale Fibroblasten entweder mit Iloprost (ilo, 1 nM, 10 nM), Bay 41-2272 (BAY, $10 \mu\text{M}$) oder einer Kombination beider Substanzen

stimuliert und die PKA-Aktivität nach 30-minütiger Inkubation gemessen (Abb. 3.9).



Das Prostazyklin-Analogon Iloprost führte verglichen mit einer unstimulierten Kontrollgruppe zu signifikanten Anstiegen der PKA-Aktivität, bei Stimulation mit 1 nM Iloprost stieg die Aktivität um das $3,38 \pm 0,47$ -fache, bei Stimulation mit 10 nM Iloprost um das $4,61 \pm 0,21$ -fache ($n=3$).

Auch der Aktivator der löslichen Guanylatzyklase Bay 41-2272 erhöhte die Aktivität der PKA signifikant um das $2,65 \pm 0,37$ -fache ($n=3$).

Zuletzt wurde untersucht, ob Bay 41-2272 (10 μ M) in Kombination mit Iloprost (10 nM) zu einer vermehrten PKA-Aktivität in den Zellen führt als in Zellen, die nur durch Iloprost in gleicher Konzentration stimuliert wurden. Auch hier ließ sich eine signifikant erhöhte Aktivität erkennen.

Diese Versuche zeigen erneut die Fähigkeit des Bay 41-2272 auf, den cAMP-Gehalt durch Hemmung der PDE3 zu erhöhen und dadurch PKA-abhängige Reaktionen zu beeinflussen.

3.7 Einfluss des Bay 41-2272 auf die Proliferation in humanen pulmonalen Fibroblasten

Es ist schon früher gezeigt worden, dass cAMP über seine weiteren Effektoren in der Signalkaskade PKA und EPAC antiproliferative Wirkungen in glatten Muskelzellen ausübt. Obwohl ein ähnlicher antiproliferativer Effekt für cGMP in glatten Muskelzellen beschrieben worden ist [Garg and Hassid, 1989], scheint dieser nicht so potent wie der durch cAMP vermittelte Effekt zu sein [Southgate and Newby, 1990]. In Fibroblasten wurde sogar ein stimulatorischer Effekt des cGMP auf die Proliferation beschrieben [Hassid et al., 1994].

Da in dieser Arbeit bereits gezeigt worden ist, dass Bay 41-2272 sowohl den cGMP- als auch den cAMP-Spiegel in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen und Fibroblasten zu erhöhen vermag, sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss Bay 41-2272 auf die zelluläre Proliferation nimmt. Als Ausdruck der Proliferation wurde in dieser Arbeit die DNA-Neusynthese bestimmt, gemessen durch die Menge neu eingebauten radioaktiv markierten Tritiums. Die Zellen wurden hierfür stimuliert durch Bay 41-2272 in angegebener Konzentration, Iloprost (1 nM) oder einer Kombination beider Substanzen. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurde als Proliferationsstimulus PDGF-BB (10 ng/ml) gegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde die DNA-Neusynthese nach angegebenem Protokoll gemessen (Abb. 3.10).

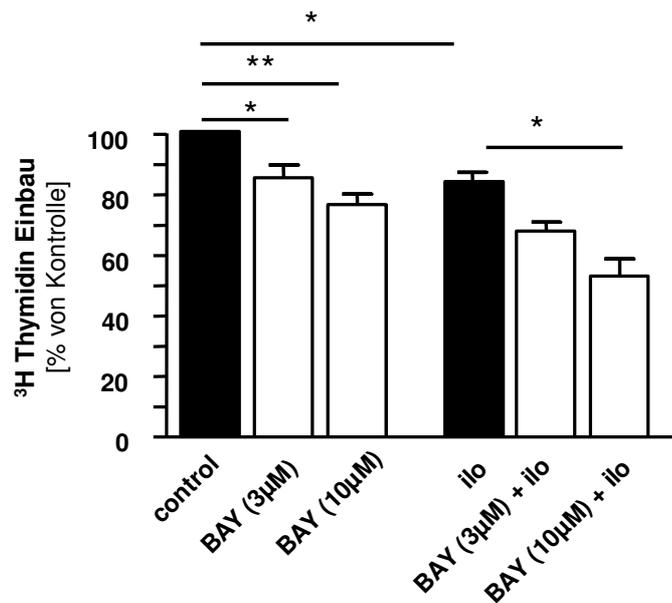


Abb. 3.10: Einfluss des Bay 41-2272 (BAY, 3 µM, 10 µM) und Iloprost (ilo, 1 nM) auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese in humanen pulmonalen Fibroblasten. Werte angegeben als Prozent von der Kontrollgruppe (n=3, *p<0.05, **p < 0.01).

Bay 41-2272 ist in der Lage, die PDGF-induzierte DNA-Neusynthese signifikant zu inhibieren (85,7 ± 4,2 % bei 3 µM Bay 41-2272, 76,8 ± 3,5 % bei 10 µM Bay 41-2272, jeweils verglichen mit nur durch PDGF-stimulierte Kontrollgruppe, n=3). Eine vergleichbar ausgeprägte Proliferationshemmung konnte für 1 nM Iloprost beobachtet werden, hier betrug die DNA-Synthese 78,5 ± 5,2 % der nur durch PDGF-stimulierten Zellen.

Da die gemessenen Ergebnisse noch keine Aussage über den Mechanismus der antimitogenen Effekte des Bay 41-2272 zuließen, wurden weitere Experimente zu diesem Zwecke geplant.

Zunächst wurden hierfür Versuche mit dem potenten Hemmstoff der PKG DT2 [Taylor et al., 2004] durchgeführt. Die Zellen wurden bei ansonsten gleicher Versuchsanordnung vor der Stimulation mit Bay 41-2272 (10 µM) 10 Minuten durch 1 µM DT2 präinkubiert (Abb 3.11).

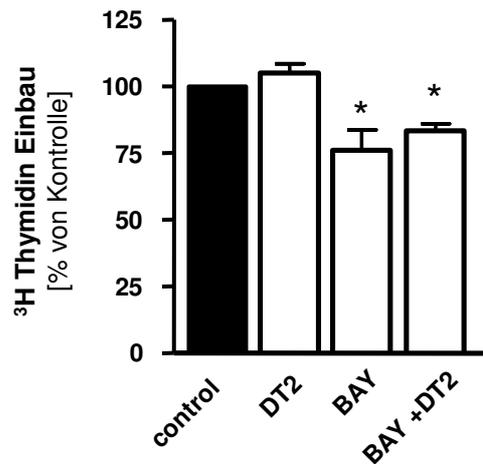


Abb. 3.11: Einfluss des PKG-Inhibitors DT2 (1 μ M) auf die antiproliferative Wirkung des Bay 41-2272 in humanen pulmonalen Fibroblasten. Werte angegeben als Prozent von der Kontrollgruppe (n=3, *p < 0.05).

Die Grafik zeigt klar, dass die Präinkubation durch DT2 keinen nennenswerten Einfluss auf die antimitogenen Effekte des Bay 41-2272 ausübt. Da eine Hemmung der PKG keine vermehrte Proliferation zur Folge hat, werden die antiproliferativen Effekte offensichtlich nicht über erhöhte cGMP-Spiegel und die PKG vermittelt.

Der alternative Erklärungsansatz für die PKG-unabhängigen, antimitogenen Effekte des Bay 41-2272 war die Aktivierung von cAMP-abhängigen Signalkaskaden durch Hemmung der PDE3. Diesem Ansatz folgend wurden Versuche mit dem PKA-Hemmstoff PKI_{myr} durchgeführt. Entsprechend den oben aufgeführten Versuchen wurden die Zellen dieses mal vor Stimulation durch Bay 41-2272 (BAY, 10 μ M), Iloprost (ilo, 10 nM) oder einer Kombination beider Substanzen vorinkubiert durch PKI_{myr} (PKI, 5 μ M). Ansonsten entsprach der Versuchsaufbau dem oben bereits beschriebenen Schema (Abb. 3.12).

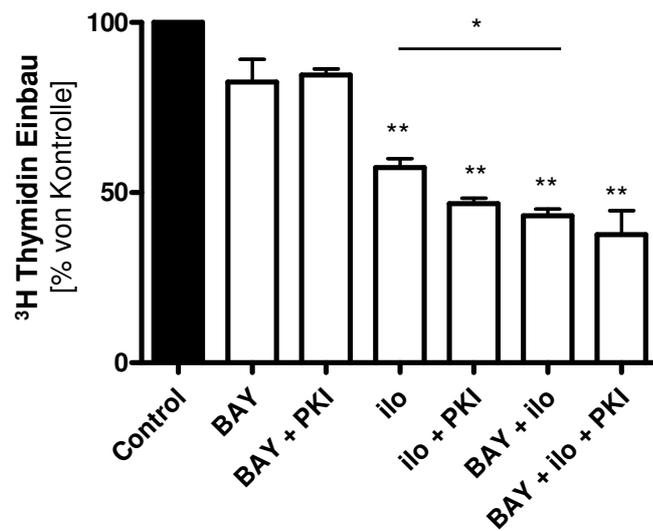


Abb. 3.12: Einfluss des PKA-Hemmstoffes PKI_{myr} (PKI) auf die antimitogenen Effekte des Iloprost (ilo) und des Bay 41-2272 (BAY) in humanen pulmonalen Fibroblasten. Werte angegeben als Prozent von der Kontrollgruppe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. $n=3$).

Die Ergebnisse in der Grafik zeigen, dass auch durch Inhibition der PKA durch PKI_{myr} die antiproliferativen Wirkungen des Iloprost und des Bay 41-2272 nicht aufgehoben werden können. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die antimitogenen Effekte bei erhöhten cAMP-Spiegeln durch Iloprost und Bay 41-2272 in humanen pulmonalen Fibroblasten nicht PKA-abhängig vermittelt werden.

Diese Schlussfolgerung konnte durch weitere Versuche untermauert werden. Hierbei wurde untersucht, inwiefern dbcAMP, ein PKA-spezifisches cAMP-Analogon, und 8-pCTP-2'-O-Me-cAMP, ein Epac-spezifisches cAMP-Analogon, Einfluss auf die PDGF-induzierte Proliferation ausüben. Die Zellen wurden hierbei durch dbcAMP (1 μ M, 10 μ M) und 8-pCTP-2'-O-Me-cAMP (8-pCTP, 10 μ M, 30 μ M) stimuliert, ansonsten wurde der Versuch entsprechend der oben gegebenen Beschreibung durchgeführt (Abb. 3.13).

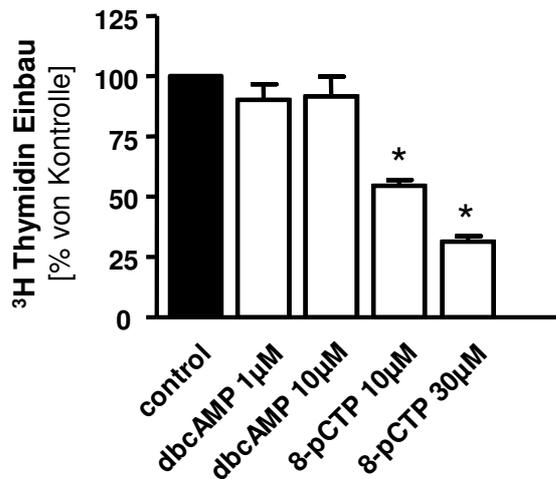


Abb. 3.13: Einfluss von dbcAMP und 8-pCTP-2'-O-Me-cAMP auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese in humanen pulmonalen Fibroblasten. Werte angegeben als Prozent von der Kontrollgruppe (n=3, *p < 0.05).

Das PKA-spezifische cAMP-Analogon dbcAMP ist nicht in der Lage, die PDGF-induzierte DNA-Neusynthese zu verhindern oder abzuschwächen. Das Epac-spezifische cAMP-Analogon 8-pCTP-2'-O-Me-cAMP übt starke antimitogene Effekte aus und kann die PDGF-induzierte Proliferation signifikant inhibieren. Diese Ergebnisse legen nahe, dass in humanen pulmonalen Fibroblasten die antimitogenen Wirkungen durch die cAMP-Epac-Kaskade vermittelt werden. Auch der Aktivator der löslichen Guanylatzyklase Bay 41-2272 entfaltet antimitogene Effekte durch erhöhte cAMP-Werte und daraus resultierender Aktivierung des Epac-Signalweges.

3.8 Einfluss des Bay 41-2272 auf die Desensibilisierung des IP-Rezeptors durch Iloprost in humanen pulmonalen Fibroblasten

Nachdem gezeigt worden ist, dass der Aktivator der löslichen Guanylatzyklase Bay 41-2272 in der Lage ist, via Hemmung der PDE3 erhöhte cAMP-Spiegel in den Zellen zu vermitteln und die Wirkungen des Iloprost zu potenzieren, wurde weiterhin untersucht, ob Bay 41-2272 bei längerer gleichzeitiger Anwendung mit Iloprost Einfluss auf die Desensibilisierung des IP-Rezeptors ausübt. Hierfür

wurden humane pulmonale Fibroblasten analog zu den vorher durchgeführten Desensibilisierungskinetiken für bestimmte Zeiträume (24 h, 8 h, 6 h, 4 h, 2 h) durch 3 nM Iloprost stimuliert, entweder in An- oder in Abwesenheit von Bay 41-2272 (10 μ M). Die cAMP-Bestimmung erfolgte auf eine weitere Stimulation durch 10 nM Iloprost (Abb. 3.14).

Bay 41-2272 hat auch bei längerer Applikation in Kombination mit Iloprost keinen Einfluss auf die Desensibilisierung des IP-Rezeptors.

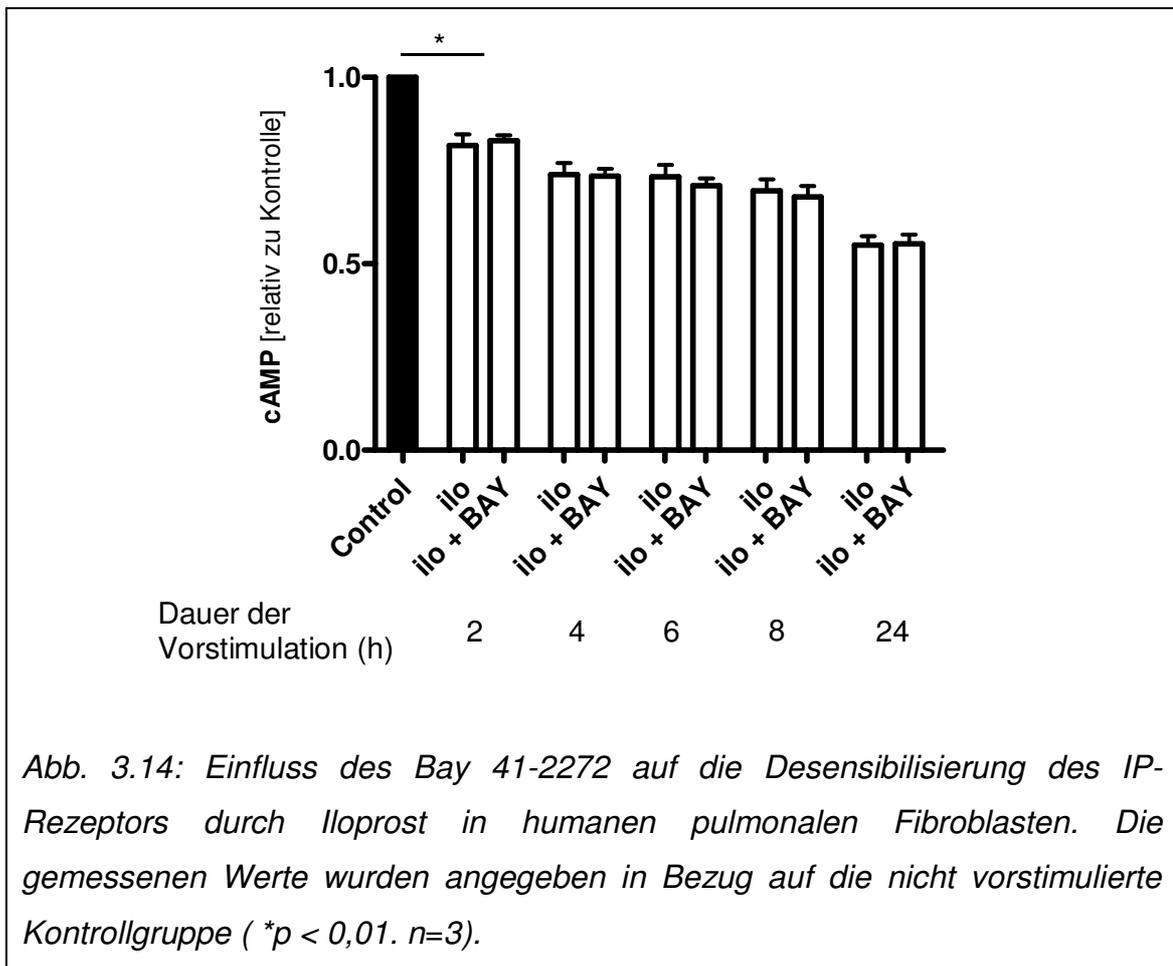


Abb. 3.14: Einfluss des Bay 41-2272 auf die Desensibilisierung des IP-Rezeptors durch Iloprost in humanen pulmonalen Fibroblasten. Die gemessenen Werte wurden angegeben in Bezug auf die nicht vorstimulierte Kontrollgruppe (* $p < 0,01$. $n=3$).

4. Diskussion

Die pulmonale arterielle Hypertonie stellt trotz einer wachsenden Zahl an Behandlungsmöglichkeiten immer noch eine schwerwiegende Erkrankung mit schlechter Prognose dar.

Bei der Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie mit dem Prostazyklin-Analogen Iloprost werden bei längerer Applikation immer höhere Dosierungen des Wirkstoffes notwendig, um die gewünschten Effekte zu erreichen [Barst et al., 1996]. Diese Beobachtung wird einer Desensibilisierung des IP-Rezeptors durch Iloprost bei Langzeitanwendung zugeschrieben [Nilius et al., 2000].

In dieser Arbeit konnte diese Desensibilisierung reproduziert werden. Weiterhin konnte die Abhängigkeit des Ausmaßes der Desensibilisierung von der Dauer der Stimulation und von der Dosis des Iloprosts während der Langzeitstimulation gezeigt werden. Bei sehr niedrigen Konzentrationen des Iloprosts (0,1 nM, 0,3 nM) waren innerhalb von 24 Stunden noch keine Anzeichen der Minderantwort auf erneute Stimulation erkennbar. Die Effektivität dieser Dosierungen konnte jedoch sichergestellt werden, d. h. dass auch diese niedrigen Konzentrationen das cAMP zu erhöhen in der Lage sind.

Der Versuch sollte daher darin bestehen, Wirkstoffe so zu kombinieren, dass das cAMP trotz geringerer Dosierungen des Iloprost hoch bleibt. So könnte einer raschen Desensibilisierung des IP-R entgegengewirkt werden. Eine Stabilisierung des cAMP kann durch Hemmung der PDE3 und PDE4 erreicht werden.

Eine weitere Strategie in der Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie besteht in der Erhöhung der intrazellulären cGMP-Spiegel durch NO-unabhängige Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase [Stasch et al., 2002; Evgenov et al., 2006] oder Stabilisierung des cGMP durch PDE5-Hemmstoffe wie Sildenafil [Humbert et al., 2004]. In experimentellen Versuchen zur Therapie der PAH konnte durch Applikation von Aktivator der sGc eine partielle Aufhebung der hämodynamischen und strukturellen Veränderungen gezeigt werden [Schermyly et al., 2008]. In diesen Studien wurde durch

histomorphologische Untersuchungen deutlich, dass die getesteten Aktivatoren der sGc eine klare antiproliferative Wirkung innehaben [Schermuly et al., 2008; Dumitrascu et al., 2006]. Weiterhin ist beschrieben worden, dass der sGc-Aktivator Riociguat die pulmonal-hämodynamischen Parameter bei Patienten mit PAH positiv beeinflussen kann [Grimminger et al., 2009].

Die Wirkung des Bay 41-2272, das cGMP zu erhöhen, konnte in dieser Arbeit klar durch den Nachweis einer Phosphorylierung des VASP an Serin239 demonstriert werden. Die Phosphorylierung an dieser Stelle ist PKG-spezifisch [Butt et al., 1994; Smolenski et al., 2000].

Da bereits zu früheren Zeitpunkten gezeigt werden konnte, dass cGMP die Aktivität der cAMP-spezifischen PDE3 inhibiert [Cornwell et al. 1994; Osinski et al. 2001], stellt sich die Frage, ob die durch NO-Analoga verursachten Effekte nicht nur durch erhöhte cGMP-Werte, sondern ebenfalls über Stabilisierung des intrazellulären cAMP vermittelt werden. Die Hemmung der PDE3 durch cGMP stellt bei dieser Theorie gewissermaßen eine Verbindung der beiden Therapieansätze dar.

In der Fachliteratur wird das Vorkommen der PDE3 in pulmonalen Geweben kontrovers diskutiert. Es ist bekannt, dass PDE3 in zwei Isoformen existiert, PDE3A und PDE3B [Shakur et al., 2001]. Die verschiedenen Isoformen kommen in unterschiedlichen Geweben vor [Reinhardt et al., 1995]. Murray et al. beschrieb das Vorkommen beider Isoformen in pulmonalen glatten Muskelzellen [2002, 2006], das Vorkommen war hier sogar signifikant erhöht bei Patienten mit idiopathischer und sekundärer pulmonaler Hypertonie [Murray et al., 2006]. Weiterhin ist beschrieben worden, dass selektive Hemmung der PDE3 die Effekte von cAMP-erhöhenden Therapeutika wie Prostazyklin-Analoga auf vaskuläres Remodeling in hypoxischem, pulmonalem Gewebe potenzieren kann [Phillips et al., 2004]. Auch diese Studie unterstreicht die Wichtigkeit der PDE3 im cAMP-Metabolismus in pulmonalen vaskulären Zellen. Im Kontrast zu diesen Publikationen steht die von Dunkern et al. [2007]. Hier wurde die Aktivität der verschiedenen PDEs in pulmonalen Fibroblasten untersucht, PDE3-Aktivität konnte hier nicht nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte wiederum durch RT-PCR und Western blot klar gezeigt werden, dass die untersuchten humanen pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen und Fibroblasten beide Isoformen der PDE3, PDE3A und PDE3B, exprimieren.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil im Metabolismus des cAMP in pulmonalen Geweben stellt die PDE4 dar. Das Vorkommen der PDE4 in glatten Muskelzellen und Fibroblasten wurde bereits in verschiedenen Publikationen beschrieben [Polson und Strada, 1996; Osinski und Schrör, 2000]. In dieser Arbeit konnten die basalen und Iloprost-stimulierten cAMP-Spiegel durch Applikation des PDE4-spezifischen Hemmstoffes Rolipram signifikant erhöht werden. Die Anstiege waren vergleichbar mit denen, die durch Gabe des PDE3-selektiven Hemmstoffes Quazinone erzielt wurden. Diese Ergebnisse unterstreichen das gleichzeitige Vorkommen beider Isoformen, der PDE3 und PDE4, in den untersuchten Zellen sowie eine vergleichbare funktionelle Bedeutung im cAMP-Metabolismus.

Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch Bay 41-2272 nicht nur zu erhöhten cGMP-Spiegeln, sondern ebenfalls zu erhöhten Werten des basalen oder Iloprost-stimulierten cAMP führt. Diese Eigenschaften des Bay 41-2272 waren vergleichbar mit denen des direkten PDE3-Hemmstoffes Quazinone.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Bay 41-2272 Effekte ausübt, die klar auf erhöhte cAMP-Gehalte und die dadurch aktivierten Signalkaskaden zurückzuführen sind. Zum einen wurde durch Bay 41-2272 ein Shift eines Teiles des VASP von 46 kDa auf 50 kDa beobachtet. Dieser Shift ist durch PKA-spezifische Phosphorylierung des VASP an Serin157 zu begründen [Reinhard et al., 2001; Butt et al., 1994; Smolenski et al., 2000].

Weiterhin war Bay 41-2272 in der Lage, antimitogene Wirkungen zu vermitteln. Bay 41-2272 war hier jeweils fähig, sowohl diese Effekte in Abwesenheit von Iloprost zu induzieren, als auch die durch Iloprost hervorgerufenen Effekte noch zu verstärken. Die antimitogene Wirkung durch erhöhte cAMP-Werte in glatten Muskelzellen wurde bereits beschrieben [Yan et al., 2011], die Wirkungen

erhöhter cGMP-Spiegel werden noch diskutiert. Einige Autoren konnten für beide Nukleotide, cAMP und cGMP, antiproliferative Wirkungen in glatten Muskelzellen zeigen [Cornwell et al., 1994; Grosser et al., 1995], hingegen wurden in Fibroblasten sogar stimulatorische Effekte des cGMP auf die Proliferation beschrieben [Hassid et al., 1994]. Southgate und Newby [1990] demonstrierten antiproliferative Effekte für den PKA-Agonisten 8-Bromo-cAMP, nicht jedoch für den PKG-Agonisten 8-Bromo-cGMP. Cornwell et al. [1994] konnte zeigen, dass erhöhte cGMP-Level durch NO-Analoga in glatten Muskelzellen von Ratten antimitogene Wirkungen haben, allerdings konnten diese Wirkungen nicht durch den PKG-Aktivator pCPT erzielt werden. Zusammenfassend konnte für NO-Donatoren eine antiproliferative Wirkung gezeigt werden, diese Wirkung scheint jedoch nicht durch die cGMP-abhängigen Signalkaskaden vermittelt zu werden. Auch Osinski et al. [2001] schrieb die antimitogenen Wirkungen von organischen Nitraten nicht der Aktivierung von PKG sondern der Aktivierung von PKA durch Hemmung der PDE3 zu.

Die angegebenen Studien sind mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar. Hier konnte ebenfalls ein antimitogener Effekt durch Bay 41-2272 demonstriert werden. Dieser Effekt konnte durch den potenten PKG-Inhibitor DT-2 [Taylor et al., 2004] nicht verhindert oder abgeschwächt werden, so dass davon auszugehen ist, dass die antiproliferativen Wirkungen PKG-unabhängig vermittelt werden. Ein alternativer Erklärungsansatz für die verminderte DNA-Synthese nach Stimulation durch Bay 41-2272 stellte die durch erhöhtes cAMP vermittelte Aktivierung der PKA dar. Allerdings konnte auch der PKA-Hemmstoff PKI_{myr} die antiproliferativen Wirkungen des Bay 41-2272 sowie des Iloprost nicht antagonisieren. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die antimitogenen Effekte durch erhöhtes cAMP nicht einer Aktivierung der PKA zuzurechnen sind. Diese These konnte ebenfalls dadurch gestützt werden, dass das PKA-Analagon dbcAMP keinen Einfluss auf die DNA-Synthese ausübt. Das Epac-spezifische cAMP-Analagon 8-pCTP-2'-O-Me-cAMP hingegen war in der Lage, die durch PDGF induzierte DNA-Synthese signifikant zu senken. Diese Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass die antiproliferativen Effekte durch erhöhtes cAMP weniger via PKA, sondern durch die cAMP-Epac-Kaskade begründet zu sein scheinen. Antiproliferative

Wirkungen durch Epac sind bereits zuvor beschrieben worden [Haag et al., 2008].

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit klar das Potential des sGc-Aktivators Bay 41-2272, den cAMP-Gehalt in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen und Fibroblasten zu erhöhen. Dieser Anstieg ist durch Hemmung der PDE3 bei erhöhten cGMP-Spiegeln zu begründen. Durch die Stabilisierung des cAMP vermittelt Bay 41-2272 nicht nur cGMP- und PKG-abhängige Wirkungen, sondern aktiviert ebenfalls Kaskaden, die durch erhöhtes cAMP begründet sind. Dies konnte durch Nachweis einer Hemmung der DNA-Synthese demonstriert werden. Diese Eigenschaften könnten sich vorteilhaft bei der Therapie von Patienten mit pulmonaler Hypertonie auswirken. Auch für weitere potente sGc-Aktivatoren könnten diese Ergebnisse von Bedeutung sein.

Eine Kombination von Bay 41-2272 mit dem Prostazyklin-Analogen Iloprost könnte eine sinnvolle Maßnahme darstellen, der Desensibilisierung des IP-Rezeptors entgegenzuwirken. Neben erhöhter cGMP-Werte durch direkte Aktivierung der sGc und den daraus resultierenden Wirkungen konnte gezeigt werden, dass Bay 41-2272 die Iloprost-stimulierten cAMP-Spiegel zu erhöhen vermag und dass sich die Wirkungen beider Substanzen sogar potenzieren. Dies konnte anhand der Proliferationsbestimmungen beobachtet werden. Durch die Stabilisierung des cAMP via PDE3-Inhibition könnten niedrigere Dosierungen des Iloprost benötigt werden, um die gewünschten Effekte zu erzielen. Durch niedrige Dosierungen könnte eine rasch einsetzende Desensibilisierung des IP-Rezeptors abgeschwächt werden.

Die Kombination des Bay 41-2272 mit anderen cAMP-erhöhenden Therapeutika wie Sympathomimetika könnte ebenfalls eine Möglichkeit sein, um die Dosierungen dieser Therapeutika zu reduzieren.

Ein klinischer Nutzen der neuen sGC-Stimulatoren wurde zuletzt in einigen Studien gezeigt [Larche et al., 2013].

So konnte Bay 41-2272 in verschiedenen Modellen von PAH eine Senkung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks und des vaskulären Widerstandes bewirken, einhergehend mit einer Erhöhung der kardialen Auswurfleistung. Weiterhin wurde eine Inhibition des vaskulären Remodelling sowie der

Rechtsherzhypertrophie nachgewiesen [Stasch et al., 2013]. Thorsen et al. [2010] demonstrierte, dass Bay 41-2272 im Tierversuch die Entwicklung einer chronisch-hypoxischen pulmonalen Hypertonie entgegenwirken konnte. Hierbei wurden Ratten einer chronischen Hypoxie ausgesetzt. Es zeigte sich, dass Bay 41-2272 in gleichem Maße die hypoxiebedingte Zunahme des rechtsventrikulären systolischen Drucks und die Rechtsherzhypertrophie unterbinden konnte wie Sildenafil, welches ein Standardtherapeutikum der PAH darstellt. Auch Weissmann et al. [2014] arbeiteten die positive Beeinflussung des Bay 41-2272 in Bezug auf pulmonale Hypertonie in einem Tiermodell heraus. Sie zeigten, dass sGC-Stimulatoren Ratten, die Zigarettenrauch ausgesetzt waren, vor der Entstehung einer pulmonalen Hypertonie bzw. eines Emphysems schützt.

Riociguat ist der einzige Vertreter der sGC-Stimulatoren, der in klinische Studien eingeschlossen wurde. Es ist ausgehend von Bay 41-2272 mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften entwickelt worden.

Insgesamt wurde Riociguat von den Patienten gut vertragen [Idrees et al., 2014; Cannon et al., 2014].

Vielversprechende klinische Studien wurden 2013 von Ghofrani et al. im Jahre 2013 veröffentlicht. Es handelt sich hierbei um CHEST-1 und PATENT-1.

CHEST-1 (Chronic thromboembolic pulmonary hypertension sGC-stimulator trial 1) untersuchte die Wirksamkeit des Riociguat bei Patienten mit CTEPH, bis dato bestand die einzige Therapiemöglichkeit dieser Patienten in der pulmonalen Endarteriektomie, allerdings ist ein Großteil der Betroffenen inoperabel. Riociguat verbesserte die 6-Minuten-Gehstrecke, den pulmonalen Gefäßwiderstand, NT-proBNP-Werte sowie die funktionelle WHO-Klasse. Es stellt somit eine neue Therapieoption bei inoperablen Patienten dar.

PATENT-1 (Pulmonal arterial hypertension sGC-stimulator trial 1) untersuchte die Wirksamkeit des Riociguat bei Patienten mit symptomatischer PAH. In diese Studie eingeschlossen wurden sowohl Patienten ohne bisherige Therapie, als auch Patienten, welche zusätzlich mit einem Endothelin-Rezeptorantagonisten oder einem Prostacyclin (vorwiegend inhalativ) behandelt wurden. Auch in dieser Studie verbesserte Riociguat die 6-Minuten-Gehstrecke um etwa 36 m im Vergleich zur Placebogruppe. Positive Effekte zeigten sich auch in Bezug

auf den pulmonalen Gefäßwiderstand, die kardiale Auswurfleistung, den NT-proBNP-Spiegel, die WHO-Klasse und den Borg-Dyspnoe-Score. Interessanterweise ließen sich die Verlängerungen der 6-Minuten-Gehstrecke unter Riociguat in allen Subgruppen nachweisen, sowohl bei Patienten ohne weitere Therapie, als auch bei Patienten, die zusätzlich mit Endothelin-Rezeptorantagonisten oder Prostacyclin behandelt wurden. Die Frage, ob das Riociguat eine Verbesserung bei Prostacyclin-vorbehandelten Patienten ausschließlich über cGMP-abhängige Effektoren oder ebenfalls über erhöhte cAMP-Spiegel und dadurch aktivierte Kaskaden hervorruft, wird in dieser Studie nicht beantwortet. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen jedoch die Vermutung nahe, dass die Effekte über beide second messenger, cGMP und cAMP, vermittelt werden. PATENT-1 zeigt erstens sehr deutlich, dass sGC-Stimulatoren eine viel versprechende Therapiealternative bei PAH darstellen, zweitens zeigt die Studie, dass die Kombination von Prostacyclin und sGC-Stimulatoren sehr sinnvoll zu sein scheint.

Den Studien CHEST-1 und PATENT-1 schlossen sich die offenen Langzeitstudien CHEST-2 und PATENT-2 an, die Ergebnisse dieser Studien bleiben abzuwarten.

5. Schlussfolgerungen

Die pulmonale arterielle Hypertonie stellt trotz diverser medikamentöser Angriffspunkte eine schwere Erkrankung dar. Ohne Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung keine drei Jahre. Viele der betroffenen Patienten erfahren trotz der Therapie keine oder nur wenig Besserung.

Ein vielversprechendes neueres Ziel der medikamentösen Therapie ist die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase. Stellevertretend für diese Substanzklasse wurde in dieser Arbeit das Bay 41-2272 untersucht. Die Versuche dieser Arbeit demonstrieren, dass Bay 41-2272 auf zellulärer Ebene positive Effekte auf die PAH ausübt. So vermag es einerseits, den intrazellulären cGMP-Gehalt zu erhöhen, weiterhin konnten ebenfalls erhöhte cAMP-Spiegel gemessen werden. Es konnten ebenfalls cAMP-abhängige Signalkaskaden nachgewiesen werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase einen festen Platz in der Therapie der PAH innehaben werden. Zuletzt wurde Riociguat zur Behandlung zugelassen, in den ersten klinischen Studien zeigte es bereits deutliche positive Effekte. Es bleibt abzuwarten, welche Erkenntnisse die Langzeitstudien PATENT-2 und CHEST-2 noch liefern. Eine Aussage darüber, ob die mittlere Überlebenszeit durch diese Substanzklasse beeinflusst wird, ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass eine Kombination der medikamentösen Angriffspunkte eine Möglichkeit zur Verbesserung der Behandlung darstellen könnte. So könnte durch die gleichzeitige Anwendung von Iloprost und einem Aktivator der löslichen Guanylatzyklase der Desensibilisierung des IP-Rezeptors entgegengewirkt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Desensibilisierung in hohem Maße von der Dosierung des Iloprost abhängt. Weiterhin wurde dargestellt, dass Bay 41-2272 in der Lage ist, den intrazellulären cAMP-Gehalt zu erhöhen. Dies galt sowohl für den basalen, als auch für den durch Iloprost-induzierten cAMP-

Spiegel. Bei gleichzeitiger Anwendung könnten daher niedrige Dosierungen des Iloprost notwendig sein, um den gewünschten klinischen Effekt zu vermitteln. Bay 41-2272 selbst übt keine Effekte auf die Desensibilisierung aus.

In der klinischen Studie PATENT-1 ist ein Nutzen bei der Patientengruppe, die mit Prostazyklinanaloga vorbehandelt wurde, durch das Riociguat beschrieben worden, so konnte beispielsweise die 6-Minuten-Gehstrecke verlängert werden. Eine Aussage über den zellulären Mechanismus wurde hierbei nicht gemacht, es ist jedoch davon auszugehen, dass ein Teil der Wirkung über cAMP-abhängige Signalwege zu erklären ist.

6. Literatur

Archer SL, Mike D, Crow J, Long W, Weir EK (1996). A placebo-controlled trial of prostacyclin in acute respiratory failure in COPD. *Chest.*; 109(3):750-5.

Archer SL (2013). Riociguat for pulmonary hypertension--a glass half full. *N Engl J Med.*; 25;369(4):386-8.

Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH (1996). A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med.*; 334(5):296-302.

Barst RJ, Gibbs JS, Ghofrani HA, Hoeper MM, McLaughlin VV, Rubin LJ, Sitbon O, Tapson VF, Galiè N (2009). Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*; 54 (1 Suppl): 78-84.

Bawankule DU, Sathishkumar K, Sardar KK, Chanda D, Krishna AV, Prakash VR, Mishra SK (2005). BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine]-induced dilation in ovine pulmonary artery: role of sodium pump. *J Pharmacol Exp Ther*; 314(1):207-13.

Beavo JA (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.*; 75(4):725-48.

Benedict N, Seybert A, Mathier MA (2007). Evidence-based pharmacologic management of pulmonary arterial hypertension. *Clin Ther.*; 29(10):2134-53.

Blanco-Rivero J, Cachofeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Márquez-Rodas I, Salices M, Xavier FE, Ferrer M, Balfagón G (2005). Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*; 46(1):107-12.

Boie Y, Rushmore TH, Darmon-Goodwin A, Grygorczyk R, Slipetz DM, Metters KM, Abramovitz M (1994). Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem.*; 269(16):12173-8.

Boswell-Smith V, Spina D, Page CP (2006). Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol.*; 147(S1): 252–257.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*; 72:248-54

Buechler WA, Ivanova K, Wolfram G, Drummer C, Heim JM, Gerzer R (1994). Soluble Guanylyl Cyclase and Platelet Function. *Ann N Y Acad Sci*; 714:151-157.

Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR (1977). Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation.

Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem.*; 269(20):14509-17.

Cai H, Harrison DG (2000). Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: the Role of Oxidant Stress. *Circ Res*; 87(10):840-844.

Cannon JE, Pepke-Zaba J(2014). Riociguat for pulmonary hypertension. *Expert Rev Clin Pharmacol.*; 7(3):259-70.

Chung KF (2006). Phosphodiesterase inhibitors in airway disease. *Eur J Pharmacol*; 533:110-117.

Cogan JD, Vnencak-Jones CL, Phillips JA 3rd, Lane KB, Wheeler LA, Robbins IM, Garrison G, Hedges LK, Loyd JE (2005). Gross BMPR2 gene rearrangements constitute a new cause for primary pulmonary hypertension. *Genet Med*; 7(3):169-174.

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S (1994). International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.*; 46(2):205-29.

Collier J, Vallance P (1989). Second Messenger Role for NO Widens to Nervous and Immune Systems. *Trends Pharmacol Sci*; 10(11):427-431.

Conti M (2000). Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. *Mol Endocrinol.*; 14(9):1317-27.

Conti M, Beavo J (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem.*; 76:481-511.

Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM (1994). Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*; 267:1405-1413.

D'Alonzo GE, Smolensky MH, Feldman S, Gianotti LA, Emerson MB, Staudinger HW, Sauter R, Steinijans VW (1991). Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Pneumologie*; 45 Suppl 4:834-41

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*; 396(6710):474-7.

Denninger JW, Marletta MA (1999). Guanylate Cyclase and the NO/CGMP Signaling Pathway. *Biochim Biophys Acta*; 1411(2-3):334-350.

Deruelle P, Balasubramaniam V, Kunig AM, Seedorf GJ, Markham NE, Abman SH (2006). BAY 41-2272, a direct activator of soluble guanylate cyclase, reduces right ventricular hypertrophy and prevents pulmonary vascular remodeling during chronic hypoxia in neonatal rats. *Biol Neonate*.; 90(2):135-44.

Dony E, Lai Y-J, Dumitrascu R, Pullamsetti SS, Savai R, Ghofrani HA, Weissmann N, Schudt C, Flockerzi D, Seeger W, Grimminger F Schermuly RT (2008). Partial reversal of experimental pulmonary hypertension by phosphodiesterase-3/4 inhibition. *Eur Respir J*; 31:599-610

Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H, Stasch JP, Gnoth MJ, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT (2006). Activation of Soluble Guanylate Cyclase Reverses Experimental Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling *Circulation*; 113:286-295

Dumitrescu D, ten Freyhaus H, Wassermann K, Rosenkranz S (2007). Pulmonale Hypertonie. *Pneumologie*; 4:283-302

Dunkern TR, Feurstein D, Rossi GA, Sabatini F, Hatzelmann A (2007). Inhibition of TGF-beta induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase. *Eur J Pharmacol*; 572(1):12-22.

Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho MP, Naeije R, Adnot S (2002): Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.*; 20(6):1559–72

Elliott CG (2005). Genetics of pulmonary arterial hypertension: current and future implications. *Semin Respir Crit Care Med.*; 26(4):365-71

Evgenov OV, Kohane DS, Bloch KD, Stasch JP, Volpato GP, Bellas E, Evgenov NV, Buys ES, Gnoth MJ, Graveline AR, Liu R, Hess DR, Langer R, Zapol WM (2007). Inhaled agonists of soluble guanylate cyclase induce selective pulmonary vasodilation. *Am J Respir Crit Care Med*; 176(11):1138-45

Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JP (2006). NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*; 5(9):755-68.

Ewert R, Schäper C, Halank M, Gläser S, Opitz CF (2009). Inhalative iloprost - pharmacology and clinical application. *Expert Opin Pharmacother.*; 10(13):2195-207.

Fawcett L., Baxendale R., Stacey P., McGrouther C., Harrow I., Soderling S., Hetman J., Beavo J. A., Phillips S. C (2000). Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci* 97:3702-7.

Foerster J, Harteneck C, Malkewitz J, Schultz G, Koesling D (1996). A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur. J. Biochem.*; 240:380-386.

Frey R, Mück W, Unger S, Artmeier-Brandt U, Weimann G, Wensing G (2008). Single-Dose Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Tolerability, and Safety of the Soluble Guanylate Cyclase Stimulator BAY 63-2521: An Ascending-Dose Study in Healthy Male Volunteers *The Journal of Clinical Pharmacology*; 48:926-934

Friebe A, Schultz G, Kösling D (1996). Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J.*; 15:6863-6868.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature*; 288(5789):373-376.

Galiè N, Hoepfer MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.*; 30(20):2493-537

Galiè N, Negro L, Simonneau G (2009). The use of combination therapy in pulmonary arterial hypertension: new developments. *Eur Respir Rev.*; 18(113):148-53.

Galle J, Zabel U, Hübner U, Hatzelmann A, Wagner B, Wanner C, Schmidt HH (1999). Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic cGMP levels and phosphodiesterase activity. *Br. J. Pharmacol.*; 127:195-203.

Garg UC, Hassid A (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*; 83(5):1774-1777.

Garthwaite J, Southam E, Boulton C, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B (1995). Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.*; 48:184-188.

Gayat E, Mebazaa A (2011). Pulmonary hypertension in critical care. *Curr Opin Crit Care*; 2011 Aug 12.

Ghofrani HA, Barst RJ, Benza RL, Champion HC, Fagan KA, Grimminger F, Humbert M, Simonneau G, Stewart DJ, Ventura C, Rubin LJ (2009). Future perspectives for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*; 54(1 Suppl): 108-17.

Ghofrani HA, Galiè N, Grimminger F, Grünig E, Humbert M, Jing ZC, Keogh AM, Langleben D, Kilama MO, Fritsch A, Neuser D, Rubin LJ; PATENT-1 Study Group (2013). Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.*; 25;369(4):330-40

Ghofrani HA, D'Armini AM, Grimminger F, Hoeper MM, Jansa P, Kim NH, Mayer E, Simonneau G, Wilkins MR, Fritsch A, Neuser D, Weimann G, Wang C; CHEST-1 Study Group (2013). Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med.*; 25;369(4):319-29.

Gilman AG (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.*; 56:615-649.

Grimminger F, Weimann G, Frey R, Voswinckel R, Thamm M, Bölkow D, Weissmann N, Mück W, Unger S, Wensing G, Schermuly RT, Ghofrani HA (2009). First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.*; 33:785-792

Grosser T, Bönisch D, Zucker TP, Schrör K (1995). Iloprost-induced inhibition of proliferation of coronary artery smooth muscle cells is abolished by homologous desensitization. *Agents Actions Suppl.*; 45:85-91

Haag S, Warnken M, Juergens UR, Racké K (2008). Role of Epac1 in mediating anti-proliferative effects of prostanoid EP(2) receptors and cAMP in human lung fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*; 378(6):617-30.

Hassid A, Arabshahi H, Bourcier T, Dhaunsi GS, Matthews C (1994). Nitric oxide selectively amplifies FGF-2-induced mitogenesis in primary rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol.*; 267: 1040-8.

He B, Zhang F, Li X, Tang C, Lin G, Du J, Jin H (2010). Meta-analysis of randomized controlled trials on treatment of pulmonary arterial hypertension. *Circ J.*; 74(7):1458-64.

Hevel JM, White KA, Marletta MA (1991). Purification of the Inducible Murine Macrophage Nitric Oxide Synthase. Identification As a Flavoprotein. *J Biol Chem.*; 266(34):22789-22791.

Hobbs AJ, Moncada S (2003). Antiplatelet properties of a novel, non-NO-based soluble guanylate cyclase activator, BAY 41-2272. *Vascul Pharmacol.*; 40(3):149-154.

Hoeper MM, Schwarze M, Ehlerding S, Adler-Schuermeyer A, Spiekerkoetter E, Niedermeyer J, Hamm M, Fabel H (2000). Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *N Engl J Med.*; 342(25):1866-70.

Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev.*; 86(1):1-23.

Humbert M, Sitbon O, Simonneau G (2004). Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.*; 351(14):1425-36.

Humbert M, Sitbon O, Chaouat A (2006). Pulmonary arterial hypertension in France. Results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*; 173: 1023–1030

Idrees MM, Swiston J, Nizami I, Al Dalaan A, Levy RD (2014). Saudi Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: Medical and surgical management for pulmonary arterial hypertension. *Ann Thorac Med*; 9(Suppl 1):S79-91

Ignarro LJ, Adams JB, Horwitz PM, Wood KS (1986). Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J. Biol. Chem.*; 261:4997-5002.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987). Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released From Artery and Vein Is Nitric Oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*; 84(24):9265-9269.

Jaffrey SR, Snyder SH (1995). Nitric Oxide: a Neural Messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 11:417-40.

Jin B, Luo XP, Ni HC, Shi HM (2010). Phosphodiesterase type 5 inhibitors for high-altitude pulmonary hypertension: a meta-analysis. *Clin Drug Investig.*; 30(4):259-65.

Joshi CN, Martin DN, Fox JC, Mendeleev NN, Brown TA, Tulis DA. The Soluble Guanylate Cyclase Stimulator BAY 41-2272 Inhibits Vascular Smooth Muscle Growth through the PKA and PKG Pathways. *J Pharmacol Exp Ther*;

Kapural L, Fein A (1997). Suppression of the voltage-gated K⁺ current of human megakaryocytes by thrombin and prostacyclin. *Biochim Biophys Acta*; 1355(3):331-342.

Kassel KM, Wyatt TA, Panettieri RA Jr, Toews ML (2007). Inhibition of human airway smooth muscle cell proliferation by beta 2-adrenergic receptors and cAMP is PKA independent: evidence for EPAC involvement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 294(1): 131-8.

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science.*; 282(5397):2275-9.

Knowles RG, Moncada S (1994). Nitric Oxide Synthases in Mammals. *Biochem J*; 298(Pt 2):249-258.

Ko FN, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, Teng CM (1994). YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood*; 84:4226-4233.

- Koesling D, Friebe A (1999). Soluble Guanylyl Cyclase: Structure and Regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*; 135:41-65.
- Koyama H, Bornfeldt KE, Fukumoto S, Nishizawa Y (2001). Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. *J Cell Physiol* 186(1):1-10.
- Larche NE, Mousa SA (2013). Riociguat for the management of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Drugs Today (Barc)*.;49(12):761-8.
- Lin CS (2004). Tissue expression, distribution and regulation of PDE5. *Int J Impot Res* 2004; 16 (1):8-10
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.*; 52(3):375-414.
- Manganiello VC, Murata T, Taira M, Belfrage P, Degerman E (1995). Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch Biochem Biophys.*; 322(1):1-13.
- Manganiello VC, Degerman E (1999). Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): diverse regulators of cyclic nucleotide signals and inviting molecular targets for novel therapeutic agents. *Thromb Haemost.*; 82(2):407-11.
- Masuyama H, Tsuruda T, Kato J, Imamura T, Asada Y, Stasch JP, Kitamura K, Eto T (2006). Soluble guanylate cyclase stimulation on cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Hypertension*; 48(5):972-8.
- Matot I, Gozal Y (2004). Pulmonary responses to selective phosphodiesterase-5 and phosphodiesterase-3 inhibitors. *Chest*; 125(2):644-651.
- Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS, Jimmo SL (2003). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol.*; 64(3):533-46.
- Mayer B, Koesling D (2001). cGMP signalling beyond nitric oxide. *Trends Pharmacol Sci*; 22(11):546–548.
- McLaughlin VV, Genthner DE, Panella MM, Rich S (1998). Reduction in pulmonary vascular resistance with long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med.*; 338(5):273-7.
- Mendelev NN, Williams VS, Tulis DA. Antigrowth properties of BAY 41-2272 in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 53(2):121-31
- Mittendorf J, Weigand S, Alonso-Alija C, Bischoff E, Feurer A, Gerisch M, Kern A, Knorr A, Lang D, Muenter K, Radtke M, Schirok H, Schlemmer KH, Stahl E,

Straub A, Wunder F, Stasch JP (2009). Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. *Chem Med Chem*; 4(5):853-865.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*; 263(5579):663-665.

Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JXJ, Weir EK (2009). Cellular and Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol*; 54:20-31

Murray F, MacLean MR, Pyne NJ (2002). Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol*; 137(8):1187-1194.

Murray F, Patel HH, Suda RYS, Zhang S, Thistlethwaite PA, Yuan JXJ, Insel PA (2007). Expression and activity of cAMP phosphodiesterase isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary hypertension: role for PDE1 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 292: L294-L303

Namba T, Oida H, Sugimoto Y, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S (1994). cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem.*; 269(13):9986-92.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999). Prostanoid receptors: Structures, properties and functions. *Physiol Rev*; 79(4):1193-1226.

Nathan C, Xie QW (1994). Regulation of Biosynthesis of Nitric Oxide. *J Biol Chem*; 269(19):13725-13728.

Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A (1993). Prostanoid receptors and their biological actions. *Prog Lipid Res*; 32(4):417-434.

Nilius SM, Hasse A, Kuger P, Schrör K, Meyer-Kirchrath J (2000). Agonist-induced long-term desensitization of the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett.*; 484(3):211-6

O'Callaghan D, Gaine SP (2007). Combination therapy and new types of agents for pulmonary arterial hypertension. *Clin Chest Med*; 28(1):169-85.

Olschewski H, Walmrath D, Schermuly R, Ghofrani A, Grimminger F, Seeger W (1996). Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med.*; 124(9):820-4

Olschewski H, Ghofrani HA, Walmrath D, Schermuly R, Temmesfeld-Wollbruck B, Grimminger F, Seeger W. Inhaled prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension secondary to lung fibrosis (1999). *Am J Respir Crit Care Med.*; 160(2):600-7.

Olschewski H, Ghofrani HA, Schmehl T, Winkler J, Wilkens H, Höper MM, Behr J, Kleber FX, Seeger W (2000). Inhaled iloprost to treat severe pulmonary hypertension. An uncontrolled trial. German PPH Study Group. *Ann Intern Med.*; 132(6):435-43.

Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoeper MM, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani HA, Manes A, Kiely DG, Ewert R, Meyer A, Corris PA, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H, Seeger W (2002). Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med.*; 347(5):322-9

Osinski MT, Rauch BH, Schrör K (2001). Antimitogenic actions of organic nitrates are potentiated by sildenafil and mediated via activation of protein kinase A. *Mol Pharmacol*; 59:1044-1050

Osinski MT, Schrör K (2000). Inhibition of platelet-derived growth factor-induced mitogenesis by phosphodiesterase 3 inhibitors: role of protein kinase A in vascular smooth muscle cell mitogenesis. *Biochem Pharmacol*; 60(3):381-7.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987). Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature*; 327(6122):524-526.

Pellicena P, Karow DS, Boon EM, Marletta MA, Kuriyan J (2004). Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 101(35):12854–12859.

Phillips PG, Long L, Wilkins MR, Morrell NW (2005). cAMP phosphodiesterase inhibitors potentiate effects of prostacyclin analogs in hypoxic pulmonary vascular remodelling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 288: L103-L115

Polson JB, Strada SJ (1996). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 36:403-427.

Reinhard M, Jarchau T, Walter U (2001). Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem Sci.*;26(4):243-9.

Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC, Bondy CA (1995). Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest*; 95(4):1528-1538

Rubin M, Tuder RM, Marecki JC, Richter A, Fijalkowska I, Flores S (2007). Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med.*; 28(1):23-42

Schermuly RT, Roehl A, Weissmann N, Ghofrani HA, Schudt C, Tenor H, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D (2000). Subthreshold doses of specific phosphodiesterase type 3 and 4 inhibitors enhance the pulmonary vasodilatory response to nebulized prostacyclin with improvement in gas exchange. *J Pharmacol Exp Ther*; 292(2):512-520.

Schermuly RT, Roehl A, Weissmann N, Ghofrani HA, Leuchte H, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D (2001). Combination of nonspecific PDE inhibitors with inhaled prostacyclin in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 281(6):1361-1368.

Schermuly RT, Yilmaz H, Ghofrani HA, Woyda K, Pullamsetti S, Schulz A, Gessler T, Dumitrascu R, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W (2005). Inhaled iloprost reverses vascular remodeling in chronic experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.*; 172(3):358-63.

Schermuly RT, Pullamsetti SS, Breitenbach SC, Weissmann N, Ghofrani HA, Grimminger F, Nilius SM, Schrör K, Kirchrath JM, Seeger W, Rose F (2007). Iloprost-induced desensitization of the prostacyclin receptor in isolated rabbit lungs. *Respir Res.*; 8(1):4.

Schermuly RT, Stasch JP, Pullamsetti SS, Middendorff R, Müller D, Schlüter KD, Dingendorf A, Hackemack S, Kolosionek E, Kaulen C, Dumitrascu R, Weissmann N, Mittendorf J, Klepetko W, Seeger W, Ghofrani HA, Grimminger F (2008). Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2008; 32:881-891

Schmidt PM, Schramm M, Schröder H, Wunder F, Stasch JP (2004). Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.*; 279:3025-3032.

Schrör K: Prostacyclin (Prostaglandin I₂) and Atherosclerosis. In: Rubanyi G.M., Dzau V.J: *The Endothelium in Clinical Practice*, New York: Marcel Dekker, Inc., 1997.

Schrör K, Weber AA (1997). Roles of vasodilatory prostaglandins in mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Agents Actions Suppl*; 48:63-91.

Shah PK (1998). Sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. *N Engl J Med*; 339(10): 699; author reply 701-702.

Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E, Manganiello V (2001). Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*; 66:241-277.

Siegel G, Walter A, Schnalke F, Schmidt A, Buddecke E, Loirand G, Stock G (1991). Potassium channel activation, hyperpolarization, and vascular relaxation. *Z Kardiol*; 80(Suppl 7):9-24.

Siegel G, Emden J, Wenzel K, Mironneau J, Stock G (1992). Potassium channel activation in vascular smooth muscle. *Adv Exp Med Biol*; 311:53-72.

Simonneau G, Rubin LJ, Galiè N, Barst RJ, Fleming TR, Frost AE, Engel PJ, Kramer MR, Burgess G, Collings L, Cossons N, Sitbon O, Badesch DB; PACES Study Group (2008). Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized trial. *Ann Intern Med*; 149 (8): 1-38.

Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Dec 24;62(25 Suppl):D34-41

Sinzinger H, Zidek T, Fitscha P, O'Grady J, Wagner O, Kaliman J (1987). Prostaglandin I₂ reduces activation of human arterial smooth muscle cells in vivo. *Prostaglandins*; 33(6):915-918.

Skuballa W, Radbüschel B, Vorbrüggen H. (1987). Chemistry of Stable Prostacyclin Analogues: Synthesis of Iloprost. Aus: Prostacyclin and Its Stable Analogue Iloprost. (Gryglewski RJ, Stock G. Hrsg.). Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg: 17-24.

Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Hönig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H, Walter U (1998). Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem*; 273(32):20029-20035

Smyth EM, Nestor PV, FitzGerald GA (1996). Agonist-dependent phosphorylation of an epitope-tagged human prostacyclin receptor. *J Biol Chem.*; 271(52):33698-704.

Smyth EM, Austin SC, Reilly MP, FitzGerald GA (2000). Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *J Biol Chem.*; 275(41):32037-45.

Southgate K, Newby AC (1990). Serum-induced proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells from the contractile state is inhibited by 8-Br-cAMP but not 8-Br-cGMP. *Atherosclerosis.*; 82(1-2):113-23.

Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schröder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M (2001). NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*; 410(6825):212–215.

Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schröder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F (2002). NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *J Am Chem Soc.*; 124(19):5441-8.

Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, Kumar HSA, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Müller H, Turgay Y, Rothkegel C,

- Tersteegen A, Kemp-Harper B, Müller-Esterl W, Schmidt HHHW (2006). Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J. Clin. Invest.*; 116:2552-2561
- Stasch JP, Hobbs AJ (2009). NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol*; 191:277-308.
- Stasch JP, Evgenov OV (2013). Soluble guanylate cyclase stimulators in pulmonary hypertension. *Handb Exp Pharmacol.*; 218:279-313.
- Straub A, Stasch JP, Alonso-Alija C, Benet-Buchholz J, Ducke B, Feurer A, Fürstner C (2001). NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; 11:781-784.
- Tan X, Poulouse EM, Raveendran VV, Zhu BT, Stechschulte DJ, Dileepan KN (2011). Regulation of the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandin I₂ and E₂ in human coronary artery endothelial cells by curcumin. *J Physiol Pharmacol.*; 62(1):21-8.
- Taylor MS, Okwuchukwuasanya C, Nickl CK, Tegge W, Brayden JE, Dostmann WR (2004). Inhibition of cGMP-dependent protein kinase by the cell-permeable peptide DT-2 reveals a novel mechanism of vasoregulation. *Mol Pharmacol*; 65:1111-1119.
- Thorsen LB, Eskildsen-Helmond Y, Zibrandtsen H, Stasch JP, Simonsen U, Laursen BE (2010). BAY 41-2272 inhibits the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Eur J Pharmacol.*; 647(1-3):147-54.
- Torphy TJ (1998). Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med.*; 157(2):351-70.
- Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, Simonneau G, Galie N, Loyd JE, Humbert M, Nichols WC, Morrell NW, Berg J, Manes A, McGaughran J, Pauciulo M, Wheeler L (2001). Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.*; 345(5):325-34.
- Tuder RM, Abman SH, Braun T, Capron F, Stevens T, Thistlethwaite PA, Haworth SG (2009). Development and pathology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*; 54 (Suppl): 3-9
- Vane JR, Botting RM (1995). Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am J Cardiol.*; 75(3):3A-10A
- Voswinckel R et al. (2008). Acute effects of the combination of sildenafil and inhaled treprostinil on haemodynamics and gas exchange in pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther*; 21:824-832

- Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P (1999). Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol*; 83(5A): 3C-12C.
- Warner TD, Mitchell JA, Sheng H, Murad F (1994). Effects of Cyclic GMP on Smooth Muscle Relaxation. *Adv Pharmacol*; 26:171-94.
- Weber AA, Zucker TP, Hasse A, Bönisch D, Wittpoth M, Schrör K (1998). Antimitogenic effects of vasodilatory prostaglandins in coronary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*; 93 (Suppl 3):54-7.
- Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Friebe A, Schultz G, Koesling D (1995). Functional Domains of Soluble Guanylyl Cyclase. *J Biol Chem*; 270(42):24871-24875.
- Weiss HJ, Turitto VT (1979). Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood*; 53(2):244-250.
- Weissmann N, Lobo B, Pichl A, Parajuli N, Seimetz M, Puig-Pey R, Ferrer E, Peinado VI, Domínguez-Fandos D, Fysikopoulos A, Stasch JP, Ghofrani HA, Coll-Bonfill N, Frey R, Schermuly RT, García-Lucio J, Blanco I, Bednorz M, Tura-Ceide O, Tadele E, Brandes RP, Grimminger J, Klepetko W, Jaksch P, Rodriguez-Roisin R, Seeger W, Grimminger F, Barberà JA (2014). Stimulation of soluble guanylate cyclase prevents cigarette smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*.1;189(11):1359-73.
- Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson AS, Waagstein F (1993). Metabolism and Excretion of Nitric Oxide in Humans. An Experimental and Clinical Study. *Circ Res*; 73(6):1121-1127.
- Wilkins MR, Wharton J, Grimminger F, Ghofrani HA (2008). Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.*; 32(1):198-209.
- Wise H, Jones RL (1996). Focus on prostacyclin and its novel mimetics. *Trends Pharmacol Sci.*; 17(1):17-21.
- Wu CC, Ko FN, Kuo SC, Lee FY, Teng CM (1995). YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br. J. Pharmacol.*; 116:1973-1978.
- Wu CH, Chang WC, Chang GY, Kuo SC, Teng CM (2004). The inhibitory mechanism of YC-1, a benzyl indazole, on smooth muscle cell proliferation: an in vitro and in vivo study. *J Pharmacol Sci*; 94(3):252–260.

Yan H, Deshpande DA, Misior AM, Miles MC, Saxena H, Riemer EC, Pascual RM, Panettieri RA, Penn RB (2011). Anti-mitogenic effects of β -agonists and PGE₂ on airway smooth muscle are PKA dependent. *FASEB J.* 2011 Jan;25(1):389-97

Zabel U, Weeger M, La M, Schmidt HH (1998). Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme. *Biochem J*; 335(pt 1):51-7.

Zucker TP, Bönisch D, Hasse A, Grosser T, Weber AA, Schrör K (1998). Tolerance development to antimitogenic actions of prostacyclin but not of prostaglandin E₁ in coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.*; 345(2):213-20.

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum

Sebastian Willgeroth