

Zusammenfassung

Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) ist eine schwerwiegende, vaskuläre Erkrankung, die mit einer hohen Sterblichkeit einhergeht. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind multifaktoriell und bis heute nur teilweise aufgeklärt. Eine Imbalance von vasokonstriktiven und vasodilatativen Mediatoren, sowie erhöhte Wirkspiegel von Wachstumsfaktoren, pro-koagulativen und pro-inflammatorischen Botenstoffe führen zur Entstehung und Progression der Erkrankung und tragen zur Manifestation eines permanent erhöhten pulmonal arteriellen Drucks und der konsekutiven Entstehung einer rechtsventrikulären Hypertrophie bei.

Das vaskuläre Remodeling der kleinen pulmonalen Arteriolen, verursacht durch die vermehrte Proliferation und Migration von pulmonal arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen (PASMCs), spielt eine entscheidende Rolle in der Pathologie der PAH. Neuere Studien implizieren, dass die Proliferation und Migration von SMCs über die Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) über Spaltung durch Serin-Proteasen vermittelt werden kann. Insbesondere die Isoformen PAR-1 und PAR-2 sind in vaskuläre Remodeling Prozesse involviert.

Bei Patienten mit PAH zeigte sich in Lungengewebe eine erhöhte Expression von PAR-1 und PAR-2. Aktuelle Arbeiten weisen darauf

hin, dass die Koagulations- Proteasen FXa und Thrombin direkte, koagulations-unabhängige Effekte über proteolytische Spaltung von PAR-1 und PAR-2 auf Zellen ausüben.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese getestet, dass FXa und Thrombin über Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 für pulmonales vaskuläres Remodeling bedeutsam sind und somit zur Pathogenese der PH beitragen. Folglich wurde die Bedeutung von PAR-1 und PAR-2 und die Beteiligung ihrer potenziellen Aktivatoren FXa und Thrombin für die Proliferation und Migration von PSMCs *in vitro* und die experimentelle PH *in vivo* systematisch untersucht.

Zunächst wurden FXa- und Thrombin-induzierte zelluläre Effekte und nachgeschaltete Signalkaskaden in humanen und murinen PSMCs charakterisiert. Hierbei konnten sowohl FXa, als auch Thrombin, als potente Mitogene für PSMCS identifiziert werden. Während FXa zelluläre Proliferation über Aktivierung von PAR-2 induzierte, übte Thrombin seine mitogenen Effekte über PAR-1 aus. Chemotaktische Effekte wurden für beide Koagulations-Proteasen beobachtet, waren jedoch weniger stark ausgeprägt. Übereinstimmend zeigte die Analyse von nachgeschalteten zellulären Signalabläufen, dass FXa in murinen PSMCS die Signalmoleküle

ERK1/2 und AKT über PAR-2 aktiviert. Für die FXa-vermittelte Proliferation war insbesondere die Aktivierung von MEK und bedeutsam. Im Gegensatz dazu aktivierte Thrombin die Signalmoleküle ERK1/2 und AKT über PAR-1 in murinen PSMCs. Damit übereinstimmend stellten sich sowohl MEK, als auch PI3K als wichtige Signalmoleküle für Thrombin-vermittelte Proliferation in humanen PSMCs heraus. Darüber hinaus wurde SPHK-1 als ein gemeinsamer Mediator der FXa- und Thrombin-induzierten Proliferation in PSMCs identifiziert. Basierend auf den beschriebenen *in vitro* Ergebnissen, wurden die Relevanz von PAR-1 und PAR-2 sowie die Rolle von FXa und Thrombin für das pulmonale vaskuläre Remodeling und die Progression der PH *in vivo* untersucht. Hierfür wurde die Inhibition von FXa mittels Rivaroxaban und die Inhibition von Thrombin mittels Dabigatranetexilat im Maus-Modell der Hypoxie-induzierten PH analysiert. Zudem wurde die Bedeutung von PAR-1 und PAR-2 für die Progression der experimentellen PH im gleichen Modell unter Verwendung von Mäusen mit gezielten Gen-Deletionen des jeweiligen Rezeptors untersucht.

Entgegen der Erwartungen zeigte die Inhibition von FXa keinen protektiven Effekt für die Progression der Hypoxie-induzierten PH. Die Inhibition von Thrombin mittels Dabigatranetexilat führte ebenfalls zu keiner signifikanten Reduktion des rechtsventrikulären

systolischen Drucks und des vaskulären Remodelings in Mäusen. Die Analyse von PAR-1, bzw. PAR-2 defizienten Mäusen, welche chronischer Hypoxie ausgesetzt wurden, machte deutlich, dass beide Rezeptoren relevant für die Progression der Erkrankung *in vivo* sind. PAR-1 defiziente Mäuse wiesen eine signifikante Verminderung, sowohl der PH, als auch der Muskularisierung der kleinen pulmonalen Gefäße in Vergleich zu hypoxischen WT Kontrollen auf. Gleiches zeigte sich für PAR-2 defiziente Tiere, in denen ein protektiver Effekt gegen die Ausbildung der PH und des vaskulären Remodelings beobachtet wurde.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass FXa und Thrombin Aktivatoren von PAR-2, bzw. PAR-1 sind und hierüber die Proliferation und Migration von PASMCs hervorrufen. Die *in vivo* Situation betrachtend zeigte sich jedoch, dass die Inhibition von jeweils FXa oder Thrombin im hier verwendeten Modell der Hypoxie- induzierten PH nicht ausreichte um die Ausbildung der PH zu reduzieren.

Dies könnte durch die Anwesenheit von zusätzlichen Serin-Proteasen zu erklären sein, welche auch die Eigenschaft besitzen, PAR-1 und PAR-2 *in vivo* zu aktivieren. Jedoch erscheint die Inhibition auf Rezeptorebene (PAR-1 und PAR-2) ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zu sein, um die Progression der PH zu verhindern. Zusammengenommen

impliziert die vorliegende Arbeit ein pathogenes Potenzial der Koagulations-Proteasen FXa und Thrombin und weist insbesondere auf eine entscheidende Rolle der Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 für die Progression des pulmonal vaskulären Remodelings und der PH hin. Somit könnten beide Rezeptoren ein neuartiges therapeutisches Target für zukünftige Behandlungsstrategien der PH darstellen.