

**Der Einfluss von klassischen transienten Rezeptorpotential Kanälen 1/3 und 1/6  
auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion und pulmonale Hypertonie in der  
Maus**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schaffelhofer, Lisa Marie  
aus Augsburg

Gießen 2025

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Cardio-Pulmonales Institut (CPI)

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Gutachter: PD Dr. Rolf Schreckenber

Tag der Disputation: 02.02.2026

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Pulmonale Hypertonie</b> .....	1
<b>1.1.1 Definition und Klassifikation</b> .....	1
<b>1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild</b> .....	4
<b>1.1.3 Diagnostische Möglichkeiten</b> .....	5
<b>1.1.4 Therapie und Prognose</b> .....	9
<b>1.2 Chronische Hypoxie-induzierte PH</b> .....	12
<b>1.2.1 Physiologische Reaktion auf akute und anhaltende Hypoxie</b> .....	12
<b>1.2.2 Pathologische Reaktion auf chronische Hypoxie</b> .....	15
<b>1.3 Calcium und Calcium-Kanäle</b> .....	17
<b>1.4 Transient Rezeptor Potential-Ionenkanäle</b> .....	18
<b>1.4.1 Klassische TRP-Kanäle (TRPC)</b> .....	21
<b>1.4.2 TRPC in der CHPH</b> .....	22
<b>1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b> .....	23
<b>2 Material und Methoden</b> .....	24
<b>2.1 Material</b> .....	24
<b>2.1.1 Verbrauchsmaterial</b> .....	24
<b>2.1.2 Injektionslösungen/Medikamente</b> .....	25
<b>2.1.3 Materialien und Geräte für die Hämodynamik</b> .....	25
<b>2.1.4 Materialien und Geräte für die Organentnahme</b> .....	26
<b>2.1.5 Materialien und Geräte für die Echokardiographie</b> .....	27
<b>2.1.6 Geräte und Software für die Histologie</b> .....	28
<b>2.1.7 Verbrauchsmaterialien für die Histologie</b> .....	29
<b>2.1.8 Materialien für die histologische Färbung</b> .....	29
<b>2.1.9 Material und Geräte für das Hypoxiemodell</b> .....	30
<b>2.1.10 Material und Geräte für die ILU</b> .....	31

<b>2.2 Versuchstiere</b> .....	33
<b>2.2.1 Mauslinien</b> .....	33
<b>2.2.2 Versuchstierhaltung</b> .....	33
<b>2.3 Echokardiographie und Hämodynamik</b> .....	35
<b>2.3.1 Anästhesie der Maus</b> .....	35
<b>2.3.2 Echokardiographische Messung</b> .....	36
<b>2.3.3 Hämodynamische Messung</b> .....	36
<b>2.3.4 Hämatokrit-Bestimmung</b> .....	37
<b>2.3.5 Rechtsherzhypertrophie</b> .....	37
<b>2.4 Organentnahme</b> .....	37
<b>2.5 Histologie</b> .....	39
<b>2.5.1 Herstellung von PBS</b> .....	39
<b>2.5.2 Einbetten und Schneiden der Proben</b> .....	39
<b>2.5.3 Doppelfärbung gegen <math>\alpha</math>-Aktin und Von-Willebrand-Faktor</b> .....	40
<b>2.5.4 Mikroskopische Auswertung der Muskularisierung</b> .....	43
<b>2.6 Isolierte, ventilierte und blutfrei-perfundierte Lunge (ILU)</b> .....	44
<b>2.6.1 Aufbau des Messsystems</b> .....	44
<b>2.6.2 Vorbereitung des Systems</b> .....	46
<b>2.6.3 Anästhesie der Maus und Präparation</b> .....	46
<b>2.6.4 Messung der akuten und prolongierten Phase der HPV</b> .....	47
<b>2.6.5 Messung der pulmonalen Vasokonstriktion bei Zugabe von U46619 und KCl</b> .....	48
<b>2.6.6 Messung der pulmonalen Vasokonstriktion bei Zugabe von Endothelin-1</b> .....	49
<b>2.6.7 Messung der akuten Phase der HPV nach Zugabe von Inhibitoren</b> .....	49
<b>2.7 Statistik</b> .....	50
<b>3 Ergebnisse</b> .....	51
<b>3.1 Akute und prolongierte Phase der HPV in TRPC1/3<sup>-/-</sup>, TRPC1/6<sup>-/-</sup> und WT</b>	

<b>Mäusen</b> .....	51
<b>3.2 Pulmonale Vasokonstriktion nach Zugabe von U46619 oder Kaliumchlorid</b>	53
<b>3.3 Pulmonale Vasokonstriktion nach Zugabe von ET-1</b> .....	56
<b>3.4 Untersuchungen in TRPC1/3<sup>-/-</sup>, TRPC1/6<sup>-/-</sup> und WT Mäusen im Rahmen der PH-Entstehung</b> .....	57
<b>3.4.1 Einfluss von Hypoxie auf die Hämodynamik in WT, TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen</b> .....	57
<b>3.4.2 Kardiale Veränderungen nach chronischer Hypoxie-Exposition</b> .....	60
<b>3.4.3 Einfluss von Hypoxie auf das vaskuläre <i>Remodeling</i> in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen</b> .....	64
<b>3.5 Einfluss des TRPC6-Inhibitors BI-749327 in WT Mäusen</b> .....	66
<b>4 Diskussion</b> .....	68
<b>4.1 Kritische Betrachtung des verwendeten Tiermodells</b> .....	68
<b>4.2 Auswahl von TRPC1/3 und TRPC1/6 als Kandidat in der CHPH-Entstehung</b> .....	70
<b>4.3 Rolle von TRPC1/3 und TRPC1/6 in der HPV</b> .....	72
<b>4.4 Rolle von TRPC1/3 und TRPC1/6 in der chronischen Hypoxie</b> .....	74
<b>4.4.1. Der Einfluss von TRPC1/3 und TRPC1/6 auf die Entstehung von CHPH</b> .....	74
<b>4.4.2 Der Einfluss von TRPC1/3 und TRPC1/6 auf die hämodynamische und strukturelle Herzphysiologie</b> .....	78
<b>4.5 TRPC-Kanäle als potenzielle Therapiemöglichkeit</b> .....	81
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	83
<b>6 Summary</b> .....	85
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	87
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b> .....	91
<b>9 Tabellenverzeichnis</b> .....	93
<b>10 Literaturverzeichnis</b> .....	94
<b>11 Eigenständigkeitserklärung</b> .....	115

<b>12 Veröffentlichungen .....</b>	<b>116</b>
<b>13 Danksagung.....</b>	<b>117</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Pulmonale Hypertonie

### 1.1.1 Definition und Klassifikation

Die pulmonale Hypertonie (PH) umfasst eine große Gruppe an Lungenerkrankungen, welche durch einen chronisch erhöhten Gefäßwiderstand charakterisiert sind. Entscheidend ist der pulmonal-arterielle Mitteldruck (mPAP, *mean pulmonary arterial pressure*), welcher den mittleren Blutdruck in der *Arteria pulmonalis* beschreibt (Herold 2020). Der Normwert liegt bei  $14 \text{ mmHg} \pm 3 \text{ mmHg}$  und kann mittels eines Pulmonalkatheters, der in den Stamm der *Arteriae pulmonales* eingeführt wird, gemessen werden (Herold 2020; Hoeper et al. 2010; Kovacs et al. 2009; Opitz 2017). Der obere physiologische Grenzwert wird bei 20 mmHg in Ruhe festgesetzt (Kovacs et al. 2009). Bei der PH ist der mPAP definitionsgemäß  $> 20 \text{ mmHg}$  (Humbert et al. 2023). Beim 6. *World Symposium on Pulmonary Hypertension* 2018 wurde bereits beschrieben, dass bereits ein mPAP  $> 20 \text{ mmHg}$  mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht. Infolgedessen wurde die Empfehlung ausgesprochen, den Grenzwert des mPAP anzupassen, was in der neusten Leitlinie durchgeführt wurde (Galiè et al. 2019; Humbert et al. 2023).

Eine klinische Einteilung der PH erfolgt bei Patienten und Patientinnen hämodynamisch anhand des pathophysiologischen Hintergrunds in die prä- und postkapilläre PH (Galiè et al. 2016; Hoeper et al. 2010). Diese beschreibt, ob sich die kausale Erhöhung des pulmonalen vaskulären Widerstandes (PVR, *pulmonary vascular resistance*) vor oder hinter dem Kapillarbett der Lunge befindet. Zur Unterscheidung wird ebenfalls per Rechtsherzkatheter der sog. pulmonalkapilläre Wedge-Druck (PCWP, *pulmonary capillary wedge pressure*) ermittelt (Galiè et al. 2016; Herold 2020). Dabei handelt es sich definitionsgemäß bei einem PCWP  $\leq 15 \text{ mmHg}$  um eine präkapilläre PH, während ein PCWP  $> 15 \text{ mmHg}$  postkapillär bedingt ist (Galiè et al. 2016; Hoeper 2009; Hoeper et al. 2010; Opitz 2017).

Zur Identifizierung von Mischformen aus prä- und postkapillärer PH sowie einer genaueren Untergliederung der präkapillären PH werden genauer Untersuchungen benötigt. Hierzu wird unter anderem auch der PVR bestimmt (Galiè et al. 2019; Opitz 2017; Sommer et al. 2017). Der PVR ist definiert als Gefäßwiderstand im gesamten Lungenkreislauf, beginnend in den Pulmonalarterien bis zu den Pulmonalvenen und wird

in Wood-Einheiten (*Wood Units*, WU; 1 WU entspricht  $80 \text{ dynes.s.cm}^{-5}$  bzw.  $800 \mu\text{N}$ ) angegeben. Dieser Wert wird mit Hilfe des mPAP, des PCWP und zusätzlich des Herzzeitvolumens (HZV) berechnet, wodurch Veränderungen der Kreislaufzirkulation, wie etwa bei Fieber, berücksichtigt werden (Opitz 2017; Sommer et al. 2017). Die Diagnose einer kombinierten prä- und postkapillären PH und die einer pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH; *pulmonary arterial hypertension*) erfordert eine Erhöhung des PVR  $> 3$  WU (Galiè et al. 2016; Opitz 2017; Sommer et al. 2017). Eine detaillierte Aufgliederung ist in **Tabelle 1** dargestellt.

Definition	WHO-Gruppe	
<b>PH</b>	mPAP $> 20$ mmHg	
<b>Präkapilläre PH</b>	mPAP $> 20$ mmHg PCWP $\leq 15$ mmHg	1, 3-5
<b>PAH</b>	Zusätzlich PVR $> 2$ WU	
<b>Kombinierte prä- und postkapilläre PH</b>	mPAP $> 20$ mmHg PCWP $> 15$ mmHg PVR $> 2$ WU	2, 5
<b>Postkapilläre PH</b>	mPAP $> 20$ mmHg PCWP $> 15$ mmHg PVR $\leq 2$ WU	2, 5

**Tabelle 1: Hämodynamische Unterteilung der Pulmonalen Hypertonie.**

Tabellarisch dargestellt ist die hämodynamische Unterteilung der Pulmonalen Hypertonie. PH: Pulmonale Hypertonie; PAH: Pulmonalarterielle Hypertonie; mPAP: Pulmonalarterieller Mitteldruck (*mean pulmonary arterial pressure*); PCWP: Pulmonalkapillärer Wedge-Druck (*pulmonary capillary wedge pressure*); PVR: Pulmonal vaskulärer Widerstand (*pulmonary vascular resistance*); WU: Wood-Einheiten (*Wood-Units*). Verändert nach (Humbert et al. 2023), mit der Genehmigung der *European Respiratory Society*.

Aufgrund der diversen Ursachen für die Entstehung der PH wurde 2013 die Aktualisierung der Einteilung nach klinischen Kriterien anhand der sog. Nizza-Klassifikation vorgenommen (**Tabelle 2**), welche 2016 (Galiè et al. 2016) und 2020 (Herold 2020) ergänzt wurde. Hierbei wird die PH in fünf Gruppen eingeteilt, wobei die einzelnen Gruppen mehrere Unterformen der PH umfassen (Herold 2020).

WHO- Gruppe 1	WHO- Gruppe 2	WHO- Gruppe 3	WHO- Gruppe 4	WHO- Gruppe 5
PAH <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hereditäre PAH</li> <li>• Durch Medikamente/Toxine verursacht</li> <li>• Assoziierte Formen</li> </ul>	PH infolge chronischer Linksherz-erkrankungen <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ventrikuläre Dysfunktion</li> <li>• Valvuläre Erkrankungen</li> <li>• Kongenitale/erworbene Verschlüsse im Einfluss-/Ausflusstrakt</li> </ul>	PH infolge einer Lungen-erkrankung und/oder Hypoxie <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chronisch obstruktive pulmonale Erkrankungen (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>, COPD)</li> <li>• Interstitielle Lungen-krankheiten</li> <li>• Andere Lungen-krankheiten mit gemischt restriktiv/obstruktivem Muster</li> <li>• Schlafbezogen</li> <li>• Alveoläre Hypoventilationssyndrome</li> <li>• Chronischer Aufenthalt in großer Höhe</li> <li>• Fehlentwicklungen</li> </ul>	Chronisch thrombo-embolische PH (CTEPH)	PH infolge einer unklaren bzw. multifaktoriellen Genese <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hämatologische Erkrankungen</li> <li>• Systemische Erkrankungen</li> <li>• Metabolische Störungen</li> <li>• Andere</li> </ul>

**Tabelle 2: Klassifikation der PH von Nizza 2013.**

Tabellarisch dargestellt ist die Einteilung der PH in die fünf Gruppen der Nizza-Klassifikation von 2013. PH: Pulmonale Hypertonie; PAH: Pulmonal-arterielle Hypertonie; COPD: Chronisch-obstruktive pulmonale Erkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*); CTEPH: Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie

Der ersten Gruppe wird die PAH zugeordnet (Herold 2020; Hoeper et al. 2010). Die häufigste Unterform stellt die idiopathische PAH (IPAH) mit einer Inzidenz von 1 zu 100.000 dar (Herold 2020). Die IPAH macht ca. 3 % aller PH-Diagnosen aus und betrifft meist jüngere Frauen (Herold 2020). Weitere Unterformen der PAH stellen z. B. die hereditäre PAH und die PAH assoziiert mit Medikamenten, Drogen oder Toxinen dar (Herold 2020; Galiè et al. 2016; Hoeper et al. 2010).

In der zweiten Gruppe werden alle PH-Formen zusammengefasst, die mit Linksherzerkrankungen assoziiert sind, wie beispielsweise die PH bei Herzklappenerkrankungen oder angeborenen Kardiomyopathien (Herold 2020; Hoeper et al. 2010).

30 % aller PH-Erkrankungen werden der Gruppe drei zugeordnet. Hierzu gehört die PH bei obstruktiven und/oder restriktiven Lungenerkrankungen und/oder bei Hypoxie (Herold 2020; Hoeper et al. 2010). Die PH assoziiert mit Hypoxie ist Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit.

Die Gruppe vier umfasst die CTEPH. Hierbei entsteht die PH durch die Obstruktion von Pulmonalarterien aufgrund fibrosierter Thromboembolien, welche durch den Körper nicht oder nur unvollständig abgebaut werden können (Herold 2020; Hoeper et al. 2010).

Die fünfte Gruppe umfasst seltener PH-Formen mit unklarer oder multifaktorieller Genese. Hierzu gehören neben hämatologischen, systemischen und metabolischen Erkrankungen auch komplexe, angeborene Herzerkrankungen und andere Krankheiten (Herold 2020).

### **1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild**

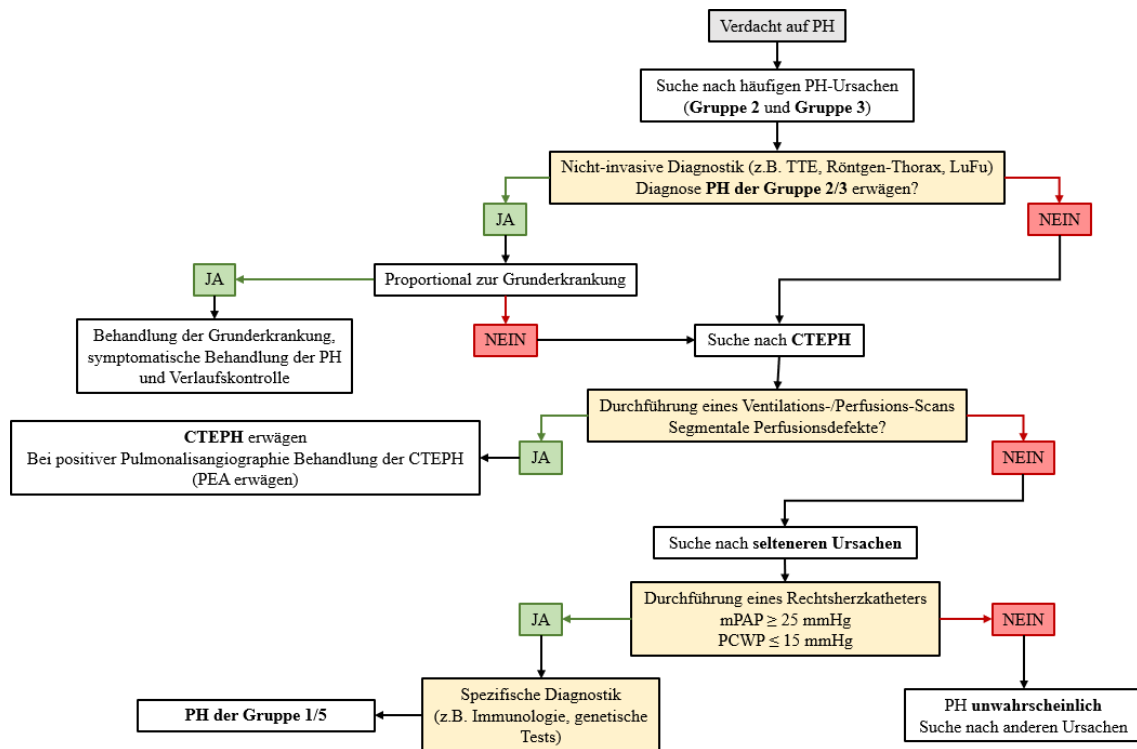
Symptomatisch äußern sich die PH-Erkrankungen in einem sehr unspezifischen klinischen Erscheinungsbild. Vor allem im frühen Stadium ist die Ausprägung der Symptomatik häufig sehr diskret und kann sich beispielsweise in Luftnot bei Belastung, Schwindel, Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Brustenge sowie Synkopen äußern (Hoeper et al. 2010; Hoeper et al. 2017; Mandras et al. 2020). Im fortgeschrittenen Erkrankungsverlauf kommt es aufgrund der Lumenverengung zu einer Erhöhung des mPAP und somit zum Rückstau des Blutes in das rechte Herz. Dies führt über die Druck- und Volumenbelastung sowohl zur Dilatation des rechten Ventrikels als auch zur

Hypertrophie des rechten Ventrikelmyokards. Hieraus entwickelt sich im weiteren Verlauf eine starke Funktionseinschränkung mit daraus resultierender Rechtsherzinsuffizienz (Herold 2020; Erdmann 2011; Rosenkranz 2011). Dies kann sich in peripheren Ödemen, einem Zuwachs des Bauchumfangs aufgrund von abdominellen Wassereinlagerungen, gestauten Halsvenen oder auch in einer Vergrößerung der Leber zeigen. Ebenso ist Luftnot in Ruhe und Herzrhythmusstörungen im fortgeschrittenen Stadium häufig zu beobachten. Ist es bei maximaler Ausprägung dieser Symptomatik dem Herzmuskel nicht mehr möglich durch einen ausreichenden Blutauswurf die Oxygenierung des Blutes zu gewährleisten, spricht man von einer Rechtsherzdekompensation (Herold 2020; Galiè et al. 2016; Hoeper et al. 2017; Rosenkranz 2011). Bei PH-Erkrankungen der Gruppe drei können zusätzlich auch Trommelschlägelfinger und Uhrglasnägel als Zeichen der chronischen Hypoxie-Exposition vorkommen (Hoeper et al. 2010; Mandras et al. 2020; Hoeper et al. 2017).

In der körperlichen Untersuchung kann zudem das Herz auskultatorisch mittels Stethoskops untersucht werden. Physiologisch können zwei Herztöne unterschieden werden, wobei der Zweite durch den gleichzeitigen Schluss der Pulmonal- und Aortenklappe hervorgerufen wird. Durch das reduzierte Gefäßlumen im Rahmen des Gefäßumbaus wird der zweite Herzton lauter, da der erschwerte Blutauswurf zu einem verzögerten Verschluss der Pulmonalklappe führt. Bei sehr starker Ausprägung des Gefäßumbaus kommt es durch einen verlängerten Abstand zwischen Aorten- und Pulmonalklappenschluss zur Spaltung des zweiten Herztons. Bei dilatiertem rechtem Ventrikel sind außerdem ein diastolisches sowie systolisches Geräusch als Ausdruck für die relative Pulmonal- und Trikuspidalklappeninsuffizienz über der jeweiligen Klappe auskultierbar (Herold 2020; Rosenkranz 2011).

### **1.1.3 Diagnostische Möglichkeiten**

Wird aufgrund der klinischen Symptomatik sowie der körperlichen Untersuchung die Verdachtsdiagnose PH gestellt, erfolgen anhand eines diagnostischen Algorithmus weitere nicht-invasive und invasive Untersuchungen (**Abbildung 1**). Mittels des Algorithmus soll nicht nur die Diagnose gestellt bzw. ausgeschlossen werden, sondern auch eine Zuordnung gemäß der Nizza-Klassifikation sowie eine Einschätzung des Schweregrades erfolgen (Rosenkranz 2011; Galiè et al. 2016).



**Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des diagnostischen Algorithmus bei Pulmonaler Hypertonie.**

Durch den Algorithmus sollen die wichtigsten Formen der PH mittels nicht-invasiver und invasiver Stufendiagnostik identifiziert werden. Hierzu sind verschiedene diagnostische Untersuchungen nötig (gelb), die je nach Resultat (grün/rot) zu unterschiedlichen weiteren diagnostischen Abklärungen und letztendlich zur Gruppenzuordnung gemäß der Nizza-Klassifikation führen. PH: Pulmonale Hypertonie; TTE: Transthorakale Echokardiografie; LuFu: Lungenfunktions-Test; CTEPH: Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie; PEA: Pulmonale Endarteriektomie; mPAP: *mean pulmonary arterial pressure* (mittlerer pulmonalarterieller Druck); PCWP: Pulmonalkapillärer Wedge-Druck (*pulmonary capillary wedge pressure*). Verändert nach (Hoendermis 2011), *Open Access*.

Initial werden nicht-invasive Untersuchungsmethoden eingesetzt. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die transthorakale Echokardiografie (TTE), mittels welcher sowohl die rechten Herzabschnitte ausgemessen als auch der systolische PAP ( $PAP_{sys}$ ) abgeschätzt werden kann. Mittels des TTE kann die Diagnose PH nicht sichergestellt werden, allerdings kann die gemeinsame Betrachtung verschiedener Werte auf eine PH hinweisen und eine weiterführende Diagnostik sollte veranlasst werden. So können  $PAP_{sys}$  Werte  $> 35$  mmHg in Zusammenschau mit vergrößerten rechten Herzhöhlen, erweiterten Pulmonalarterien sowie einer Rechtsherzhypertrophie auf eine PH hindeuten (Galiè et al. 2016; Rosenkranz 2011; Hoeper et al. 2010; Herold 2020).  $PAP_{sys}$  Werte  $> 50$  mmHg machen eine Diagnose von PH sehr wahrscheinlich (Herold 2020). Bei der TTE wird zusätzlich das linke Herz (z. B. linksventrikuläre Funktion und Klappenfunktion)

untersucht, wodurch Linksherzerkrankungen erkannt oder ausgeschlossen werden können (Hoepfer et al. 2010). Ergibt sich im TTE unter Berücksichtigung aller erhobenen Messwerte eine geringe Wahrscheinlichkeit einer PH-Erkrankung, sind keine weiteren diagnostischen Schritte nötig. Kann durch das TTE eine mittlere bis hohe Wahrscheinlichkeit für die Diagnose der PH ermittelt werden, folgen weitere invasive Untersuchungen, um gemäß des diagnostischen Algorithmus zunächst die häufigsten Ursachen einer PH, nämlich Linksherz- und Lungenerkrankungen, zu überprüfen (Galiè et al. 2016).

Um Linksherzerkrankungen zu diagnostizieren, können neben dem TTE auch das Elektrokardiogramm (EKG) Hinweise liefern und es kann die Proteinmenge des N-terminalen Pro-natriuretische Peptid Typ B (NT-proBNP, *brain natriuretic peptide*) bestimmt werden. Beides dient aufgrund der mittlerweile guten echokardiographischen Auflösung nur der Grunddiagnostik, welche durch das TTE weiter untersucht werden muss. Im EKG können u.a. Zeichen der Links- und Rechtsherzhypertrophie bestimmt werden, wie beispielsweise eine veränderte Erregungsrückbildung oder die Veränderung des Lagetyps. Diese Veränderungen kommen durch die Hypertrophie der Ventrikelmuskulatur zustande, was zu einer verspäteten Erregung und damit auch zu einer verspäteten Kontraktion der entsprechend betroffenen Ventrikel führt. Dennoch ist ein unauffälliges EKG kein Ausschlusskriterium für die Diagnose einer PH. Wichtig ist vor allem der Vergleich der EKGs bei PH-Verdacht mit früheren EKGs, um Veränderungen besser beurteilen zu können (Herold 2020; Galiè et al. 2016; Rosenkranz 2011). Das NT-proBNP wird durch die Dehnung der Ventrikel bei Volumenbelastung freigesetzt und besitzt eine hohe Probenstabilität, weshalb dieser der Parameter der Wahl ist. Die Bestimmung des NT-proBNP-Wertes ist allerdings nicht spezifisch für PH, weshalb bei einer Erhöhung weitere diagnostische Maßnahmen notwendig sind. Ist sowohl das EKG als auch der NT-proBNP-Wert unauffällig, wird die Wahrscheinlichkeit, an einer PH erkrankt zu sein, als gering eingestuft (Herold 2020; Rosenkranz 2011; Hoepfer et al. 2017; Hoepfer et al. 2010).

Eine weitere nicht-invasive Untersuchungsmethode stellt ein Röntgen-Thorax dar. Die Aussagekraft ist jedoch sehr von der Erkrankungsdauer und der Ätiologie abhängig, weshalb ein physiologisches Röntgenbild eine PH-Erkrankung nicht ausschließen kann. Zu den radiologischen Merkmalen, die auf eine PH hindeuten, zählen eine Rechtsherzvergrößerung, eine Rarefizierung der Blutgefäße in der Lungenperipherie und

erweiterte zentrale Lungenarterien mit einem prominenten *Truncus pulmonalis* (Herold 2020; Rosenkranz 2011; Hoeper et al. 2010). Mit Hilfe eines Röntgen-Thorax ist es möglich, Lungen- oder Linksherzerkrankungen zu erwägen bzw. auszuschließen, welche für die radiologischen Merkmale ursächlich sind und somit ein Hinweis für eine PH-Erkrankung darstellen. Zur weiteren Diagnose von Lungenerkrankungen können ein Lungenfunktionstest, eine arterielle Blutgasanalyse, eine Computertomographie sowie eine Spiroergometrie erfolgen (Galiè et al. 2016). Dabei eignet sich die Spiroergometrie besonders gut zur Früh- und Verlaufsdagnostik, da Störungen des Gasaustausches bereits in milden Stadien nachweisbar sind (Yasunobu et al. 2005).

Können weder pulmonale noch kardiale Erkrankungen festgestellt werden bzw. den Schweregrad der vorliegenden PH erklären, muss eine mögliche CTEPH mit Hilfe einer Ventilations-/Perfusionsszintigraphie untersucht werden (Hoeper et al. 2010; Galiè et al. 2016). Diese äußert sich in der Szintigraphie durch segmenttypische Perfusionsausfälle (Herold 2020). Beim Verdacht auf eine CTEPH sollte außerdem eine Pulmonalisangiographie erfolgen, bei welcher durch Gabe von Kontrastmittel selektiv die Blutgefäße in der Computertomographie dargestellt werden können (Galiè et al. 2016; Pitton et al. 2002). Kann die CTEPH in der Szintigraphie ausgeschlossen werden, müssen seltenere Ursachen einer PH-Erkrankung mit Hilfe von weiteren Blutuntersuchungen, einer Immunologie, einer Magnetresonanztomographie oder genetische Tests evaluiert werden.

Die PH-Diagnosesicherung sowie die weitere Bestimmung der Ätiologie und des Schweregrades erfolgt mittels einer Rechtsherzkatheter-Untersuchung (Rosenkranz 2011; Herold 2020; Galiè et al. 2016). Durch das Einbringen eines Einschwemmkatheters über eine zentrale (*Vena jugularis*) oder eine periphere Vene (bevorzugt die *Vena femoralis*) wird der mPAP und der PCWP gemessen. Zudem kann während der Rechtsherzkatheter-Untersuchung eine Vasoreagibilitätsmessung erfolgen, welche der Überprüfung dient, ob ein Patient oder eine Patientin mit Calciumantagonisten behandelt werden kann. Da eine Behandlung mit Calciumantagonisten bei IPAH-Patienten und -Patientinnen gute Erfolge zeigt, ist eine Vasoreagibilitätsmessung bei einer neu diagnostizierten IPAH obligat. Bei Vasoreagibilitätsmessungen werden Substanzen verwendet, die sicher, potent und kurzwirksam sind. Meist kommt dabei inhalatives Stickstoffmonoxid bzw. niedrigdosiert das inhalative Prostacyclin-Analogon Iloprost zum Einsatz, welches thrombozytenaggregationshemmend und vasodilatierend wirkt.

Iloprost kann im Anschluss therapeutisch in höherer Dosierung genutzt werden (Ewert et al. 2011; Rosenkranz et al. 2011). Sowohl bei Stickstoffmonoxid als auch bei Iloprost wird bei Abfall des mPAPs um  $> 10$  mmHg vom Ausgangswert auf Werte  $< 40$  mmHg bei normalem HZV von einem sog. *Responder* gesprochen. Diese Gruppe macht ca. 15 % der Patienten und Patientinnen aus, wovon letztlich ca. 7 % von einer Behandlung mit Calciumkanalantagonisten profitieren (Hoeper et al. 2010; Rosenkranz 2011; Rosenkranz et al. 2011).

#### **1.1.4 Therapie und Prognose**

Die wesentliche Therapie ist symptomatisch orientiert und abhängig von der Ätiologie, dem Schweregrad und der individuellen Konstitution des Patienten bzw. der Patientin (Hoeper et al. 2017). Unabhängig von der Ätiologie der PH ist es wichtig, die Patienten und Patientinnen an ein PH-Zentrum anzubinden (Herold 2020; Hoeper et al. 2010; Humbert et al. 2022). An diesen Zentren kann sowohl die Diagnose als auch die Therapie aller PH-Formen eigenständig und leitlinienkonform durchgeführt werden (Hoeper et al. 2010). Im Allgemeinen sollen Betroffene eine Schwangerschaft sowie körperliche Überanstrengung meiden und neben Impfungen gegen Influenza, Pneumokokken sowie SARS-CoV-2 (schweres-akutes-Atemwegsyndrom-Coronavirus Typ 2, *severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*) auch psychosoziale Unterstützung erhalten (Rosenkranz 2011; Humbert et al. 2022).

Die Behandlung von PAH zeigte dabei in den letzten Jahren deutliche Fortschritte (Rosenkranz 2011). Zunächst wird eine supportive Therapie zur Verbesserung der Symptomatik begonnen. Hierzu zählen beispielsweise die Gabe von Diuretika und Flüssigkeitsrestriktion zur Behandlung von Ödemen bei Zeichen eines Rechtsherzversagens. Außerdem wird eine Behandlung mit Sauerstoff bei dauerhaften Partialdrücken  $< 60$  mmHg und eine orale Antikoagulation empfohlen. Zudem erfolgt bei den Patienten und Patientinnen, die sich im Rahmen der Vasoreagibilitätsmessung als *Responder* gezeigt haben, die gezielte Therapie mittels hochdosierter Calciumkanalantagonisten, da bei ausreichendem Ansprechen auf diese Therapie von einer verhältnismäßig günstigen Prognose auszugehen ist (Humbert et al. 2022; Rosenkranz 2011; Milger-Kneidinger und Held Matthias 2024). Die *Non-Responder* können hingegen mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (z. B. Bosentan),

Phosphodiesterase-5-Hemmer (z. B. Sildenafil), Guanylatcyclase-Stimulatoren (z. B. Riociguat), Prostacyclin-Analoga (z. B. Iloprost) oder Prostacyclin-Rezeptoragonisten (z. B. Selexipag) therapiert werden (Hoepfer et al. 2017; Humbert et al. 2022; Milger-Kneidinger und Held Matthias 2024). Hierbei ist es wichtig die Therapie in regelmäßigen Abständen auf ihre Wirksamkeit sowie möglichen Nebenwirkungen zu überprüfen. Dies erfolgt zu Beginn in vier bis zwölf wöchentlichen Abständen und später in einem Abstand von drei bis sechs Monaten (Hoepfer et al. 2017). Bei unzureichendem Effekt wird die Therapie eskaliert. Hierfür stehen die Behandlung auf einer Intensivstation mit ständiger Überwachung des Allgemeinzustandes sowie eine Kombination der zugelassenen Medikamente zur Verfügung. Bei schwerer Rechtsherzdekompensation ist außerdem eine Ballon-Atrioseptostomie möglich, bei welcher zu Reduktion der Druck- und Volumenbelastung eine Verbindung zwischen linkem und rechtem Vorhof geschaffen wird. Diese chirurgische Intervention dient jedoch lediglich der palliativen Behandlung bzw. als Maßnahme bis zur Lungentransplantation, welche als *Ultima Ratio* bei klinisch unzureichendem Ansprechen trotz maximaler Therapie möglich ist (Humbert et al. 2022; Rosenkranz 2011; Galiè et al. 2016). Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Transplantaten sowie des hohen Operationsrisikos wird vorrangig die medikamentöse Therapie angestrebt (Rosenkranz 2011). Die Drei- bzw. Fünf-Jahres-Überlebensrate nach Lungentransplantation liegt lediglich bei 55 % bzw. 45 % (Trulock et al. 2004). Allgemein liegt die Drei-Jahres-Überlebensrate der therapierten PAH bei ca. 70 – 80 % (Herold 2020).

Für andere PH-Gruppen sind die PAH-Medikationen eingeschränkt nutzbar. Vor allem in Gruppe zwei und drei zeigte die Behandlung mittels PAH-spezifischen Medikamenten teils keine oder sogar negative Effekte. Im Vordergrund steht die Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung (Rosenkranz 2011; Hoepfer et al. 2017; Humbert et al. 2022). Im Falle der PH aufgrund einer Linksherzerkrankung liegt die leitliniengerechte Therapie der Herzinsuffizienz und deren Ursachen im Fokus, wie beispielsweise die Versorgung der Aortenklappe bei Aortenklappenstenose (Rosenkranz 2011; Humbert et al. 2022). Aufgrund der erschwerten Diagnose sowie den begrenzteren Therapiemöglichkeiten im Vergleich zur PAH ist die Prognose deutlich schlechter. Die PH bleibt häufig trotz Ausschöpfung der maximalen Therapie weiterhin bestehen (Naeije und D'Alto 2016; Rosenkranz 2011). Auch bei der Therapie der Gruppe drei liegt der Fokus auf der Behandlung der Grunderkrankung. Außerdem wird eine chronische

Sauerstoffgabe von über 15 Liter pro Tag bei vorliegender chronischer Hypoxämie empfohlen. Als *Ultima Ratio* sollte nach Möglichkeit auch immer die Listung zur Lungentransplantation erwogen werden (Rosenkranz 2011; Humbert et al. 2022; Galiè et al. 2016). Die Prognose der PH bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie ist aufgrund mangelnder therapeutischer Möglichkeiten mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von ca. 38 % deutlich schlechter als bei der PAH. Im Falle einer PH assoziiert mit COPD liegt die Prognose noch schlechter und zwar mit einer Drei-Jahres-Überlebensrate von lediglich ca. 33 % bei ausgeprägter Erkrankung (King und Shlobin 2020; Cassady und Reed 2019).

Die CTEPH zeigt bezüglich des therapeutischen Vorgehens sowie der Prognose im Vergleich zu den anderen PH-Formen erhebliche Unterschiede. Durch die operative Behandlungsmöglichkeit mittels pulmonaler Endarteriektomie (PEA) ist die CTEPH bei moderatem perioperativen Mortalität von 2 – 4 % in erfahrenen Zentren potentiell heilbar (Rosenkranz 2011; Hoeper et al. 2017). Entscheidend ist die Operabilität der Patienten und Patientinnen, welche abhängig vom Allgemeinzustand dieser sowie der Lage der Gefäßobstruktion ist. Je proximaler die Obstruktion liegt, umso besser ist sie chirurgisch zu erreichen (Rosenkranz 2011). Die Entscheidung über die Operabilität sollte dabei von einem multidisziplinären Expertenteam erfolgen (Rosenkranz 2011; Galiè et al. 2016; Hoeper et al. 2017). Zurzeit sind ca. 50 – 70 % aller CTEPH-Patienten und -Patientinnen operabel (Hoeper et al. 2017). Aufgrund der guten Prognose sollte allen Patienten und Patientinnen mit annehmbarem Risiko eine Operation angeboten werden. Die Drei-Jahres-Überlebensrate liegt nach PEA bei durchschnittlich 90 % (Humbert et al. 2022). Außerdem zeigt sich postoperativ eine deutlich bessere Lebensqualität, unabhängig von der Lage der Gefäßobstruktion. Auch bei der Fünf-Jahres-Überlebensrate ist im Vergleich ein enormer Unterschied zu beobachten. Nach PEA zeigen die Patienten und Patientinnen eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von ca. 83 %, während ohne Operation trotz Operabilität diese nur bei ca. 53 % liegt (Humbert et al. 2022). Neben der PEA stehen auch noch medikamentöse sowie interventionelle Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Diese sollten bei Inoperabilität, ungünstigem operativem Nutzen-Risiko-Verhältnis sowie bei unzureichendem Effekt nach PEA berücksichtigt werden. Dabei zeigen vor allem die Behandlung mit Riociguat und die pulmonale Ballon-Angioplastie ein günstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis (Humbert et al. 2022; Hoeper et al. 2017; Galiè et al. 2016), wobei Letzteres zu einer stärkeren Reduktion des Gefäßwiderstandes als Riociguat führt

(Humbert et al. 2022; Jaïs et al. 2022). Insgesamt konnte beobachtet werden, dass vor allem eine multimodale Therapie bestehend aus chirurgischen, medikamentösen und interventionellen Komponenten potentielle Vorteile bei inoperabler CTEPH aufweist (Humbert et al. 2022; Jaïs et al. 2022). Unabhängig von der Operabilität der Patienten und Patientinnen ist eine lebenslange Antikoagulation obligat (Galiè et al. 2016; Humbert et al. 2022; Hoepfer et al. 2017).

Zusammenfassend zeigen die PAH sowie die CTEPH aufgrund der vielfältigen Behandlungsmöglichkeiten die besten Prognosen. Die Prognose bei chronisch Hypoxie-induzierter PH (CHPH) ist aufgrund der mangelnden kurativen Therapiemöglichkeiten daher deutlich schlechter.

## **1.2 Chronische Hypoxie-induzierte PH**

Die hier untersuchte PH-Form der Gruppe drei wird durch chronische Hypoxie Exposition ausgelöst. Hypoxie wird als Minderversorgung des Körpers bzw. einzelner Körperabschnitte und Zellen mit Sauerstoff definiert. Ein verminderter Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) tritt bei Aufenthalt in großen Höhen auf, in denen der  $pO_2$  der Umgebungsluft bereits reduziert ist und es zur alveolären Hypoxie kommt. Es kann aber auch bei Lungenerkrankungen, die mit Ventilationsstörungen oder einem gestörten Gasaustausch assoziiert sind, zur alveolären Hypoxie oder zur Hypoxämie (Sauerstoffmangel im arteriellen Blut) kommen (Schmidt 2007; Silbernagl und Despopoulos 2007). Um einen effizienten Sauerstoffaustausch für die ausreichende Versorgung des Körpers zu gewährleisten, existieren in der Lunge bestimmte Regulationsmechanismen (Schmidt 2007; Silbernagl und Despopoulos 2007; McLoughlin 2018).

### **1.2.1 Physiologische Reaktion auf akute und anhaltende Hypoxie**

Physiologisch herrscht in den Lungenalveolen ein  $pO_2$  von ca. 90 – 100 mmHg, bei welchem auch > 95 % des Hämoglobins, dem Transportmolekül des Sauerstoffs, oxygeniert sind (Schmidt 2007). Alveoläre Hypoxie tritt in der Lunge bei erniedrigten  $pO_2$ -Werten der Umgebungsluft auf. Ein verminderter  $pO_2$  führt in den Alveolen zu einer reduzierten Sauerstoffaufnahme des Blutes, wodurch es zur Hypoxämie in den entsprechenden Blutgefäßen kommt. Die Konsequenz ist eine Minderversorgung des

Körpers mit Sauerstoff (Schmidt 2007; Silbernagl und Despopoulos 2007; McLoughlin 2018). Um lokal auftretender alveolärer Hypoxie entgegenzuwirken, reagieren die Lungengefäße auf erniedrigte  $pO_2$ -Werte mit einer hypoxischen, pulmonalen Vasokonstriktion (HPV), auch bekannt als Euler-Liljestrand-Mechanismus, wodurch es zu einer reduzierten lokalen Perfusion dieser Lungenareale kommt. Durch die Anpassung der Perfusion an die Ventilation kann so ein effizienter Sauerstoffaustausch gewährleistet werden (Herold 2020; McLoughlin 2018; Schmidt 2007; Silbernagl und Despopoulos 2007).

Die Dauer der HPV hängt von der Dauer der auftretenden alveolären Hypoxie ab. Bei kurzzeitiger Hypoxie kommt es im Rahmen der HPV zur direkten Reaktion der glatten Muskelzellen der Pulmonalgefäße mittels Vasokonstriktion, wodurch sich bei generalisierter alveolärer Hypoxie das Gesamt-Gefäßvolumen reduziert und der PVR sowie der mPAP ansteigen (Talbot et al. 2005; Lumb und Slinger 2015; Leach et al. 1994; Malczyk et al. 2013; McLoughlin 2018). Bei anhaltender Hypoxie erfolgt die Vasokonstriktion in zwei Phasen. Zunächst reagieren die pulmonalen Gefäße akut auf die auftretende alveoläre Hypoxie (akute Phase) mit einer Vasokonstriktion. Bei anhaltender alveolärer Hypoxie kommt es nach 10 – 15 Minuten (Min.) zum Abfall der Vasokonstriktion und es kommt zu einer zweiten Phase (prolongierte Phase), bei der die Vasokonstriktion erneut, jedoch langsamer ansteigt (Leach et al. 1994; Sylvester et al. 2012).

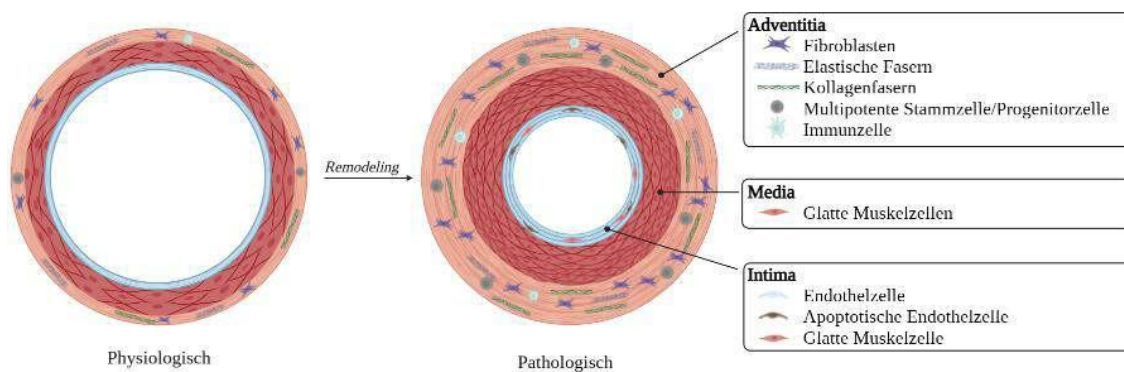
Von zentraler Bedeutung für die HPV sind die glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien (PASMCs, *pulmonary artery smooth muscle cells*), die durch Vasokonstriktion zur Verringerung des Gefäßquerschnitts und so bei generalisierter alveolärer Hypoxie zu einem erhöhten PVR und mPAP führen. Während kurzzeitiger Hypoxie kommt es in PASMCs zu einem Anstieg von Calcium vermittelt durch Kalium- ( $K^+$ -Kanäle) und Calcium-Kanäle ( $Ca^{2+}$ -Kanäle) (Dunham-Snary et al. 2017). Durch  $K^+$ -Kanäle wird durch den Austausch von intra- und extrazellulär vorliegenden Ionen ein Ruhemembranpotential von ca. -60 mV aufrechterhalten. Bei -60 mV sind spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle verschlossen. Da Hypoxie den nach extrazellulär gerichteten  $K^+$ -Strom inhibiert, wird das Membranpotential depolarisiert, was zur Aktivierung von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen und damit zum Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen führt. Die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt letztlich zur Kontraktion der PASMCs und zur akuten HPV (Dunham-Snary et al. 2017; Post et al.

1992; Harder et al. 1985; Olschewski et al. 2002). Neben spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen spielen auch andere Ionen-Kanäle hinsichtlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase eine entscheidende Rolle. So kommt es z. B. durch die Deletion des unselektiven Kationen-Kanal *classical transient receptor potential* (TRPC) 6 bei alveolärer Hypoxie zu keiner alveolären Vasokonstriktion (Weissmann et al. 2006). Die genaue Signalkaskade und die molekularen Mechanismen, die zur akuten HPV führen, sind bis dato noch nicht vollständig geklärt (Ward und McMurtry 2009; Sommer et al. 2016; Pak et al. 2022).

In der prolongierten Phase kommt es durch anhaltende Hypoxie zur Freisetzung von Endothelin-1 (ET-1), einem vasokonstriktiven Mediator aus den pulmonalarteriellen Endothelzellen (EC, *endothelial cells*) und zur Aktivierung von Rho-Kinasen in PSMCs (Aaronson et al. 2006; Kizub et al. 2013). Beide Mechanismen sind mit einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung verbunden (Sauvageau et al. 2007; Pepke-Zaba und Morrell 2005; Malczyk 2017; McCulloch et al. 1996; Lumb und Slinger 2015; Robertson et al. 2003; Shimoda et al. 2002). Außerdem kommt es bei anhaltender Hypoxie zu einer gesteigerten Kontraktionsfähigkeit der PSMCs, was wiederum bei generalisierter Hypoxie zu einem erhöhten PVR führt (Ward und McMurtry 2009; Robertson et al. 1995). ET-1 ist ein wichtiger Vasokonstriktor im Mechanismus der HPV und vermutlich für den langsamen, kontinuierlichen mPAP-Anstieg in der prolongierten Phase verantwortlich (Shimoda et al. 2002). ET-1 bindet an die  $\text{ET}_A$ - und  $\text{ET}_B$ -Rezeptoren, die von PSMCs exprimiert werden, wobei  $\text{ET}_B$  vorwiegend auch von EC exprimiert werden (Levin 1995; Zamora et al. 1993; Ozen et al. 2020; Davenport et al. 2016). Die Aktivierung der  $\text{ET}_A$ -Rezeptoren führt zu einer Vasokonstriktion (McCulloch et al. 1996; Yoshiyashi et al. 1991; Davenport et al. 2016; Shimoda et al. 2002; Kourembanas et al. 1991; Seo et al. 1994), wohingegen die Aktivierung von  $\text{ET}_B$ -Rezeptoren eine Vasodilatation auslöst (Hall et al. 2011; Ozen et al. 2020; Seo et al. 1994). Das Zusammenspiel von  $\text{ET}_A$ - und  $\text{ET}_B$ -Rezeptoren sorgt für eine physiologische Reaktion auf Hypoxie (Ozen et al. 2020; Davenport et al. 2016). Neben der Vasokonstriktion führt langanhaltende Hypoxie zur Proliferation von  $\text{ET}_A$ - und  $\text{ET}_B$ -Rezeptoren, weshalb die Rolle von ET-1 in der akuten Phase der HPV diskutiert wird (Ozen et al. 2020), insbesondere da ET-1 zu einer Aktivierung der Phospholipase C führt, die mit der Inhibition von K-Kanälen und der Aktivierung von *transient receptor potential* (TRP)-Kanälen assoziiert ist (Shimoda et al. 2002; Shimoda et al. 1998, 2000; Peng et al. 1998; Hyvelin et al. 1998; Liu et al. 2001; Turner und Kozlowski 1997).

## 1.2.2 Pathologische Reaktion auf chronische Hypoxie

Tritt alveoläre Hypoxie über mehrere Tage, Wochen oder Monate auf, so führt dies zu einer dauerhaften Vasokonstriktion sowie zu Umbauprozessen in den pulmonalen Gefäßen (vaskuläres *Remodeling*). Dieser Umbau der Lungenarchitektur ist pathologisch, irreversibel und ursächlich für die Entstehung der CHPH (**Abbildung 2**) (Renna et al. 2013; Tuder et al. 2013a).



**Abbildung 2: Vaskuläres *Remodeling*.**

Dargestellt ist ein Querschnitt durch eine gesunde (links) und eine pathologische (rechts) pulmonale Arteriole. Das physiologische Lungengefäß besteht aus *Tunica adventitia*, *Tunica media* und *Tunica intima* bestehend aus unterschiedlichen Zelltypen wie Fibroblasten, elastischen Fasern, glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Im Rahmen des *Remodelings* kommt es zu einer vermehrten Einlagerung von Fibroblasten, elastischen Fasern, Kollagenfasern, multipotenten Stammzellen sowie Immunzellen in die *Tunica adventitia* und damit zu einer Verdickung dieser Gefäßschicht. Weiterhin kann eine Hyperplasie der PSMCs der *Tunica media* festgestellt werden. In der *Tunica intima* kommt es ebenfalls zu Veränderungen. Es ist eine Zunahme von lebenden sowie apoptotischen Endothelzellen und eine Einwanderung von PSMCs zu beobachten. Alle Veränderungen resultieren in einem reduzierten Gefäßdurchmesser. Dieses *Remodeling* tritt z. B. im Rahmen chronischer Hypoxie-Zustände auf und führt so zum Krankheitsbild der CHPH. Verändert nach (Ejikeme und Safdar 2024), *Open Access*, Lizenzlink: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Das vaskuläre *Remodeling* ist bei PH in den unterschiedlichen Gruppen mehr oder weniger in allen drei Gefäßschichten zu beobachten (Tuder 2017; Pietra et al. 2004). Die *Tunica intima* als Grenze zwischen Intra- und Extrazellulärraum wird vom Endothel und der subendothelialen Schicht gebildet und enthält physiologisch nur wenige Zellen. Sie besteht vor allem aus ECs, Extrazellulärmatrix (EZM) sowie elastischen Fasern (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Es konnte festgestellt werden, dass die Höhe der durch EC freigesetzten ET-1-Konzentration mit der Krankheitsschwere der PH korreliert

(Carratu et al. 2008; Kwon et al. 2010; Ozen et al. 2020; Rubens et al. 2001). Außerdem kommt es beim *Remodeling* in der PAH zu einer unterschiedlich ausgeprägten Verdickung der *Tunica intima* (Chazova et al. 1995; Tudor 2017). Ein Hauptfaktor hierfür ist die Einwanderung von Muskelzellen aus der *Tunica media*, welche anschließend proliferieren, kontrahieren und EZM produzieren (Lüllmann-Rauch und Asan 2019; Tudor 2017).

Von zentraler Bedeutung für die CHPH im vaskulären *Remodeling* ist die *Tunica media*, welche den größten Anteil des Gefäßes darstellt. Sie ist aus PASMCs und EZM aufgebaut (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Über den Tonus der PASMCs wird die Lumenweite der Gefäße gesteuert, wodurch Einfluss auf den PVR genommen wird (Lüllmann-Rauch und Asan 2019; Tudor 2017). Im Rahmen des vaskulären *Remodelings* treten außerdem eine Hyperplasie der PASMCs sowie vermehrte Bindegewebsablagerungen auf (Chazova et al. 1995; Tudor 2017). Präkapilläre pulmonale Gefäße sind physiologisch nicht- oder teil-muskularisiert. Chronische Hypoxie führt durch Hyperplasie, Migration und Proliferation der PASMCs zur Mediahypertrophie, wodurch diese Gefäße zunehmend muskularisieren, was als de-novo-Muskularisation bezeichnet wird (Chazova et al. 1995; Eddahibi et al. 1999; Eddahibi et al. 2001; Song et al. 2021; Tian et al. 2021a).

Des Weiteren weist bei manchen PH-Formen, wie der IPAH, auch die äußere Gefäßschicht, die *Tunica adventitia*, Veränderungen im Rahmen des vaskulären *Remodelings* auf (Chazova et al. 1995; Tudor 2017). Die *Tunica adventitia* besteht aus Fibroblasten, Proteoglykanen sowie elastischen und kollagenen Fasern und sorgt so für die physiologische Verankerung des Gefäßes in seiner Umgebung. Sie enthält zudem kleine Gefäße, welche die Gefäßwand selbst versorgen (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Durch das vaskuläre *Remodeling* erhöht sich aufgrund von Zellproliferation und Kollagenablagerung die Dicke der äußeren Gefäßwand, was ebenfalls zu einer Verkleinerung des Gefäßlumens führt (Chazova et al. 1995; Tudor 2017). Die Zunahme der Gefäßwanddicke wurde in Studien sowohl für die PAH als auch für die CHPH nachgewiesen (Stenmark et al. 2006; Meyrick und Reid 1979). Des Weiteren wandern vor allem in die *Tunica adventitia* verschiedene Immunzellen ein, welche über eine interstitielle sowie perivaskuläre Inflammation die Hämodynamik und das vaskuläre *Remodeling* in allen Gefäßschichten beeinflussen. Die exakte Aufschlüsselung, wie die Immunzellen am Pathomechanismus des vaskulären *Remodelings* beteiligt sind, ist bisher jedoch noch nicht bekannt (Tuder et al. 2013b; Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

Zudem wirken während des vaskulären *Remodelings* lokale Wachstumsfaktoren, vasoaktive Substanzen, Entzündungszellen und hämodynamische Reize (Renna et al. 2013; Tudor 2017; Gibbons und Dzau 1994), welche unter anderem zum Zellwachstum, zur Apoptose von EC, zur Migration von PSMCs sowie zur Neusynthese bzw. zum Abbau von EZM führen. All diese Mechanismen spielen zusätzlich zu den oben genannten Mechanismen eine wichtige Rolle im Rahmen des vaskulären *Remodelings* (Renna et al. 2013; Gibbons und Dzau 1994; Tudor et al. 2013a).

Insgesamt führen alle genannten Mechanismen zur Verdickung der Gefäßwand sowie zu einer Verringerung des Gefäßlumens, was zu einer Erhöhung des PVR führt (Tuder et al. 2013b; Klinke 2005). Außerdem trägt die HPV zusätzlich entscheidend hierzu bei (Talbot et al. 2005; Lumb und Slinger 2015; Leach et al. 1994; McLoughlin 2018; Sylvester et al. 2012). Das Gefäßlumen wird dementsprechend zeitgleich durch HPV und durch das vaskuläre *Remodeling* verengt (Tuder et al. 2013b).

### **1.3 Calcium und Calcium-Kanäle**

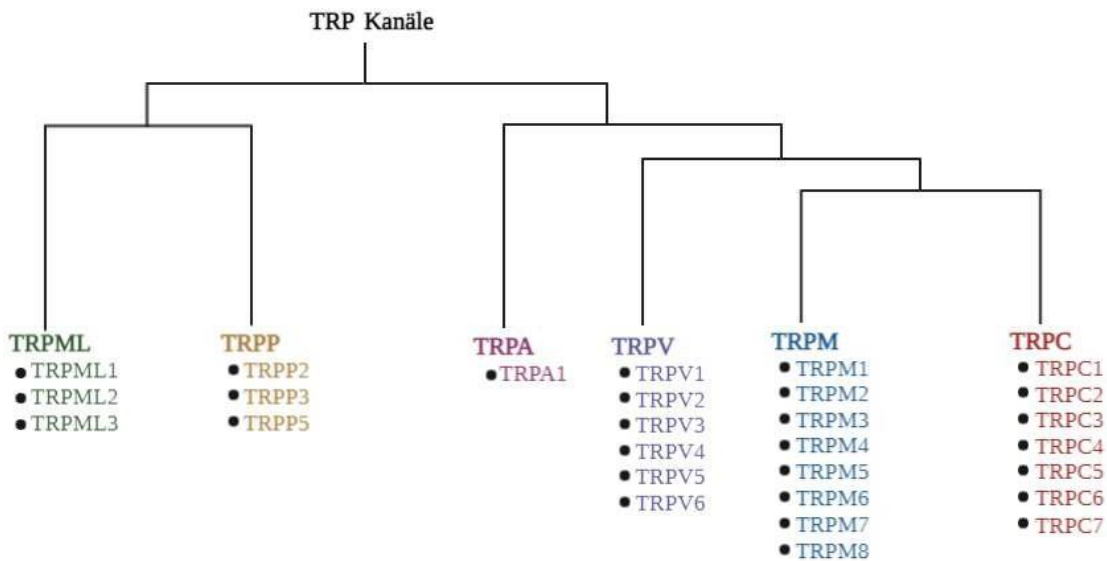
Im Fokus der Pathologie von CHPH stehen die im *Remodeling* involvierten PSMCs. Ein wichtiger Messenger in der Regulation von Kontraktion, Migration sowie Proliferation der PSMCs ist  $\text{Ca}^{2+}$ . Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) der PSMCs wird über verschiedene Ionen-Kanäle moduliert, wie z. B. über TRP-Kanäle. Zentrale Bedeutung im Rahmen der Vasokonstriktion durch die PSMCs bei HPV spielt dabei das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Calmodulin. Durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin wird die Myosin-leichte-Ketten-Kinase vermehrt phosphoryliert, was zu einer gesteigerten Aktivität dieser führt. Die Funktion der Myosin-leichte-Ketten-Kinase ist die Veränderung der Myosinstruktur. Myosin und Aktin, als kontraktile Filamente der Muskelzellen, können ohne elektrischen bzw. chemischen Reiz, wie die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , nicht miteinander interagieren, da sie durch Begleitproteine wie Tropomyosin inhibiert werden. Durch die gesteigerte Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Kinase werden dementsprechend die Interaktionsstellen zwischen Aktin und Myosin vermehrt freigelegt, was zu einer vermehrten Muskelkontraktion führt (Physiologie 2010; Huppelsberg et al. 2003; Horowitz et al. 1996). Im Rahmen der HPV kommt es durch den vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom als auch durch die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung zur vermehrten Kontraktion, Migration und Proliferation der PSMCs, wodurch das

*Remodeling* beeinflusst wird.  $\text{Ca}^{2+}$  spielt folglich eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der CHPH und es sind mehrere unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in die Pathogenese involviert, u.a. spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, *calcium release-activated calcium channel protein* (Orai-Kanäle) und TRP-Kanäle (Derler et al. 2016; Castillo-Galán et al. 2022; Cussac et al. 2020; Feske 2019; Wang et al. 2017). Mehrere unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle spielen folglich eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der CHPH.

#### **1.4 Transient Rezeptor Potential-Ionenkanäle**

Eine wichtige Gruppe der  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Ionenkanälen ist die TRP-Superfamilie. Die TRP-Kanäle bilden nicht-selektive Kationen-Kanäle, welche spannungsunabhängig aktiviert werden und für verschiedene Ionen wie  $\text{K}^+$ , Natrium, Magnesium und  $\text{Ca}^{2+}$  durchlässig sind. Aufgrund ihrer Funktion für die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  spielen diese eine große Rolle in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase (Earley und Brayden 2015; Clapham et al. 2001; Minke und Cook 2002; Malczyk 2017; Montell et al. 2002; Samanta et al. 2018).

Die TRP-Superfamilie setzt sich aus 28 Proteinen zusammen und wird in sechs Familien unterteilt, die sich anhand ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden (Samanta et al. 2018; Inoue et al. 2006; Earley und Brayden 2015). Neben den mukolipiden (TRPML) und polycysteininen TRP (TRPP) zählen auch die ankyrininen (TRPA), vanilloiden (TRPV), melastatin (TRPM) und die klassischen TRP (TRPC) zur Superfamilie der TRP-Kanäle. Die *no-mechanoreceptor potential C* TRP-Kanäle (TRPN) als siebte Subgruppe konnten bisher in Säugetieren nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 3**) (Hof et al. 2019; Malczyk 2017; Samanta et al. 2018).



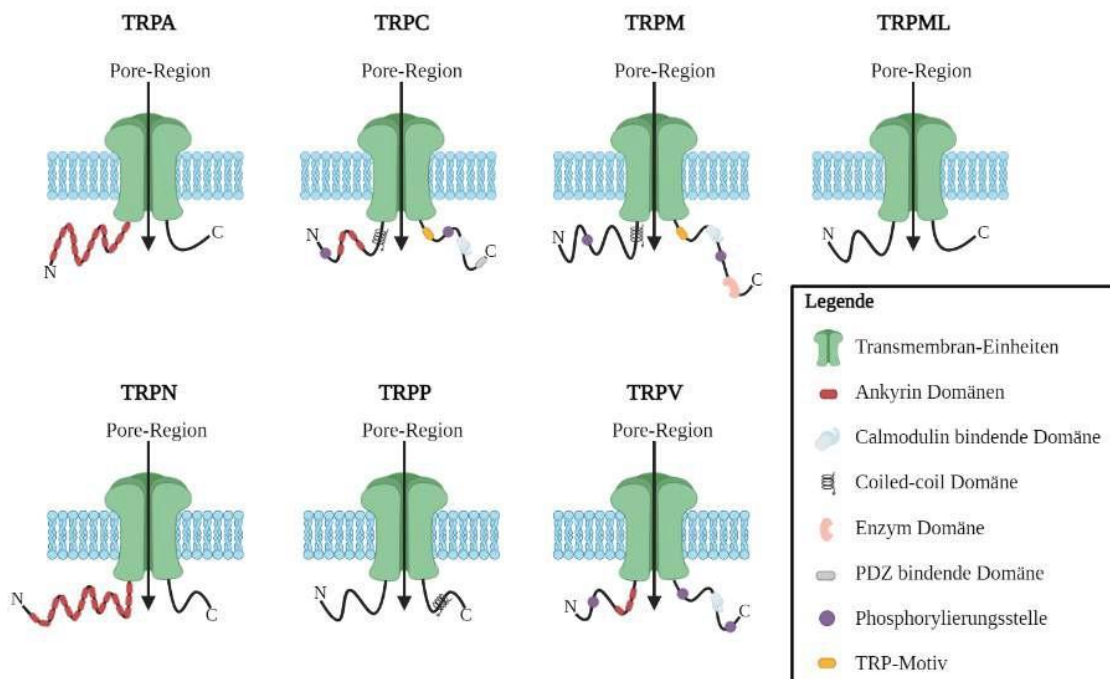
**Abbildung 3: Phylogenetischer Baum der TRP-Superfamilie.**

Die Superfamilie der TRP-Proteine werden anhand ihrer Aminosäurehomologie in folgende Unterfamilien unterteilt: klassischer *transient receptor potential* (TRPC), *no-mechanoreceptor potential C transient receptor potential* (TRPN), Melastatin *transient receptor potential* (TRPM), vanilloid *transient receptor potential* (TRPV), ankyrin *transient receptor potential* (TRPA), polycystein *transient receptor potential* (TRPP) und mukolipin *transient receptor potential* (TRPML). Verändert nach (Marini et al. 2023), *Open Access*, Lizenzlink: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

TRP-Proteine bestehen aus sechs Transmembran-Einheiten (S1-S6) mit einer Pore-Region, welche zwischen der fünften und sechsten Einheit liegt (Malczyk 2017; Hof et al. 2019; Minke und Cook 2002). Auf der Zellsinnenseite befinden sich distal der ersten und sechsten Transmembrandomäne der Amino-(N-) bzw. Kohlenstoff-(C-)Terminus, wobei sich die einzelnen Subfamilien durch die strukturellen Bestandteile, aus welchen die Termini aufgebaut sind, unterscheiden (Malczyk 2017; Hof et al. 2019). Über die Pore-Region sowie den intrazellulären Termini erhalten die Proteine ihre Interaktionsstellen sowie ihre regulatorische und enzymatische Funktion. Am N-Terminus befinden sich bei TRPC-, TRPV- und TRPA-Proteinen drei bis vier Ankyrin-Einheiten, welche vermutlich der Lokalisation oder der Interaktion einzelner Subgruppen untereinander dienen (**Abbildung 4**) (Malczyk 2017; Minke und Cook 2002).

Ein TRP-Kanal ist aus vier gleichen (homomeren) oder aus bis zu drei unterschiedlichen (heteromeren) TRP-Proteinen aufgebaut. TRP-Kanäle können aus Proteinen aus gleichen und verschiedenen Subfamilien gebildet werden (Earley und Brayden 2015; Guibert et

al. 2011). Eine Ausnahme bildet das TRPC1-Protein, welches keine funktionsfähigen homomeren Kanäle bilden kann und nur in heteromeren Kanälen zu finden ist (Earley und Brayden 2015). Es wird vermutet, dass TRPC1 daher nicht als Kanalprotein selbst sondern viel mehr als Kanal-Regulator fungiert, indem es die  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität der heteromeren Kanäle verringert (Dietrich et al. 2014). Es konnte bereits in heteromeren Kanälen mit TRPC4, TRPC5 und TRPV4 nachgewiesen werden, dass TRPC1 hier als negativer Regulator den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom reduziert (Schindl et al. 2012; Kim et al. 2019; Storch et al. 2012). Die Aktivierung der TRP-Kanäle erfolgt allgemein über extra- sowie intrazelluläre Signale, wie beispielsweise über Veränderungen im pH-Haushalt, über Temperatur-, Osmolaritätsänderungen sowie über externe und interne Liganden oder oxidativen Stress (Malczyk 2017; Minke und Cook 2002; Guibert et al. 2011).

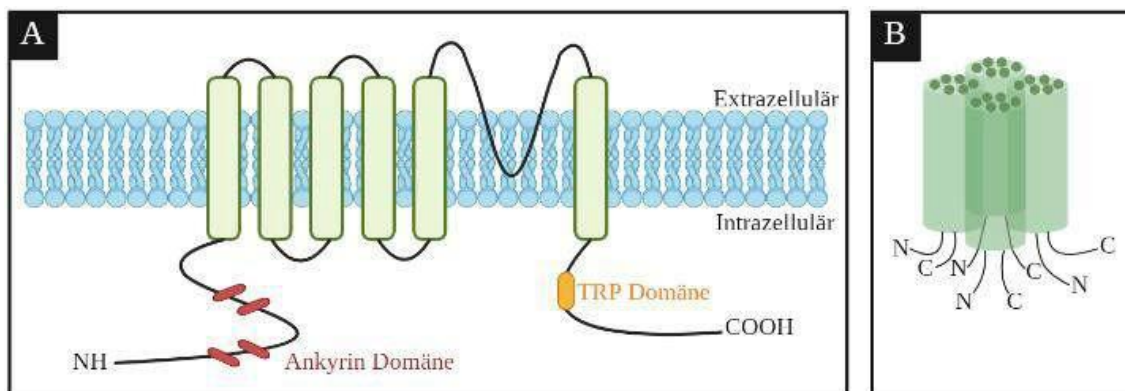


**Abbildung 4: Aufbau der verschiedenen TRP-Subfamilien.**

Die TRP-Proteine sind aus sechs Transmembran-Einheiten (S1-S6) aufgebaut, wobei jeweils die fünfte und sechste Domäne eine funktionelle Pore-Region bilden. Beide Termini der Proteine liegen im Inneren der Zelle und sind je nach Subfamilie unterschiedlich aufgebaut. N: Aminogruppe; C: Kohlenstoffgruppe; TRP: *transient receptor potential*; TRPA: Ankyrin-TRP; TRPC: Klassischer TRP; TRPM: Melastatin-TRP; TRPML: Mucolipin-TRP; TRPN: *no-mechanoreceptor-potential*-TRP; TRPP: Polycystein-TRP; TRPV: Vanilloid-TRP. Verändert nach (Piciu et al. 2023), *Open Access*, Lizenzlink: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

### 1.4.1 Klassische TRP-Kanäle (TRPC)

Die TRPC-Protein Subfamilie wird in sieben Untergruppen unterteilt, TRPC1 bis TRPC7. Zusätzlich zum charakteristischen Aufbau besitzen die TRPC-Proteine eine hydrophobe Pore-Region und das Strukturmotiv der Coiled-Coil-Domäne am N-Terminus, wodurch eine tetramere Anordnung des N-Terminus entsteht. Das C-terminale Ende hingegen weist Prolin-reiche Regionen und das TRP-Motiv auf. Dieses Motiv besitzt eine Calmodulin/IP<sub>3</sub>-Bindungsstelle sowie weitere Bindungsstellen und Domänen (**Abbildung 4; Abbildung 5**) (Malczyk 2017; Samanta et al. 2018; Eder und Molkenin 2011).



**Abbildung 5: Struktureller Aufbau des TRPC-Proteins und des TRPC-Kanals.**

A) Der klassische TRP (TRPC) ist wie die anderen TRP-Proteine aus sechs Transmembran-Domänen aufgebaut. Am Aminoterminus befinden sich drei bis vier Ankyrin-Domänen, die eine tetramere Struktur bilden. Am Kohlenstoff-Terminus befinden sich das TRP-Motiv mit seiner Calmodulin/IP<sub>3</sub>-Bindungsstelle. B) Jeweils vier TRPC-Proteine lagern sich zu einem funktionellen Kanal zusammen. NH/N: Aminogruppe; TRP: *transient receptor potential*; COOH/C: Kohlenstoffgruppe; TRPC: klassischer TRP. Verändert nach (Liu et al. 2020), *Open Access*, Lizenzlink: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Die TRPC-Kanäle werden anhand ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in zwei Untergruppen unterteilt. Heteromere Komplexe bilden TRPC1/4/5 und TRPC3/6/7 (Hofmann et al. 2002). TRPC2 ist beim Menschen lediglich ein Pseudogen und wird nicht exprimiert (Eder und Molkenin 2011; Malczyk 2017; Freichel et al. 2004). Bisher bekannte Kombinationen sind unter anderem TRPC1 mit TRPC3, TRPC6 sowie TRPC7 (Storch et al. 2012).

Durch die Bindung eines Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgt die Aktivierung des Enzyms Phospholipase C- $\beta$  (PLC  $\beta$ ). Die PLC  $\beta$  spaltet daraufhin das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerol (DAG) und

Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) (Dietrich et al. 2005a; Earley und Brayden 2015; Freichel et al. 2004; Eder und Molkentin 2011). DAG fungiert anschließend als direkter Aktivator von rezeptoraktivierten Kanälen (*receptor operated channel*, ROC), wozu klassischerweise die Proteine TRPC3, TRPC6 und TRPC7 zählen, was zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom von extra- nach intrazellulär führt. Der ROC-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ist dabei für die kurzfristigen Zunahme der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> verantwortlich (Earley und Brayden 2015; Malczyk 2017; Malkmus 2022; Mayser 2021). Gleichzeitig kommt es über die Bindung von IP<sub>3</sub> am IP<sub>3</sub>-Rezeptor des endoplasmatischen (ER) bzw. sarkoplasmatischen Retikulums (SR) zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung und damit zum Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Der Abfall der [Ca<sup>2+</sup>] im ER/SR führt zu einer Translokation des stromalen Interaktionsmoleküls 1 (STIM1), welches am ER lokalisiert ist, in Richtung Plasmamembran, wodurch der speicheraktivierte Kanal (*store operated channel*, SOC) Orai1 aktiviert wird. Durch die Aktivierung wird wiederum ein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom verursacht (Earley und Brayden 2015; Susperreguy et al. 2024).

#### 1.4.2 TRPC in der CHPH

Die TRP-Proteine kommen ubiquitär in allen Säugetieren vor und spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Signalwegen. TRPC1 konnte z. B. auch im Herzen oder im Gehirn nachgewiesen werden (Montell 2005; Samanta et al. 2018; Earley und Brayden 2015). Mutationen im Bereich der TRP-Gene, welche eine Veränderung der Funktion der TRP-Proteine bewirken, können daher zu diversen Krankheitsbildern führen, wie z. B. zu arterieller Hypertonie, Lungenödem oder neurogenen Entzündungen (Earley und Brayden 2015; Hof et al. 2019; Malczyk 2017; Montell 2005).

In der Pathogenese der CHPH werden TRPC-Kanäle als Ca<sup>2+</sup>-regulierende Kationen-Kanäle diskutiert, wobei die genaue Involvierung noch unklar ist (Ward und McMurtry 2009; Dunham-Snary et al. 2017).

Auf molekularer Ebene führt eine chronische Hypoxie zu keiner Veränderung der Expression von TRPC1-, TRPC3- und TRPC6-mRNA (Malczyk 2017; Mayser 2021). Auch bei Fehlen des TRPC6 Gens konnte keine Hochregulation anderer TRPCs auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Weissmann et al. 2006). Dahingegen spielt TRPC6 für die akute Vasokonstriktion der HPV eine entscheidende Rolle (Weissmann et al. 2006). In IAPH Patienten und Patientinnen konnte weiterhin eine Hochregulation des TRPC6 Proteins nachgewiesen werden (Inoue et al. 2006). Des Weiteren führt chronische Hypoxie bei Fehlen von TRPC3 zu einer Hochregulation von TRPC1 auf mRNA-Ebene

(Mayser 2021). Im Mausmodell der CHPH waren Mäuse, die kein TRPC1 oder TRPC3 Protein exprimieren konnten, partiell vor CHPH geschützt, indem sie ein vermindertes vaskuläres *Remodeling* sowie einen reduzierten rechtsventrikulären systolischen Druck (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) aufwiesen (Malczyk 2017; Malczyk et al. 2013; Mayser 2021). Auch Mäuse mit einem TRPC1/3/6 *Knockout* (KO) waren partiell vor CHPH geschützt. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass der partielle Schutz ohne Beeinflussung des vaskulären *Remodelings* einhergeht. Die Mäuse zeigten ein Fehlen der HPV sowie einen reduzierten RVSP (Malkmus 2022).

Obwohl insbesondere das Zusammenspiel der einzelnen TRPC-Untergruppen und die Interaktionen untereinander noch weitestgehend unbekannt sind, konnte durch die bisherigen Forschungen gezeigt werden, dass die Entstehung der CHPH maßgeblich durch die TRPC-Kanäle beeinflusst wird.

### **1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion von TRPC3 und TRPC6 Kanälen mit TRPC1 in ihrer Bedeutung für die HPV sowie die Entstehung von CHPH im Mausmodell zu untersuchen.

Um die Funktion von TRPC1/3 und TRPC1/6 Kanäle in der HPV zu beurteilen, wurden TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Modell der isolierten, ventilerten und blutfrei-perfundierten Lunge (ILU) untersucht. Außerdem wurde der Einfluss des Verlustes von TRPC1 und TRPC3 sowie TRPC1 und TRPC6 mittels Doppelknockout auf die Entstehung der CHPH analysiert. Hierzu wurden TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse über einen Zeitraum von 28 Tagen chronischer Hypoxie ausgesetzt. Im Anschluss wurde der RVSP und der Grad der Rechtsherzhypertrophie (RHH) sowie der Muskularisierung der pulmonalen Gefäße final untersucht. Mithilfe der vorliegenden Ergebnisse sollte die Rolle des Doppelknockouts von sowohl TRPC1 und TRPC3 als auch von TRPC1 und TRPC6 im Rahmen der CHPH-Entstehung analysiert werden. Das Verständnis der entsprechenden Mediatoren könnte gegebenenfalls künftig zur Entwicklung neuer Therapien, zur Verbesserung der Lebensqualität sowie zur Prognose von CHPH beitragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

Herstellername	Firma	Standort
3-Wege-Hahn Discofix® C-3SC	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Aquagel® Lubricating Gel	Parker Laboratories, Inc.	Fairfield, New Jersey, USA
Braunoderm® 50% 2-Propanol/1% Providionjod-Lösung	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Chirurgischer 5/0 Faden Polyester, Silicone coated	Ashaway Line & Twine Mfg. Co.	Ashaway, Rhode Island, USA
CRYO.S™ CryoTubes 2,4 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Einmalhandschuhe MICRO-TOUCH® NITRA- TEX™	Ansell Healthcare Europe N.V.	Brüssel, Belgien
Einmalhandschuhe Vasco® Nitril Soft white	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Eppendorf-Tubes 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Mercifil Faden, No. 12, 100 m	Amann & Söhne GmbH & Co. KG	Bönningheim, Deutschland
Falconröhrchen CELLSTAR® 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Haarentfernungs-Crème Veet Silky Fresh	Reckitt Benckiser Deutschland GmbH	Heidelberg, Deutschland
Infusionsverlängerung Extension Line Type Heidelberger	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Sterican® Einmal-Injektions- Kanüle (20G, 24G, 26G)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
3M™ Durapore™ Medizinisches Rollenpflaster	3M Deutschland GmbH	Neuss, Deutschland
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Sicherheitsvenenverweilkatheter Vasofix® Safety 20 G	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Feather® Disposal Scalpel 10er, 11er, 20er	Pfm medical AG	Köln, Deutschland
Spritze 1 ml Inject®-F, Luer Solo	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Spritze 5 ml Inject®, Luer Solo	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Spritze, 50 ml	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland

Original Perfusor® syringe Luer Lock, 50 ml		
Pur-Zellin® Zellstofftupfer (4 x 5cm)	Paul Hartmann AG	Heidenheim, Deutschland

### 2.1.2 Injektionslösungen/Medikamente

Herstellername	Firma	Standort
Heparin-Natrium 25000- ratiopharm® Injektionslösung	Ratiopharm GmbH	Ulm, Deutschland
Heparin-Natrium 5000- ratiopharm® Injektionslösung	Ratiopharm GmbH	Ulm, Deutschland
Isofluran Baxter®	Baxter Deutschland GmbH	Unterschleißheim, Deutschland
Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun, 100 ml	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Ketaminhydrochlorid Urostamin® 100 mg/ml	Serumwerk Bernburg AG	Bernburg, Deutschland
Xylazinhydrochlorid 20 mg/ml	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG	Garbsen, Deutschland

### 2.1.3 Materialien und Geräte für die Hämodynamik

Herstellername	Firma	Standort
AB104-S-Analysewaage	Mettler-Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Biemer Gefäßclip	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland
Isofluranverdampfer V-1 Tabletop Laboratory Animal Anesthesia System	VetEquip, Inc.	Livermore, Kalifornien, USA
LED-Ringlicht Leica LED 3000 RL, 58mm	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
VaporGuard™ Adsorption Luftfilter	VetEquip, Inc.	Livermore, Kalifornien, USA
Mikro-Tip® Catheter Transducer Model SPR-671 Pressure Catheter	Millar Instruments, Inc.	Houston, Texas, USA
Needle Electrodes for Animal Bio Amp	ADInstruments Ltd	Sydney, Australien
Narkosebox Induction Chambers	VetEquip, Inc.	Livermore, Kalifornien, USA
Tygon S3™-Schlauch E-3603 (verschiedene Diameter)	PROLIQUID GmbH	Überlingen, Deutschland
Pin (um Arterie anzuheben) Gefertigt aus BD Microlance™ 3 (30 ½ G)	Becton, Dickinson & Co. Ltd.	Drogheda, Irland
Präparationsbesteck Spring Scissors 15024-10,	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, Deutschland

Graefe Forceps 11050-10, Graefe Forceps 11052-10, Surgical scissors - Blunt 14000-10, Vannas Spring Scissors 15000-10		
Schlauchverbindungsstücke Small Barbed Fittings Kit	Cole-Parmer GmbH	Wertheim, Deutschland
Software Pulmodyn W	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH	March- Hugstetten, Deutschland
Landkartennadeln Art. Nr. 626	ALCO-Albert GmbH & Co. KG	Arnsbach, Deutschland
Leica M50 Routine Stereomikroskop	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Trachealtubus Gefertigt aus Vasofix® Safety 20G	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Mouse Ventilator MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH	March- Hugstetten, Deutschland
Verstärker PowerLab 8/30	ADInstruments Ltd	Sydney, Australien
Verstärker MPVS-Ultra™ Pressure-Volume-Loop System	Millar Instruments, Inc.	Houston, Texas, USA
Verstärker (EKG) Animal Bio Amp ML136	ADInstruments Ltd	Sydney, Australien
Waage PT 1200 1220/0,1 g	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Wärmematte mit Rektalsonde Physitemp TCAT-2LV Animal Temperature Controller	Physitemp Instruments LLC	Clifton, New Jersey, USA

#### 2.1.4 Materialien und Geräte für die Organentnahme

Herstellername	Firma	Standort
Becherglas Duran Laborglas 250ml	DWK Life Sciences GmbH	Wertheim, Deutschland
Einbettkassetten ROTILABO®, klein	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%	Otto Fischer GmbH & Co. KG	Saarbrücken, Deutschland
Hämatokrit-Kapillaren, Na-hep	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Eberstadt, Deutschland
Hämatokritversiegelungsset	BRAND GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
NaCl 0,9% Ecotainer®	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland

Kaltlichtquelle KL 200	Schott AG	Mainz, Deutschland
Bemis™ Curwood Parafilm™ M Labor-Verpackungsfolie	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Digital ABS AOS Messschieber 0-150mm, Tiefenmessstange	Mitutoyo Deutschland GmbH	Neuss, Deutschland
Tygon S3™-Schlauch E-3603 (verschiedene Diameter)	PROLIQUID GmbH	Überlingen, Deutschland
Pipette Eppendorf Research® Plus 100-1000µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Präparationsbesteck Spring Scissors 15024-10, Graefe Forceps 11050-10, Graefe Forceps 11052-10, Surgical scissors - Blunt 14000-10	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, Deutschland
Schlauchverbindungsstücke Small Barbed Fittings Kit	Cole-Parmer GmbH	Wertheim, Deutschland
Pulmonalarterieller Katheter, Sonderanfertigung für ILU1	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH	March- Hugstetten, Deutschland
Landkartennadeln Art. Nr. 626	ALCO-Albert GmbH & Co. KG	Arnsbach, Deutschland
Leica M50 Routine Stereomikroskop	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Trachealtubus Gefertigt aus Vasofix® Safety 20G	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Mouse Ventilator MidiVent Type 849	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH	March- Hugstetten, Deutschland
Hettich Zentrifuge, Mikro 200R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen, Deutschland
Hettich Zentrifuge, Haematokrit 210	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen, Deutschland

### 2.1.5 Materialien und Geräte für die Echokardiographie

Herstellername	Firma	Standort
Vevo® Imaging Station	FUJIFILM Visualsonics, Inc.	Toronto, Ontario, Kanada
Narkose-System Vevo Compact Dual Anesthesia System	FUJIFILM Visualsonics, Inc.	Toronto, Ontario, Kanada
Präzisionswaage EMB 100-3	KERN & SOHN GmbH	Balingen- Frommern, Deutschland

Schermaschine AESCULAP® Isis	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Aquasonic® Clear® Ultrasound Gel	Laboratories, Inc.	Fairfield, New Jersey, USA
Ultraschallgerät Vevo® 3100	FUJIFILM Visualsonics, Inc.	Toronto, Ontario, Kanada

### 2.1.6 Geräte und Software für die Histologie

Beschreibung	Firma	Standort
Digital Color Camera Leica DFC310 FX	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
PL303-Analysewaage	Mettler-Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Forschungsmikroskop Leica DM6000B	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Leica ASP300S Gewebeeinfiltrationsautomat	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Sakura IDent™ Cassette Printer	Sakura Finetek USA, Inc.	Torrance, Kalifornien, USA
Kühlplatte EG 1150C	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Milli-Q Advantage A10 Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer IKA® RH basic 2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Makro für Muskularisierungsgrad	entwickelt von Hr. Christoph Frank (Informatiker), Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Rotationsmikrotom RM 2165	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Mini-Zentrifuge LLG-uniCFUGE 2	Lab Logistics Group GmbH	Meckenheim, Deutschland
Objektträgerstrecktisch HI 1220	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Paraffinausgießstation EG 1140H	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Paraffinstreckbad HI 1210	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Labor-pH-Meter 766 Climatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
Pipette Eppendorf Research® (diverse Größen)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Schüttler IKA® VIBRAX VXR basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Software Q Win V3	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, New York, USA

Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
--------------	-----------------------	---------------------------

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien für die Histologie

Herstellername	Firma	Standort
Deckgläser 24 x 36 mm	R. Langenbrinck	Emmendingen, Deutschland
Eindeckmedium Pertex® Xylol-löslich	Medite GmbH	Burgdorf, Deutschland
Einmalhandschuhe MICROFLEX® Long Cuff	Ansell Healthcare Europe NV	Brüssel, Belgien
Eppendorf-Tubes 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Falconröhrchen CELLSTAR® 15 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Mikrotomklingen Disposable Blades MS33	MICROS Produktions- & Handelsges.m.b.H.	St. Veit/Glan, Österreich
Objektträger SUPERFROST PLUS® GOLD	Gerhard Menzel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Paraffin Einbettmedium Paraplast Plus®	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Feather® Disposal Scalpel 10er, 11er, 20er	Pfm medical AG	Köln, Deutschland

### 2.1.8 Materialien für die histologische Färbung

Herstellername	Firma	Standort
Albumin bovine Fraction V, protease-free	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Antibody Diluent	Zytomed Systems GmbH	Berlin, Deutschland
DAB Substrat Kit SK-4100, Peroxidase	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, Kalifornien, USA
Ethanol 70 %, 96 %, 99,6 % vergällt mit Ethylmethylketon	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Hydrogen peroxide 30%, pro analysis	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (1N)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
ImmPRESS® Horse Anti- Rabbit IgG Polymer Kit MP- 7401, Peroxidase	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, Kalifornien, USA
Isopropanol 99,8 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

Kaliumchlorid $\geq 99,5$ %, pro analysis	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat, pro analysis	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Methanol, reinst pro analysis	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Vector® Methyl Green	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, Kalifornien, USA
MM HRP-Polymer Kit MM510L	Zytomed Systems GmbH	Berlin, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, pro analysis	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid $\geq 99,5$ %, pro analysis	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (2N), pro analysis	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
PBS (20-fach, 1-fach) Eigenherstellung		
Novocastra™ Enzyme Proteinkinase K (IHC)	Leica Biosystems	New Castle, England
Vector® VIP Substrat Kit SK-4600	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, Kalifornien, USA
Anti-von Willebrand Faktor; Rabbit/polyklonal (Art. Nr. A0082)	Dako Cytomation	Hamburg, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Anti-alpha-smooth muscle Actin; Clone 1A4; Mouse/monoclonal (Art. Nr. A2547)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

### 2.1.9 Material und Geräte für das Hypoxiemodell

Herstellername	Firma	Standort
Controller OxyCycler Model A84XOV	Biospherix Ltd.	Lacona, New York, USA
Monitor-Pod A84XOV	Biospherix Ltd.	Lacona, New York, USA
A-Series Dynamic O <sub>2</sub> Controller	Biospherix Ltd.	Lacona, New York, USA
E-445 Oxygen Sensor	Biospherix Ltd.	Lacona, New York, USA
Schalldämpfer CUS-Muffler	Biospherix Ltd.	Lacona, New York, USA
Software WatView Version 2.6.0.4	Watlow Electric Company	Saint Louis, Missouri, USA
Tierhaltungsboxen	Biospherix Ltd.	Lacona, New York, USA

A-66274-P X-Large Animal Chamber		
----------------------------------	--	--

### 2.1.10 Material und Geräte für die ILU

Herstellername	Firma	Standort
Aqua Ecotainer®	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Blasenfalle Sonderanfertigung	Glasbläserei Uni-Gießen	Gießen, Deutschland
Blutanalyzesystem Rapidlab™ 348	Siemens Healthcare GmbH	Erlangen, Deutschland
DMSO Dimethylsulfoxid $\geq 99,5\%$	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Drucksensoren Combitrans 1-fach Set Mod. II Uni Gießen	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Elektrolytlösung II N Spezialanfertigung: 975ml enthalten: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Natriumchlorid 120,0mmol</li> <li>• Kaliumdihydrogenphosphat 1,10mmol</li> <li>• Magnesiumchlorid-Hexahydrat 1,30mmol</li> <li>• Kaliumchlorid 4,30mmol</li> <li>• Calciumchlorid-Dihydrat 2,40mmol</li> <li>• Glucose 13,32mmol</li> <li>• Hydroxyethylstärke (200/0,5) 50,0g</li> </ul>	SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG	Naila/Bayern, Deutschland
Ethanol 70 % vergällt mit Ethylmethylketon	Otto Fischer GmbH & Co. KG	Saarbrücken, Deutschland
Feinwaage Model CS 200	Ohaus Corporation	Parsippany, New York, USA
Gasflussmesser Einzelrohr-Rotameter P11A2-VA0	Aalborg Instruments & Controls, Inc.	Orangeburg, New York, USA
Halterung für Silikonschläuche	Von Kreutz - Labortechnik	Uckfield, England
Hebebühne (max. 7 kg) 245-0027 (160x130mm)	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
ILU-System Basic Unit for isolated perfused Mouse Lung Size 1 Type 839 (IL-1)	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH	March-Hugstetten, Deutschland
Infusionsleitung flexibel PE, farbcodiert 30cm, 1,0 x 2,0 mm, Pmax = 21 bar/300psi	MiroMed	Frankfurt, Deutschland
Kaliumchlorid $\geq 99,5\%$ , pro analysis	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland

Lungenhalterungsbügel	Von Kreutz - Labortechnik	Uckfield, England
Mehrweg-Transducer-Board Combitrans EasyClick Monitoring System	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
TRPC6-Inhibitor BI-749327	Hycultec GmbH	Beutelsbach, Deutschland
U46619 = 9,11-Dideoxy-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ - methanoepoxyprostaglandin F2 $\alpha$	Paesel & Lorei GmbH & Co. KG	Rheinberg, Deutschland
Messzylinder DURAN® Klasse A, 200 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat 1 molar 8,4 %	SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG	Naila/Bayern, Deutschland
Tygon S3™-Schlauch E-3603 (verschiedene Diameter)	PROLIQUID GmbH	Überlingen, Deutschland
Pipette Eppendorf Research® (diverse Größen)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzenbox zum Fixieren der Korkmatte	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Präparationsbesteck Spring Scissors 15024-10, Graefe Forceps 11050-10, Graefe Forceps 11052-10, Surgical scissors - Blunt 14000-10	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, Deutschland
Reservoir Sonderanfertigung	Glasbläserei Uni-Gießen	Gießen, Deutschland
Schlauchverbindungsstücke Small Barbed Fittings Kit	Cole-Parmer GmbH	Wertheim, Deutschland
Silikonschläuche (unterschiedliche Diameter)	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Silikonspray B-tec 107	E.I.S. GmbH & Co. KG	Köln-Ossendorf, Deutschland
Stativ <ul style="list-style-type: none"> <li>• mit Dreifuß-Standfuß</li> <li>• mit Schraubzwinde</li> </ul> Stativklemmen Halterungen Schutzüberzüge für Klemmfinger Stativstab Universalmuffen	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Landkartennadeln Art. Nr. 626	ALCO-Albert GmbH & Co. KG	Arnsbach, Deutschland
Mouse Ventilator MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH	March- Hugstetten, Deutschland
Wägezelle Research Isometric Transducer Model 1 (PY2 72-449)	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH	March- Hugstetten, Deutschland

Wärmeglocke Sonderanfertigung	Glasbläserei Uni-Gießen	Gießen, Deutschland
----------------------------------	-------------------------	------------------------

## 2.2 Versuchstiere

### 2.2.1 Mauslinien

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden Mäuse (*Mus musculus*) der homozygot gezüchteten Linien B6.129/EvSV-TRPC1<sup>tm1Lbi</sup> (TRPC1<sup>-/-</sup>), B6.129S-TRPC3<sup>tm1.1Akon</sup> (TRPC3<sup>-/-</sup>), B6.129S/EvSV-TRPC6<sup>tm1.lbi</sup> (TRPC6<sup>-/-</sup>), B6.129/EvSV-TRPC1<sup>tm1Lbi</sup>-TRPC3<sup>tm1.1Akon</sup> (TRPC1/3<sup>-/-</sup>) und B6.129/EvSV-TRPC1<sup>tm1.lbi</sup>-TRPC6<sup>tm1.lbi</sup> (TRPC1/6<sup>-/-</sup>) verwendet. Der genetische Hintergrund der verwendeten Mauslinien waren C57BL/6J-Mäuse. Eine singuläre Deletion von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 wurde durch die Modifikation der entsprechenden Gene im Exon 7 in murinen 129S/SvEv Stammzellen erreicht. Im Anschluss wurden die genetisch veränderten Stammzellen in C57BL/6J Blastozysten transferiert und die Mäuse über zehn Generationen auf den C57BL/6J Hintergrund zurückgezüchtet (Dietrich et al. 2005a; Malczyk 2017; Mayser 2021; Hartmann et al. 2008; Dietrich et al. 2007). Zur Erzeugung des TRPC1/3<sup>-/-</sup> bzw. TRPC1/6<sup>-/-</sup> wurden TRPC1<sup>-/-</sup> und TRPC3<sup>-/-</sup> bzw. TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse verpaart. Als Kontrollmäuse wurden interne Wildtypen (WT) aus eigener Kolonie der TRPC Mauszucht verwendet.

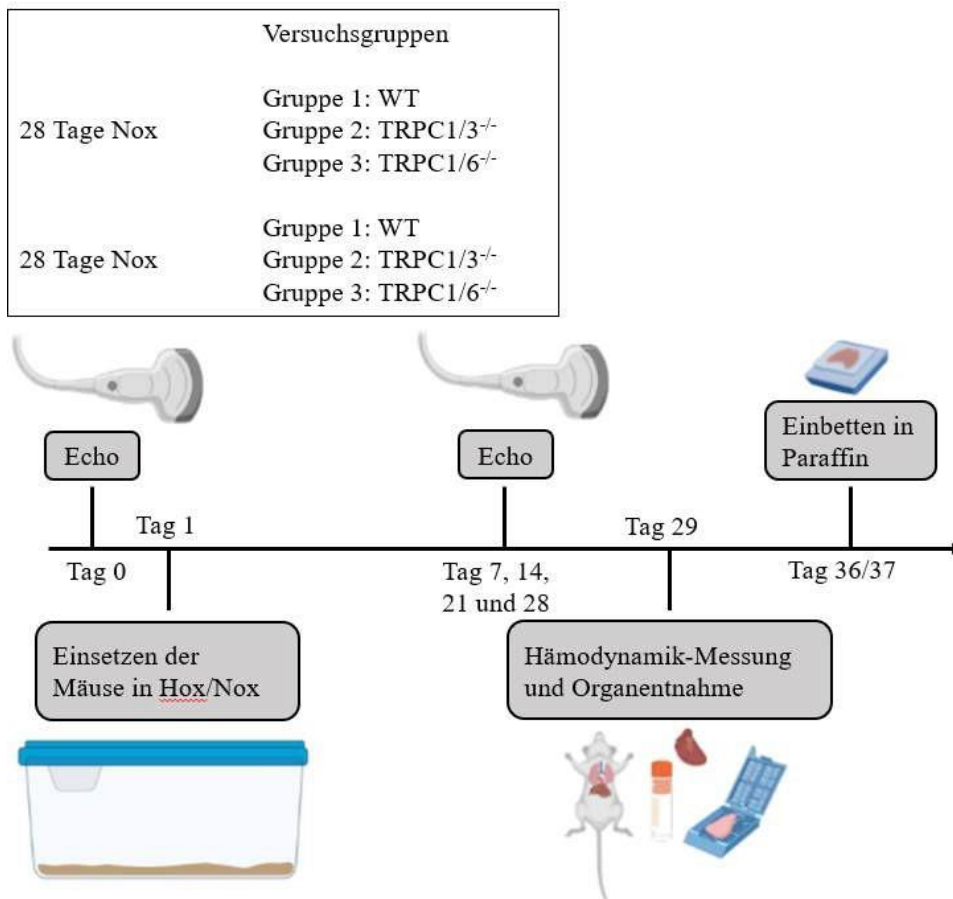
### 2.2.2 Versuchstierhaltung

#### 2.2.2.1 Allgemeine Versuchstierhaltung

Die Mäuse wurden in einem speziellen Kammersystem in offenen *TypII long* Käfigen in Gruppen von zwei bis fünf Tieren gehalten. Die Mäuse wurden bei einem 14-Stunden-Hell- und 10-Stunden-Dunkel-Rhythmus bei 22 °C ± 2 °C und 55 % ± 10 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Käfige wurden mit Einstreu- und Nistmaterial, Nagehölzern und Versteckmöglichkeiten ausgestattet. Die Versorgung mit Wasser (Leitungswasser) und Futter (Standarddiät, Altromin 1324) sowie die Säuberung der Käfige erfolgte regelmäßig.

### **2.2.2.2 Experimentelle Versuchstierhaltung in Hypoxie-Exposition**

Die Experimente wurden vom Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen GI 20/ 10 Nr. G10/2017, JLU-Nr. 837\_GP (Hypoxie-Experiment) und G56/2019 JLU-Nr. 960\_GP (isolierte Lunge) genehmigt. Die Tierexperimente wurden gemäß der EU-Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt. Die Haltungsbedingungen in Bezug auf Hell-Dunkel-Rhythmus, Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit, Versorgung der Versuchsmäuse wurden gemäß der allgemeinen Versuchstierhaltung ausgeführt. Für die Hypoxie-Experimente wurden WT Mäuse sowie Versuchsmäuse der Linien TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> im Alter von 12 bis 16 Wochen für 28 Tage unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub>, normobar) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub>, Raumluft) im halboffenen Kammersystem in *TypII long* Käfigen gehalten (**Abbildung 6**). Die CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Konzentrationen wurden täglich kontrolliert. Der experimentell bedingte Gesundheitszustand, u. a. das Verhalten, das Erscheinungsbild und das Gewicht der Versuchsmäuse, wurde gemäß Tierversuchsantrag (Aktenzeichen GI 20/ 10 Nr. G10/2017, JLU-Nr. 837\_GP) anhand eines Punktesystems (*Scoresheet*) beurteilt und dokumentiert. Die Beurteilung erfolgte mit Hilfe von Dr. Monika Brosien, Dr. Simone Kraut und Dr. Ingrid Henneke. Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Gruppengrößeneinschätzung, sodass mit je 15 Tieren pro Gruppe begonnen wurde. Um potenzielle geschlechtsspezifische Effekte auszuschließen, wurde auf eine annähernd gleichmäßige Verteilung männlicher und weiblicher Tiere geachtet. Während des Experimentverlaufs wurden dabei Tiere aus unterschiedlichen Gründen, wie z. B. aufgrund technischer Fehler, vorzeitig aus dem Versuch genommen, weshalb diese Daten in der Auswertung nicht miteinbezogen wurden. Die entsprechende Endzahl der Gruppengröße ist jeweils in den Abbildungen der Ergebnisse angegeben.



**Abbildung 6: Versuchsaufbau der experimentellen Versuchstierhaltung.**

Zur Untersuchung des Effekts auf die Entstehung der CHPH wurden WT (Gruppe 1), TRPC1/3<sup>-/-</sup> (Gruppe 2) und TRPC1/6<sup>-/-</sup> (Gruppe 3) für 28 Tage in Hypoxie bzw. Normoxie gehalten. An Tag 0, 7, 14, 21 und 28 wurde die Herzfunktion mittels Echokardiografie untersucht. Am 29. Tag erfolgte die hämodynamische Messung mit finaler Blutentnahme und anschließender Organentnahme. Am 36. bzw. 37. Tag wurden die linken Lungenflügel für die histologischen Untersuchungen in Paraffin eingebettet. Hox: Hypoxie, Nox: Normoxie, Echo: Echokardiographie.

## 2.3 Echokardiographie und Hämodynamik

### 2.3.1 Anästhesie der Maus

Vor Messungsbeginn wurden die Versuchsmäuse mit 3 – 5 Volumen % Isofluran bei einer Flussrate von 1 l/Min. anästhesiert. Anschließend wurden die Versuchstiere am Messplatz auf einer Wärmematte in Rückenlage über eine Atemmaske ventiliert. Die Narkose wurde mit 1,5 – 2,5 Volumen % Isofluran bei einer Flussrate von 1 l/Min. während der Messung aufrechterhalten. Die Narkosetiefe wurde durch das Testen von nozizeptiven Reflexen (Zwischenzehenreflex) kontrolliert. Die Narkose wurde entweder von Dr. Simone Kraut, Dr. Monika Brosien oder Dr. Kathrin Malkmus durchgeführt oder überwacht.

### 2.3.2 Echokardiographische Messung

Zur Untersuchung der Herzfunktion wurde eine Echokardiographie des Herzens gemäß eines etablierten Protokolls durchgeführt. Eine genauere Ausführung des Vorgehens ist in der Literatur zu finden (Hadzic et al. 2021; Kraut 2014; Veith et al. 2020; Malkmus 2022).

Die Herzfrequenz und der Herzrhythmus wurden während der echokardiographischen Messung mittels EKG-Elektrodenplättchen kontrolliert, welche in der Wärmeplatte integriert waren. Nach Einführung der Rektalsonde zur automatischen Regulation der Körpertemperatur wurde das Fell am Thorax und am kranialen Abdomen mittels Enthaarungscreme entfernt, um Störungen durch verbliebene Haare beim Schallen zu vermeiden. Die Messung wurde mittels eines 30 MHz Doppler- und einem 30 MHz 2D-Linear-Schallkopfes durchgeführt. Zur Beurteilung der funktionellen kardialen Veränderungen wurden die *tricuspid annular plane systolic excursion* (TAPSE) bestimmt, als Maß der systolischen Funktion des rechten Ventrikels. Zur Bestimmung der strukturellen Veränderungen des Herzens im Rahmen der Rechtsherzhypertrophie wurde die Wandstärke des rechten Herzens (*right ventricular wall thickness*, RVWT) gemessen. Die Echokardiographie wurde durch Dr. Simone Kraut durchgeführt.

### 2.3.3 Hämodynamische Messung

Nach der Desinfektion des Thorax wurde das EKG der Maus durch subkutan eingeführte Elektroden abgeleitet und die Temperatur der Maus mittels einer rektal eingeführten Sonde reguliert. Anschließend wurde die Haut am Hals entfernt, die *Trachea* freigelegt, eröffnet und intubiert. Dann wurde die rechte *Vena jugularis* frei präpariert und mit einem möglichst kranial liegenden Faden ligiert, wodurch das Gefäß auf Spannung gehalten werden konnte. Um einen Blutrückfluss ins Herz zu verhindern, wurde ein zweiter Faden um die *Vena jugularis* gelegt. Nach Eröffnung der *Vena jugularis* wurde der Katheter eingeführt und in den rechten Vorhof vorgeschoben. Anschließend wurde der Katheter in den Ventrikel vorgeschoben und der RVSP gemessen. Nach der Messung wurde der Katheter entfernt und die *Vena jugularis* verschlossen. Die Präparation und Messung des systolisch arteriellen Drucks (*systolic arterial pressure*; SAP) sowie des linksventrikulären systolischen Drucks (*left ventricular systolic pressure*, LVSP) über die rechte *Arteria carotis* erfolgte in gleicher Vorgehensweise, wobei zur Vermeidung eines Blutrückflusses von kardial ein Gefäßclip verwendet wurde. Nach der Messung wurde intraperitoneal Heparin (500 I.E./10 g KG) injiziert, um eine intravasale

Thrombenbildung zu vermeiden und eine gleichmäßige Perfusion der Lungengefäße für die histologische und molekularbiologische Untersuchung zu gewährleisten. Es folgte die Durchtrennung der *Arteria carotis* und die Tötung der Versuchsm Maus durch finalen Blutentzug, wobei das Blut für die anschließende Hämatokrit-Bestimmung verwendet wurde. Die Messung und Tötung der Versuchsmäuse wurde von Dr. Kathrin Malkmus durchgeführt. Die Anästhesieüberwachung wurde durch Dr. Julia Schäffer, Dr. Simone Kraut und Dr. Monika Brosien durchgeführt.

#### **2.3.4 Hämatokrit-Bestimmung**

Die Blutprobe zur Bestimmung des Hämatokrit-Wertes wurde mittels zweier Kapillaren aufgenommen und mit 15.570 G (12.800 rpm) für 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Die Hämatokrit-Werte wurden mit Hilfe einer Hämatokrit-Skala abgelesen.

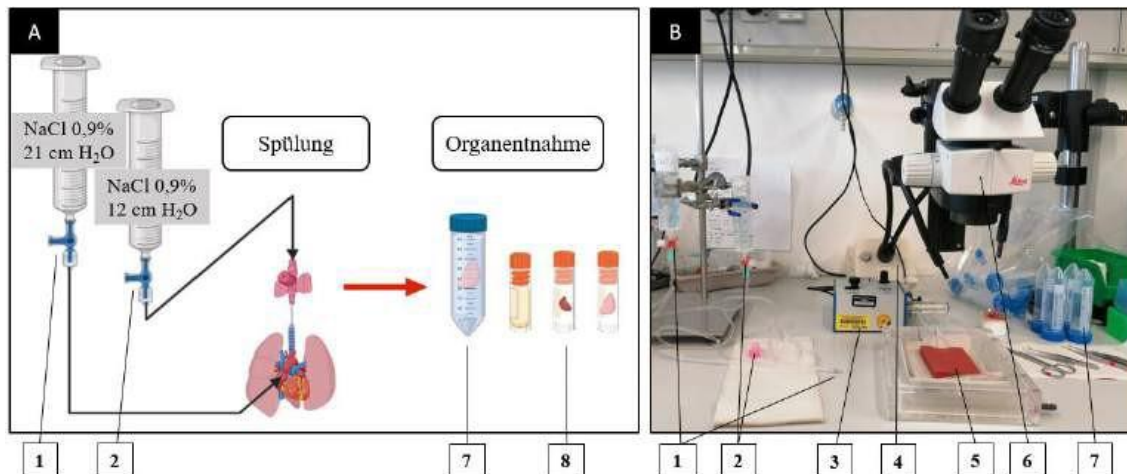
#### **2.3.5 Rechtsherzhypertrophie**

Zur Bestimmung der RHH wurden zunächst die Herzohren und der Aortenbogen entfernt. Im Anschluss wurden der rechte Ventrikel (RV), der linke Ventrikel (LV) und das Septum (S) der entnommenen Herzen voneinander getrennt, um das jeweilige Gewicht zu bestimmen. Die Berechnung der RHH erfolgte mittels Fulton-Index mit der Berechnung der Relation zwischen RV und LV inklusive S.

### **2.4 Organentnahme**

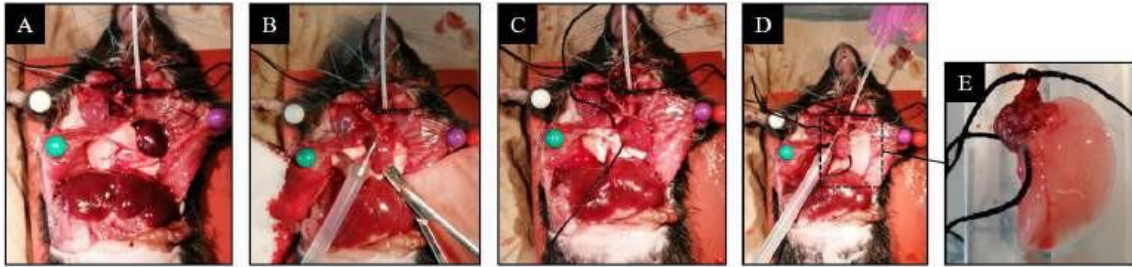
Nach der hämodynamischen Messung wurden die Organe entnommen (**Abbildung 7**). Hierfür wurde die tote Maus auf einer Gummimatte fixiert und intubiert. Mittels einer Beatmungspumpe wurde die Lunge bei einem Volumen von 150 µl ventiliert, um ein Kollabieren der Alveolen zu verhindern. Anschließend wurde der Thorax vollständig eröffnet. Die Pleura wurde vom Thorax gelöst und die Rippenbögen an der Gummimatte fixiert. Ein chirurgischer Faden wurde um die *Arteria pulmonalis* gelegt und der linke Ventrikel eröffnet. Dann erfolgte die Eröffnung des rechten Ventrikels und das Einführen des Pulmonalkatheters in die *Arteria pulmonalis*. Die Lunge wurde mit 0,9 % NaCl-Lösung mit einem Druck von 21 cm Wassersäule (cm H<sub>2</sub>O) gespült. Anschließend erfolgte die Entnahme der rechten Lungenflügel. Hierzu wurde der Hauptbronchus der rechten Lungenflügel mit einem Faden bei reduzierter Ventilation von 70 µl pro Atemzug abgebunden und entnommen.

Im Anschluss wurde die Beatmung beendet und der linke Lungenflügel über die Trachea mit 0,9 % NaCl-Lösung mit einem Druck von 12 cm H<sub>2</sub>O befüllt. Gleichzeitig wurden die Gefäße über den Pulmonalkatheter mit einem Druck von 21 cm H<sub>2</sub>O gespült, um ein Kollabieren der Gefäße zu verhindern. Nach vollständiger Befüllung wurde die Flüssigkeitszufuhr gestoppt, die Kanüle und der Katheter entfernt und die Trachea mit einem Faden zur Vermeidung eines Flüssigkeitsverlustes verschlossen. Anschließend wurde das Herz entnommen, die Lungenflügel in Formaldehyd (3,5 – 3,7 %) transferiert und für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Lungen in einer 1-fachen phosphatgepufferten Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) für 7 Tage bei 4 °C unter täglichem Wechsel der PBS-Lösung gelagert (**Abbildung 8**).



**Abbildung 7: Versuchsaufbau der Lungenspülung und Organentnahme.**

In Abbildung A ist der schematische Aufbau der Lungenspülung und Organentnahme und in Abbildung B der tatsächliche Aufbau der *Flushing*-Station dargestellt. (1) Spülstation mit pulmonalerarteriellem Katheter; (2) Spülstation mit Spülkanüle; (3) Beatmungspumpe; (4) Kaltlichtquelle; (5) Gummimatte zur Fixierung des Mausekadavers; (6) Mikroskop; (7) Falcon-Tube mit Formaldehyd zur Fixierung des linken Lungenflügels; (8) Kryo-Tubes für Plasma, Herz und rechte Lungenflügel zur Konservierung bei – 80 °C.



**Abbildung 8: Lungenpülung und Organentnahme.**

(A) Beatmete Maus mit Sicht auf den geöffneten Thorax; (B) Spülung der Lunge mittels 0,9 % NaCl-Lösung über den pulmonalarteriellen Katheter; (C) Vorbereitung zur Entnahme der rechten Lungenlappen; (D) Füllen des linken Lungenflügels mit 0,9 % NaCl-Lösung mittels Spülkanüle; (E) Entnommener linker Lungenflügel.

## 2.5 Histologie

### 2.5.1 Herstellung von PBS

Zur Herstellung von 20-fachem PBS wurden 2,74 M NaCl, 0,05 M KCl, 0,13 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,03 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in destilliertem Wasser gelöst. Die 20-fache PBS-Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf eine 1-fache Lösung mit einem pH von 7,4 verdünnt. Der pH wurde unter Zugabe von 1 M HCl bzw. 2 M NaOH eingestellt.

### 2.5.2 Einbetten und Schneiden der Proben

Für die histologische Analyse wurden die in PBS gelagerten Lungen mit Hilfe des Leica ASP300S Gewebeeinfiltrationsautomaten nach dem Standardprogramm für alveoläre Entwässerung entwässert (**Tabelle 3**). Nach der Entwässerung wurden die Lungen mit der konkaven Seite nach unten in eine Paraffinform positioniert und mit 45 – 60 °C warmem, flüssigem Paraffin befüllt, abgekühlt und ausgehärtet.

Die Blöcke wurden zunächst „getrimmt“, um die gesamte Lunge inklusive Hilus anzuschneiden. Anschließend wurden am Mikrotom 0,3 µm dicke Schnitte angefertigt, welche in 60 °C warmem destillierten Wasser transferiert und mit einem Objektträger für die Färbung aufgenommen wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte für eine Stunde auf einer 60 °C warmen Heizplatte und anschließend für 24 Stunden bei 37 °C im Inkubator getrocknet.

Reagenz	Dauer	Temperatur
Ethanol 70 %	1 Std.	55 °C

<b>Ethanol 70 %</b>	1 Std.	55 °C
<b>Ethanol 70 %</b>	1,5 Std.	55 °C
<b>Ethanol 96 %</b>	1 Std.	35 °C
<b>Ethanol 99,6 %</b>	1 Std.	35 °C
<b>Ethanol 99,6 %</b>	1 Std.	35 °C
<b>Isopropanol</b>	1,5 Std.	35 °C
<b>Isopropanol</b>	1,5 Std.	35 °C
<b>Xylol</b>	1 Std.	35 °C
<b>Xylol</b>	1,5 Std.	35 °C
<b>Paraffin</b>	1 Std.	60 °C
<b>Paraffin</b>	1,5 Std.	60 °C
<b>Paraffin</b>	1,5 Std.	60 °C
<b>Xylol</b>	Waschschritt	Waschschritt (50 – 65 °C)
<b>Ethanol 96 %</b>	Waschschritt	Waschschritt (50 – 65 °C)
<b>Aqua dest.</b>	Waschschritt	Waschschritt (50 – 65 °C)

**Tabelle 3: Alveolar-Standardprogramm zur Entwässerung von Lungen.**

Arbeitsschritte zur Entwässerung der Lungen nach Organentnahme. Angegeben ist die Temperatur, die Dauer in Stunden und die einzelnen Chemikalien. Std.: Stunde; Aqua dest.: destilliertes Wasser

### 2.5.3 Doppelfärbung gegen $\alpha$ -Aktin und Von-Willebrand-Faktor

Um die Muskularisierung der Lungengefäße zu analysieren, wurden die Lungenschnitte in einer Doppelfärbung mit spezifischen Antikörper gegen  *$\alpha$ -smooth muscle actin* (violett) und Von-Willebrand-Faktor (vWF; braun) in Antibody/Renaissance Diluent gefärbt. Dabei ist  *$\alpha$ -smooth muscle actin* spezifisch für Muskelzellen und vWF spezifisch für Endothelzellen. Zunächst wurde das Paraffin gelöst, indem die Lungenschnitte über Nacht bei 37 °C und am Folgetag für eine Stunde bei 60 °C erwärmt wurden. Anschließend erfolgten diverse Waschschritte in Xylol, um das Paraffin zu entfernen, und in Ethanol, um die Lungenschnitte zu rehydrieren (**Tabelle 4**).

<b>Reagenz</b>	<b>Inkubationsdauer</b>
<b>Xylol</b>	3 x je 10 Min.
<b>Ethanol 99,6 %</b>	2 x je 5 Min.

<b>Ethanol 96 %</b>	5 Min.
<b>Ethanol 70 %</b>	5 Min.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %)-Methanol-Lösung</b>	20 Min.

**Tabelle 4: Arbeitsschritte zur Entfernung von Paraffin und Rehydrierung der Lungenschnitte.**

Arbeitsschritte zur Entfernung des Paraffins sowie zur Rehydrierung der Lungenschnitte. Am Ende wurden die Schnitte in einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %)-Methanol-Lösung gewaschen, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren. Min.: Minuten; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %): 3 % Wasserstoffperoxid; %: Prozent

Nach der Inaktivierung endogener Proteasen durch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %)-Methanol-Lösung erfolgten die weiteren Arbeitsschritte, um die Endothel- sowie die Muskelschicht anzufärben (**Tabelle 5**).

<b>Reagenz</b>	<b>Inkubationsdauer</b>	<b>Anmerkung</b>
<b>Aqua dest.</b>	2 x 5 Min.	Waschschritt
<b>Proteinkinase K</b>	5 Min.	Proteolytische Demaskierung
<b>Aqua dest.</b>	1 Min.	Waschschritt
<b>PBS</b>	4 x 5 Min.	Waschschritt
<b>BSA 10 %</b>	20 Min.	Blockierung nicht-spezifischer Bindungsstellen
<b>PBS</b>	4 x 5 Min.	Waschschritt
<b>Rodent Block M (MM HRP Polymer Kit)</b>	30 Min.	Blockierung endogener Maus IgG
<b>PBS</b>	4 x 5 Min.	Waschschritt
<b>Primärantikörper <i>α-smooth muscle actin</i></b> (1:700 in Antibody/Renaissance Diluent)	30 Min.	Markieren von <i>α</i> -Aktin, exprimiert durch Muskelzellen in der Lunge, mittels Antikörper
<b>PBS</b>	4 x 5 Min.	Waschschritt
<b>MM HRP Polymer</b>	20 Min.	Blockierung endogener Maus IgG
<b>PBS</b>	4 x 5 Min.	Waschschritt

<b>Vector VIP Substrat Kit</b>	30 Sek. – 4 Min. (nach Augenmaß, abhängig von der Entwicklung)	Redoxreaktion von VIP Substrat katalysiert durch HRP unter violetter Farbreaktion zur Färbung der Muskelschicht
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5 Min.	Waschschritt
<b>PBS</b>	5 Min.	Waschschritt
<b>BSA 10 %</b>	15 Min.	Blockierung nicht-spezifischer Bindungsstellen
<b>PBS</b>	2 x 5 Min.	Waschschritt
<b>2,5 % Normal Horse Serum</b> <b>(ImmPRESS Kit Anti Rabbit Ig)</b>	20 Min.	Serumblock
<b>Primärantikörper vWF</b> (1:2000 in Antibody Diluent)	30 Min. in 37 °C	Markierung des vWF, exprimiert durch die Endothelzellen in der Lunge, mittels Antikörper
<b>PBS</b>	4 x 5 Min.	Waschschritt
<b>ImmPRESS REAGENT Anti Rabbit Ig Peroxidase</b>	30 Min.	Sekundärantikörper konjugiert mit Peroxidase
<b>PBS</b>	4 x 5 Min.	Waschschritt
<b>DAB Substrat Kit</b>	4 Sek. – 5 Min. (nach Augenmaß, abhängig von der Entwicklung)	Redoxreaktion von DAB Substrat katalysiert durch HRP unter brauner Farbreaktion zur Färbung der Endothelschicht
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5 Min.	Waschschritt
<b>Methylgrün</b>	3 Min. in 60 °C	Anfärbung der DNA und RNA in Zellkernen unter grüner Farbreaktion
<b>Aqua dest.</b>	1 Min.	Waschschritt

<b>Ethanol 96 %</b>	2 x 10 Sek.	Dehydrierung
<b>Isopropylalkohol</b>	2 x 10 Sek.	Dehydrierung
<b>Xylol</b>	3 x 10 Sek.	Dehydrierung

**Tabelle 5: Protokoll für die Doppelfärbung mit Antikörper gegen *α-smooth muscle actin* und vWF.**

Dargestellt sind die Arbeitsschritte der Doppelfärbung mit Antikörpern gegen *α-smooth muscle actin* und vWF zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades der pulmonalen Gefäße. Aqua dest.: destilliertes Wasser; Min.: Minuten; Sek.: Sekunden; %: Prozent; Ig: Immunglobulin; °C: Grad Celsius

Nach Durchführung des Protokolls wurden die Schnitte mittels Pertex und Deckgläschen luftfrei eingedeckt.

### **2.5.4 Mikroskopische Auswertung der Muskularisierung**

Die Auswertung wurde am Licht-Mikroskop mit Hilfe des Programms Leica QWinV3 und Excel durchgeführt. Hierfür wurde der Schnitt bei 400-facher Vergrößerung analysiert. Größere Gefäße wurden unter 200-facher bzw. 100-facher Vergrößerung untersucht. Zunächst wurde ein Weißabgleich durchgeführt sowie die Farbsättigung und die Belichtungszeit optimal eingestellt. Störende Strukturen im Gefäßlumen (z. B. Erythrozyten) wurden digital entfernt. Die Größe des pulmonalen Gefäßes wurde mittels der Graudetektion von der Software erfasst und der Violetanteil gemessen, um den Muskularisierungsgrad zu bestimmen.

Die Gefäße wurden während der Auswertung in unterschiedliche Gruppen eingeteilt, in kleine Gefäße mit einem Durchmesser von 20 – 70 µm, in mittelgroße Gefäße mit einem Durchmesser > 70 µm – 150 µm und in große Gefäße mit einem Durchmesser > 150 µm. Da aufgrund der Größe nur wenige bis keine pulmonalen Gefäße mit einem Durchmesser > 70 µm in den Lungenschnitten detektiert werden konnten, wurden in dieser Arbeit nur kleine pulmonale Gefäße analysiert. Anschließend wurden die Gefäße nach dem Grad ihrer Muskularisierung eingeteilt. Dabei wurden Gefäße mit einem Muskularisierungsanteil bis zu 5 % als nicht-muskularisiert, Gefäße mit einem Anteil > 5 – 70 % als teil-muskularisiert und Gefäße > 70 % Muskularisierungsanteil als voll-muskularisiert definiert, um im Anschluss den mittleren Muskularisierungsgrad der Gefäße zu berechnen.

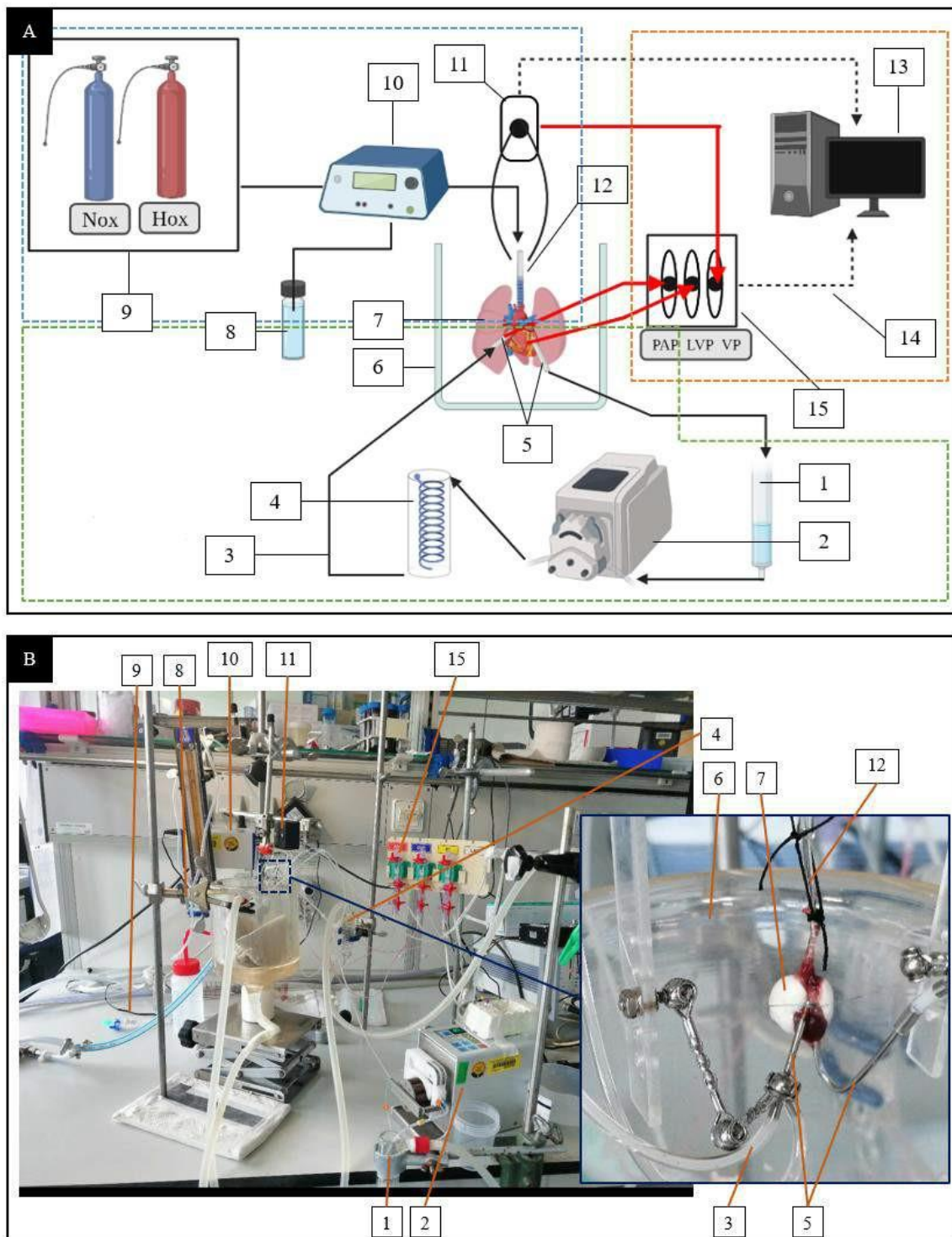
## 2.6 Isolierte, ventilierte und blutfrei-perfundierte Lunge (ILU)

### 2.6.1 Aufbau des Messsystems

Der Aufbau der ILU gliedert sich in Lungenventilation, Lungenperfusion und Datenaufzeichnung (**Abbildung 9**).

Die Ventilation erfolgte mittels eines Ventilationsgerätes (**10**) über einen Tubus (**12**), der in die *Trachea* eingebracht ist. Während des Experimentes wurden die Lungen (**7**) mit hypoxischem bzw. normoxischem Gasmisch (9) mit einem künstlichen Überdruck (PEEP, *positive end-expiratory pressure*) von 3 cm H<sub>2</sub>O (**8**) ventiliert, um ein Kollabieren der Alveolen zu vermeiden. Die Perfusion der Lunge erfolgte über einen künstlichen Perfusionskreislauf. Dabei wurde jeweils ein Katheter (**5**) in der *Arteria pulmonalis* sowie im linken Ventrikel positioniert. Die Perfusionslösung wurde von einem Sammelbehälter (**1**) mit Hilfe einer angeschlossenen Peristaltikpumpe (**2**) durch das Schlauchsystem (**3**) hin zur Lunge geleitet. Auf dem Weg wurde das Perfusat auf eine Temperatur von ca. 40 °C im Wärmeaustauscher (**4**) erwärmt. Mit Hilfe des Wärmeaustauschers wurden außerdem Luftblasen abgefangen, um das Risiko einer Luftembolie zu minimieren. Nachdem das Perfusat die Lunge passiert hatte, wurde es zurück in den Sammelbehälter geleitet, um den Kreislauf zu schließen.

Während der Versuchsdauer wurden das Lungengewicht, der linksventrikuläre Druck (LVP, *left ventricular pressure*) und PAP kontinuierlich gemessen. Das Lungengewicht wurde mittels einer Wägezelle (**11**) aufgezeichnet, um z. B. die Entstehung eines Lungenödems durch den Austritt von Flüssigkeit aus den Kapillaren in das Lungengewebe anhand von Gewichtsveränderungen zu detektieren. Die Messungen des LVP sowie des PAP erfolgte durch zwischengeschaltete Drucksensoren (**15**). Der PAP stellt dabei ein direktes Maß für das Ausmaß der Vasokonstriktion dar und spiegelt somit die Zunahme des Gefäßwiderstands im pulmonalen Kreislauf wider.



**Abbildung 9: Aufbau der isolierten, ventilerten und blutfrei-perfundierten Lunge (ILU).**

(A) Schematischer Aufbau der ILU und (B) tatsächlicher Aufbau. Der Aufbau umfasst die Ventilation der Lunge (blau umrandet; 8 bis 10, 12), die Perfusion der Lunge (grün umrandet; 1 bis 7) und die Datenaufzeichnung (orange umrandet; 11, 13 bis 15). (1) Sammelbehälter, (2) Peristaltikpumpe, (3) Schlauchsystem, (4) Bläschenfalle/Wärmeaustauscher, (5) Katheter, (6) Glasglocke, (7) Lunge und Herz, (8) PEEP (*positive end-expiratory pressure*), (9) Gaszufuhr, (10) Ventilationsgerät, (11) Wägezelle, (12) Tubus, (13) Computer, (14) Informationsübermittlung, (15) Drucksensoren, Nox: normoxisches Gas, Hox: hypoxisches Gas

### **2.6.2 Vorbereitung des Systems**

Zur Vorbereitung des Perfusionssystems für die Messung wurde zunächst der Sammelbehälter zwei- bis dreimal mit Aqua dest. gespült und anschließend mit Aqua dest. aufgefüllt. Zudem wurde das Schlauchsystem sowie die Drucksensoren durchgespült und Luftblasen in den Verbindungsschläuchen entfernt. Schließlich wurde das Perfusat mit normoxischem Gasgemisch (Zusammensetzung: ca. 79 % Stickstoff, ca. 21 % O<sub>2</sub>, 0,04 % CO<sub>2</sub>, weitere Spurengase) vorbereitet. Durch das im Perfusat enthaltene Bicarbonat sowie das im Gasgemisch enthaltene CO<sub>2</sub> konnte so ein pH-Wert von  $7,2 \pm 0,02$  eingestellt werden und das Schlauchsystem mit diesem Perfusat gespült werden. Das System wurde erneut auf Luftblasen untersucht, die Pumpgeschwindigkeit auf ein Minimum reduziert und die Temperatur auf 4 °C für die nachfolgende Präparation gesenkt.

### **2.6.3 Anästhesie der Maus und Präparation**

Für die Durchführung der ILU wurden männliche Versuchsmäuse mit Hilfe einer Injektionsnarkose von Ketaminhydrochlorid (100 mg / kg KG) und Xylazin (20 mg / kg KG) in 0,9 % NaCl-Lösung betäubt. Die Applikation der Narkose erfolgte intraperitoneal durch genehmigte Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen per Mischspritze (0,1 ml pro 10 g KG) gemäß Tierversuchsantrag (Aktenzeichen GI 20/10 Nr. 105/2015, JLU Nr. 738\_GP). Zur Antikoagulation wurde Heparin (500 I.E. / 10 g KG) injiziert. Die Narkosetiefe wurde durch das Testen von nozizeptiven Reflexen (Zwischenzehenreflex) kontrolliert.

Anschließend wurde die Versuchsmaus auf den Rücken liegend an einer Korkplatte fixiert und die Haut des oberen Abdomens und des Thorax eröffnet. Zur Freilegung der *Trachea* wurden sowohl die Speicheldrüsen als auch die aufliegende Muskulatur entfernt. Nach Eröffnung der *Trachea* wurde die Versuchsmaus intubiert. Der Tubus wurde mit Hilfe eines Fadens fixiert und über das Schlauchsystem an das Beatmungsgerät angeschlossen. Die Ventilation erfolgte mit normoxischem Gasgemisch (21 % O<sub>2</sub>), einem Volumen von 150 µl pro Atemzug und 90 Atemzügen pro Minute. Anschließend wurde das Abdomen eröffnet und das Diaphragma entfernt. Nach der Thorax-Eröffnung wurden die Rippenbögen auf der Korkplatte fixiert und Thymus sowie Fettgewebe entfernen. Im Anschluss erfolgte die Eröffnung des linken Ventrikels und des rechten Ventrikels unterhalb der *Arteria pulmonalis*. Der Katheter wurde über den rechten Ventrikel in die

*Arteria pulmonalis* eingeführt und mittels einer Ligatur fixiert. Über diesen Katheter erfolgte die Lungenperfusion mit oben beschriebenem Perfusat. Anschließend erfolgte die Tötung der Versuchsm Maus durch Blutentzug, indem die *Aorta abdominalis* durchtrennt wurde. Die Lunge und das Herz wurden nachfolgend aus dem Thorax gelöst. Ein zweiter Katheter wurde in den linken Ventrikel angebracht, um einen Abfluss des Perfusats zu gewährleisten.

Nach der Präparation wurde das Perfusat für die Messung mittels des Thermoreglers langsam auf 40 °C erwärmt, um physiologische Rahmenbedingungen für das Experiment zu schaffen. Außerdem wurde die Pumpgeschwindigkeit langsam und kontinuierlich auf eine finale Flussgeschwindigkeit von 2 ml pro Min. erhöht. Zuletzt wurde eine erwärmte, doppelwandige, mit feuchtem Zellstoff ausgekleidete Glasglocke um die Lunge positioniert, um ein Austrocknen und Auskühlen der Lunge zu verhindern. Die Messung der Daten wurde anschließend mittels der Software PulmoDyn aufgezeichnet und gespeichert.

#### **2.6.4 Messung der akuten und prolongierten Phase der HPV**

Um die Vasokonstriktion der Lungengefäße unter hypoxischer Ventilation zu untersuchen, wurde die Lunge in unterschiedlichen Intervallen mit normoxischem (21 % O<sub>2</sub>) oder hypoxischem (1 % O<sub>2</sub>) Gasgemisch ventiliert (**Abbildung 10**). Die Messung wurde mit einer Ventilation von 15 Min. mit normoxischem Gas begonnen, gefolgt von 10 Min. Ventilation mit hypoxischem Gas. Nach den ersten 25 Min. wurden die Lungen für 15 Min. mit normoxischem Gasgemisch und im Anschluss für 180 Min. mit hypoxischem Gasgemisch ventiliert. Am Ende der Messung folgten zwei weitere Phasen akuter Hypoxie. Dazu wurde die Lunge im Wechsel dreimal mit Normoxie und zweimal mit akuter Hypoxie wie zu Beginn ventiliert. Die ersten beiden Ventilationsphasen dienten der Adaptationsphase für eine konstante Lungenreaktion, um die Lungen auf den eigentlichen Versuch vorzubereiten. Die Versuchsaufzeichnung beginnt daher erst nach 25 Min., weshalb die erste akute Hypoxie in den Ergebnissen in dieser Abbildung der zweiten akuten Hypoxie entspricht.



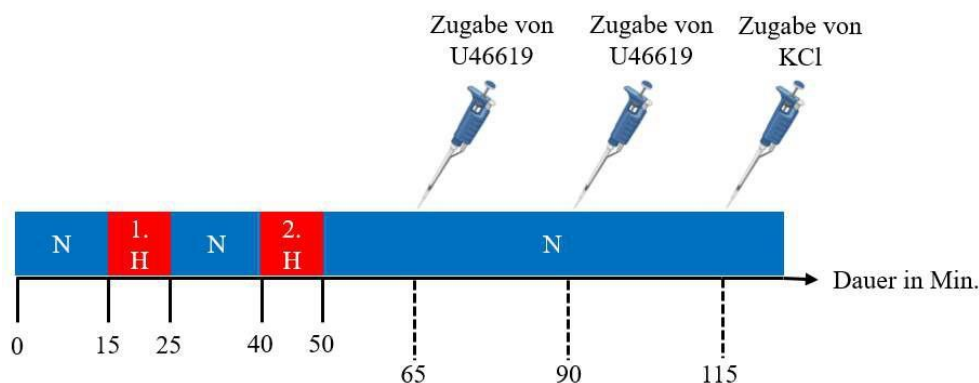
**Abbildung 10: Versuchsablauf der ILU.**

Versuchsablauf zur Untersuchung der HPV im ILU-Modell. Schematisch dargestellt sind die Zeitpunkte, zu denen die jeweilige Gas-Exposition gestartet bzw. gewechselt wurde. N/blau: Normoxie; H/rot: Hypoxie; Min.: Minuten; HPV: hypoxische pulmonale Vasokonstriktion; ILU: isolierte, blutfrei perfundierte, ventilierte Lunge

### 2.6.5 Messung der pulmonalen Vasokonstriktion bei Zugabe von U46619 und KCl

Um zu überprüfen, ob die Reaktionen auf akute Ventilation mit hypoxischem Gasgemisch für die HPV spezifisch sind, wurden der synthetische Thromboxan A<sub>2</sub> Rezeptor Agonist U46619 und KCl verwendet. Bei U46619 und KCl handelt es sich um Substanzen, die über jeweils unterschiedliche Mechanismen die akute Phase der Vasokonstriktion auslösen (**Abbildung 11**).

Zunächst wurde die Lunge für 15 Min. mit normoxischem Gasgemisch (21 % O<sub>2</sub>) ventiliert. Nach 10 Min. Ventilation mit hypoxischem Gasgemisch (1 % O<sub>2</sub>) wurde eine normoxische und eine hypoxische Ventilationsphase durchgeführt, um die akute HPV zu messen. Im Anschluss wurden unter normoxischer Bedingung zweimalig 0,57 nmol/l U46619 im Abstand von 25 Min. zum Perfusat gemäß etablierten Protokoll hinzugefügt (Malkmus 2022). Nach weiteren 25 Min. wurden 11,25 mmol/l KCl appliziert, welches für 10 Min. ausgewaschen wurde.



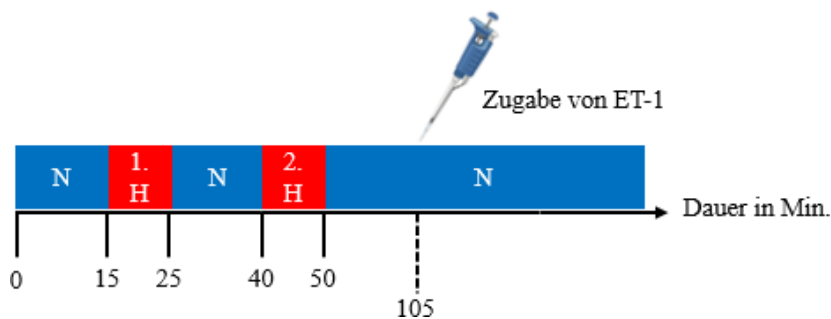
**Abbildung 11: Versuchsdurchführung der ILU mit Zugabe von U46619 und KCl.**

Versuchsablauf zur Untersuchung der Reaktion der Pulmonalgefäße nach Zugabe des synthetischen Thromboxan A<sub>2</sub> Rezeptor Agonisten U46619 und nach Zugabe von KCl. N/blau: Normoxie; H/rot: Hypoxie; Min.: Minuten; KCl: Kaliumchlorid; ILU: isolierte, blutfrei perfundierte, ventilierte Lunge

### 2.6.6 Messung der pulmonalen Vasokonstriktion bei Zugabe von Endothelin-1

Zur Überprüfung der Spezifität der fehlenden prolongierten Phase in TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen im Rahmen der HPV wurde ET-1 verwendet. Durch langanhaltende Hypoxie wird ET-1 aus den EC ausgeschüttet, welches zu einer Ca<sup>2+</sup>-Sensibilisierung führt und die prolongierte Phase der HPV mit reguliert (Shimoda et al. 2002) (**Abbildung 12**).

Hierfür wurde die Lunge für 15 Min. mit normoxischem Gasgemisch (21 % O<sub>2</sub>) gefolgt von einer hypoxischen Phase (1 % O<sub>2</sub>) von 10 Min. ventilert. Nach weiteren 15 Min. Normoxie erfolgte eine zweite Messung des mPAP während der 10 Min. hypoxischen Ventilation. Im Anschluss erfolgte die Applikation von 20 µM ET-1 unter Normoxie.

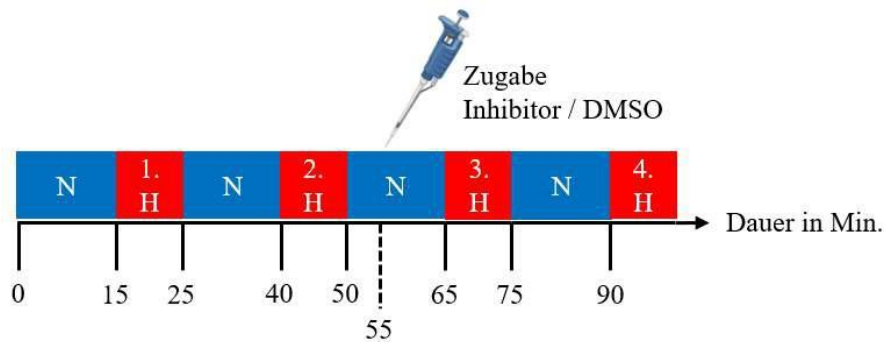


**Abbildung 12: Versuchsdurchführung der ILU mit Zugabe von ET-1.**

Versuchsablauf zur Untersuchung der Reaktion der Pulmonalgefäße nach Zugabe von Endothelin-1. N/blau: Normoxie; H/rot: Hypoxie; Min.: Minuten; ET-1: Endothelin-1; ILU: isolierte, blutfrei perfundierte, ventilierte Lunge

### 2.6.7 Messung der akuten Phase der HPV nach Zugabe von Inhibitoren

Um die Reaktion der Pulmonalgefäße auf eine spezifische Inhibition von TRPC6 zu untersuchen, wurde der TRPC6-Inhibitor BI-743927 verwendet (**Abbildung 13**). Der Inhibitor wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, weshalb die Kontrollen entsprechend mit DMSO durchgeführt wurden. Während des Versuchs wurde die Lunge abwechselnd mit normoxischem Gasgemisch (21 % O<sub>2</sub>) für 15 Min. und hypoxischem Gasgemisch (1 % O<sub>2</sub>) für 10 Min. ventilert. In der dritten Normoxie-Phase erfolgte die Applikation von 10 µM des TRPC6-Inhibitors BI-749327. Zur Kontrolle erfolgte an dieser Stelle eine Applikation von 10 µl DMSO.



**Abbildung 13: Versuchsdurchführung der ILU mit Zugabe des TRPC 6-Inhibitors BI-743927 / DMSO.**

Versuchsablauf zur Untersuchung der Reaktion der Pulmonalgefäße nach Zugabe des TRPC6-Inhibitors BI-749327 bzw. des TRPC1/6-Inhibitors GSMTx4 und als Kontrolle von DMSO im Rahmen einer akuten Hypoxie-Exposition (Hox, 1 % O<sub>2</sub>). N/blau: Normoxie; H/rot: Hypoxie; Min.: Minuten; DMSO: Dimethylsulfoxid; ILU: isolierte, blutfrei perfundierte, ventilierte Lunge TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

## 2.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung sowie Erstellung der Graphen wurde die Software GraphPad Prism 10 verwendet. Die Daten wurden dabei als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) angegeben. Vorab wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft sowie eine Outliner-Analyse durchgeführt. Wurden zwei Stichproben miteinander verglichen, wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Beim Vergleich verschiedener Gruppen mit zwei Variablen wurde eine *two-way* ANOVA mit Fisher's LSD Test durchgeführt. Die Anzahl der verwendeten Tiere (n-Zahl) wurde in den entsprechenden Abbildungsbeschreibungen angegeben. Dabei entsprechen p-Werte von < 0,05 einem signifikanten Ergebnis und wurden mit „\*“ markiert. Signifikante Ergebnisse, die sich nach dem *post-hoc* Test bzw. t-Test ergaben, wurden in den Abbildungen über den entsprechenden Diagrammen gekennzeichnet. Die Ergebnisse der *two-way* Anova wurden neben der Legende (Genotypeffekt, Konditionseffekt und Interaktion) angegeben.

### 3 Ergebnisse

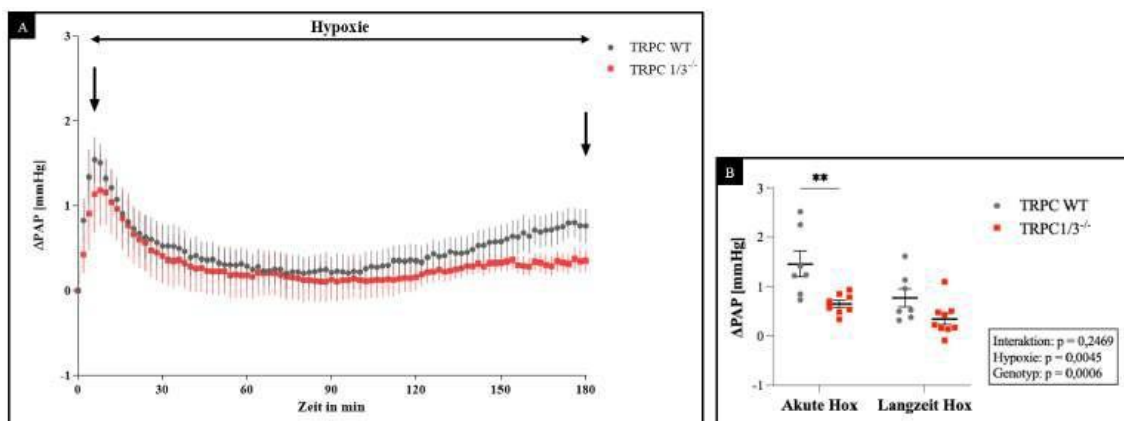
Im Pathomechanismus der CHPH spielt die Regulation der Calciumhämostasie eine entscheidende Rolle (Feske 2019; Derler et al. 2016; Wang et al. 2017; Cussac et al. 2020; Castillo-Galán et al. 2022). Im Rahmen dessen wird bereits die Rolle der TRPC Kanäle diskutiert (Earley und Brayden 2015; Minke und Cook 2002; Malczyk 2017; Montell et al. 2002; Malkmus et al. 2022; Mayser 2021; Malkmus 2022; Clapham et al. 2001; Weissmann et al. 2006). Es wurde bereits gezeigt, dass die TRPC Proteine 1, 3 und 6 sowohl in murinen als auch in humanen Lungen exprimiert werden (Tai et al. 2017; Kunert-Keil et al. 2006; Yu et al. 2004; Yu et al. 2003). In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass TRPC6 für die akute Phase der HPV wichtig ist, da das Fehlen von TRPC6 zum Verlust der akuten Phase der HPV führt (Fuchs et al. 2011; Weissmann et al. 2006). Nach chronischer Hypoxie über 21 Tage wurde zudem gezeigt, dass in pulmonalen Gefäßen der Maus TRPC1 vermehrt sowie TRPC3 vermindert exprimiert wurde. Ein Einfluss auf die Expression von TRPC6 konnte dahingegen nicht gezeigt werden (Malczyk et al. 2013). Auch konnte kein Einfluss von TRPC6 auf die CHPH nachgewiesen werden (Weissmann et al. 2006). Dahingegen führt der Verlust von TRPC1 in Mäusen zu einem partiellen Schutz vor CHPH (Malczyk 2017). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch TRPC3<sup>-/-</sup> Mäuse vor der Ausbildung einer CHPH partiell geschützt sind (Mayser 2021). Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der heteromeren Kanäle TRPC1/3 und TRPC1/6 basierend auf den zuvor gewonnenen Erkenntnissen in akuter und chronischer Hypoxie zu identifizieren.

#### 3.1 Akute und prolongierte Phase der HPV in TRPC1/3<sup>-/-</sup>, TRPC1/6<sup>-/-</sup> und WT Mäusen

Um den Effekt des Verlustes von TRPC1 und TRPC3 sowie TRPC1 und TRPC6 auf die HPV zu untersuchen, wurden TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen in der ILU im Vergleich zu WT Lungen untersucht (**Abbildung 14**; **Abbildung 15**). Unter Normoxie ist unabhängig des Genotyps kein Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks ( $\Delta$ PAP in mmHg) in den Mauslungen zu beobachten (Weissmann et al. 2006). Lungen aus WT Mäusen reagierten auf akute alveoläre Hypoxie mit einer biphasisch ablaufenden Vasokonstriktion, die mit einer Erhöhung des  $\Delta$ PAP einhergeht (**Abbildung 14 A**; **Abbildung 15 A**). Bei akuter hypoxischer Ventilation konnte ein  $\Delta$ PAP-Anstieg nach wenigen Minuten (akute Phase) beobachtet werden. Dabei reagierten Lungen isoliert aus

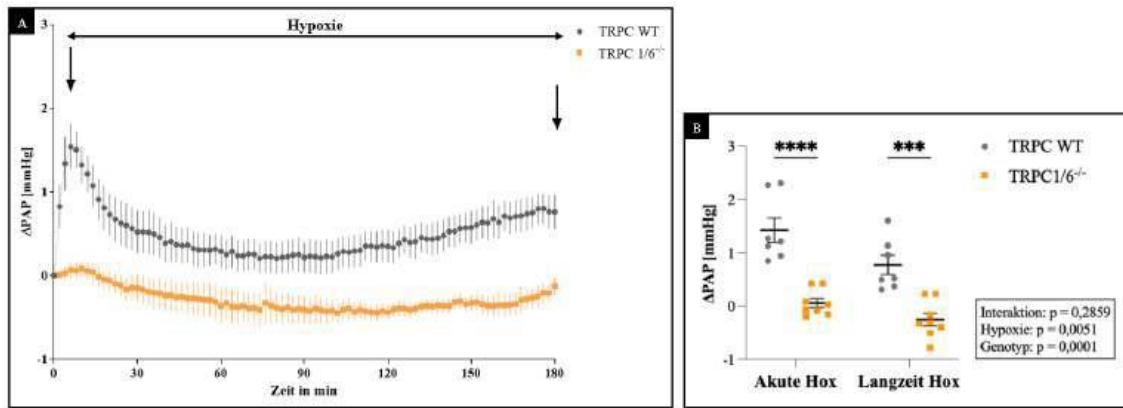
TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen auf akute Hypoxie mit einem geringeren  $\Delta$ PAP-Anstieg als Lungen isoliert aus WT Mäusen (**Abbildung 14**). Im Gegensatz dazu zeigten Lungen isoliert aus TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen auf akute Hypoxie-Exposition keinen Anstieg des  $\Delta$ PAP (**Abbildung 15**).

Nach der akuten Phase sank der  $\Delta$ PAP zunächst auf das Ausgangsniveau ab, um anschließend im Rahmen der Langzeit-Hypoxie erneut kontinuierlich anzusteigen (prolongierte Phase). Lungen isoliert aus TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten wie die Lungen aus WT Mäusen einen erneuten  $\Delta$ PAP-Anstieg, welcher sich von den WT Mäusen dabei jedoch nicht unterschied (**Abbildung 14**). Bei Lungen isoliert aus TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen hingegen konnte unter Langzeit-Hypoxie keine Reaktion auf alveoläre Hypoxie in Form eines  $\Delta$ PAP-Anstiegs gemessen werden (**Abbildung 15**).



**Abbildung 14: Akute und langanhaltende Hypoxie in WT und TRPC1/3<sup>-/-</sup> Lungen.**

Darstellung der relativen Änderung des PAP ( $\Delta$ PAP) in mmHg während der Untersuchung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. Die Messung des  $\Delta$ PAP erfolgte nach hypoxischer Ventilation (Hox) mit 1% Sauerstoff. Die Auswertungen des  $\Delta$ PAP der WT Lungen (n = 7) wurden mit denen der TRPC1/3<sup>-/-</sup> Lungen (n = 9) verglichen. **A**) Übersicht der  $\Delta$ PAP Messung bei Hox über 180 Min. Mit Pfeilen markiert sind die Zeitpunkte, welche im Rahmen der akuten Hypoxie (10 Min.) und Langzeit Hypoxie (180 Min.) zur Auswertung herangezogen wurden. **B**) Auswertung der  $\Delta$ PAP Messung nach 10 Min. (akute Hypoxie) und nach 180 Min. (Langzeit Hypoxie). Signifikant, wenn \* ( $p \leq 0,05$ ).  $\Delta$ PAP: relative Änderung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks; %: Prozent; Min.: Minuten; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*



**Abbildung 15: Akute und langanhaltende Hypoxie in WT und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen.**

Darstellung der relativen Änderung des PAP ( $\Delta$ PAP) in mmHg während der Untersuchung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. Die Messung des  $\Delta$ PAP erfolgte nach hypoxischer Ventilation (Hox) mit 1% Sauerstoff. Die Auswertungen des  $\Delta$ PAP der WT Lungen ( $n = 7$ ) wurden mit denen der TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen ( $n = 8$ ) verglichen. **A**) Übersicht der  $\Delta$ PAP Messung bei Hox über 180 Min. Mit Pfeilen markiert sind die Zeitpunkte, welche im Rahmen der akuten Hypoxie (10 Min.) und Langzeit Hypoxie (180 Min.) zur Auswertung herangezogen wurden. **B**) Auswertung der  $\Delta$ PAP Messung nach 10 Min. (akute Hypoxie) und nach 180 Min. (Langzeit Hypoxie). Signifikant, wenn \*\* ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ).  $\Delta$ PAP: relative Änderung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks; %: Prozent; Min.: Minuten; mmHg: Millimeter Quecksilbersäule; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

### 3.2 Pulmonale Vasokonstriktion nach Zugabe von U46619 oder Kaliumchlorid

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Vasokonstriktion der Lungengefäße auf akute Hypoxie um eine Hypoxie-spezifische Antwort handelte, wurde entweder U46619 als Thromboxan A<sub>2</sub> Rezeptor Agonist (**Abbildung 16**) oder KCl (**Abbildung 18**) verwendet. Die Gabe von U46619 oder KCl führt zu einer Vasokonstriktion über unterschiedliche Mechanismen, was jeweils zum Anstieg des PAP führt. Nach Zugabe von U46619 reagierten Lungen aus WT Mäusen mit einem Anstieg des PAP (**Abbildung 16**). Lungen isoliert aus TRPC1/3<sup>-/-</sup> (**Abbildung 16 A**) sowie aus TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 16 B**) reagierten mit einem zu den WT Lungen vergleichbaren PAP-Anstieg. Zur Kontrolle wurde vor der Applikation von U46619 eine akute Hypoxie-Phase gemessen. In dieser zeigte sich, wie bereits bekannt, bei den WT Lungen wie auch bei den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Lungen ein PAP-Anstieg (**Abbildung 16 A**). Dabei konnte kein Unterschied zwischen dem Anstieg unter Hypoxie sowie nach Applikation von U46619 festgestellt werden. Die TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen zeigten auf Hypoxie, wie erwartet, keinen Anstieg des PAP (**Abbildung 16 B**).

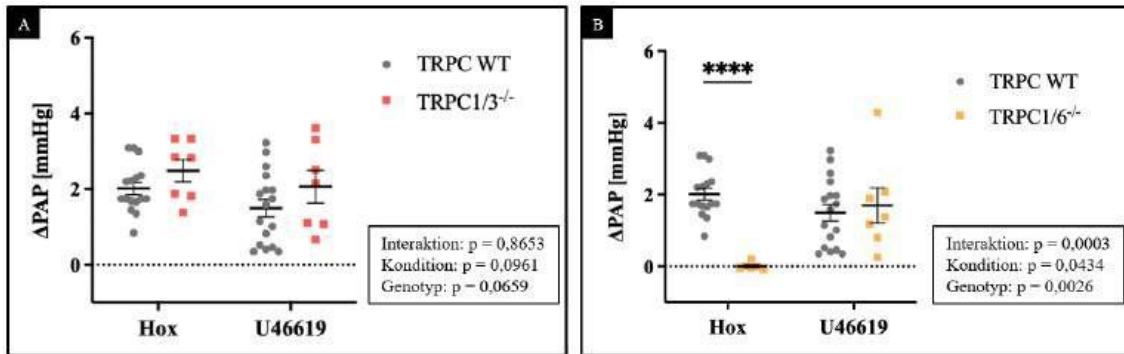


Abbildung 16: Pulmonale Vasokonstriktion in WT, TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen nach Zugabe von U46619.

Darstellung der relativen Änderung des PAP ( $\Delta$ PAP) in mmHg während der Untersuchung der pulmonalen Vasokonstriktion nach Zugabe des Thromboxan A<sub>2</sub> Rezeptor Agonisten U46619. Gabe nach 25 Min. **A**) Es werden WT Lungen (n = 17) mit Lungen isoliert aus TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (n = 7) verglichen. **B**) Es werden WT Lungen (n = 17) mit Lungen isoliert aus TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (n = 7) verglichen. Signifikant, wenn \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ).  $\Delta$ : relative Änderung; PAP: mittlerer pulmonaler arterieller Druck; mmHg: Millimeter Quecksilbersäule; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

Zusätzlich wurden TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Mauslungen mit Hilfe von U46619 genauer untersucht (**Abbildung 17**). TRPC1<sup>-/-</sup> und TRPC3<sup>-/-</sup> Mauslungen reagierten auf akute Hypoxie mit einem akuten PAP-Anstieg in einem gleichen Maß wie die WT Lungen. Nach Gabe von U46619 wurde in TRPC1<sup>-/-</sup> Lungen ein höherer PAP-Anstieg verglichen mit den WT Lungen gezeigt. TRPC3<sup>-/-</sup> Lungen reagierten auf die Gabe von U46619 wie die WT Lungen. TRPC6<sup>-/-</sup> Mauslungen zeigten keine Reaktion auf akute Hypoxie. Jedoch reagierten diese Lungen auf U46619 vergleichbar wie die WT Mauslungen.

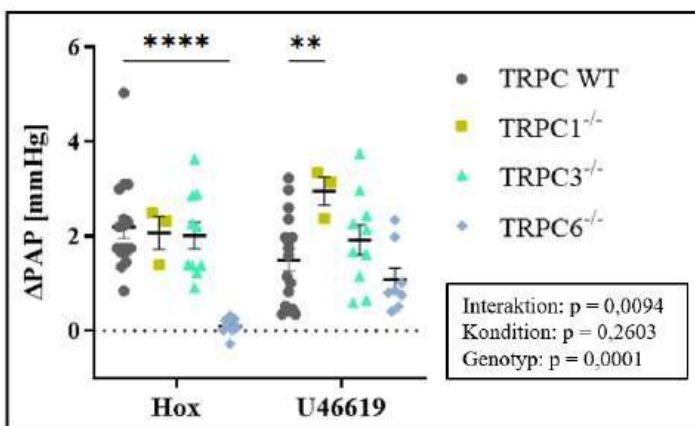
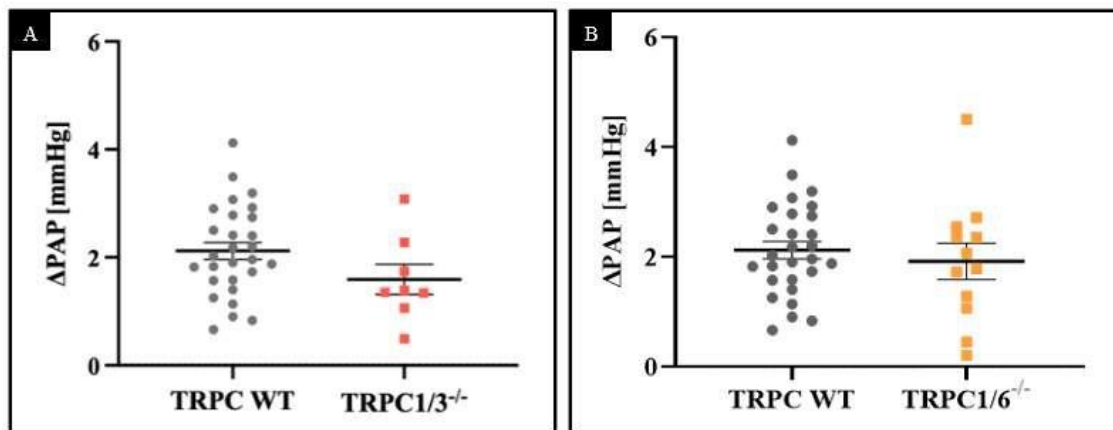


Abbildung 17: Pulmonale Vasokonstriktion in WT, TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Lungen nach Zugabe von U46619.

Darstellung der relativen Änderung des PAP ( $\Delta$ PAP) in mmHg während der Untersuchung der pulmonalen Vasokonstriktion nach Zugabe des Thromboxan A<sub>2</sub> Rezeptor Agonisten U46619. Gabe nach 25 Min. Es werden WT Lungen (n = 17) mit Lungen isoliert aus TRPC1<sup>-/-</sup> (n = 3), TRPC3<sup>-/-</sup> (n = 10) und TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen (n = 8) verglichen. Signifikant, wenn \*\* (p ≤ 0,01); \*\*\*\* (p ≤ 0,0001). Δ: relative Änderung; PAP: mittlerer pulmonalarterieller Druck; mmHg: Millimeter Quecksilbersäule; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

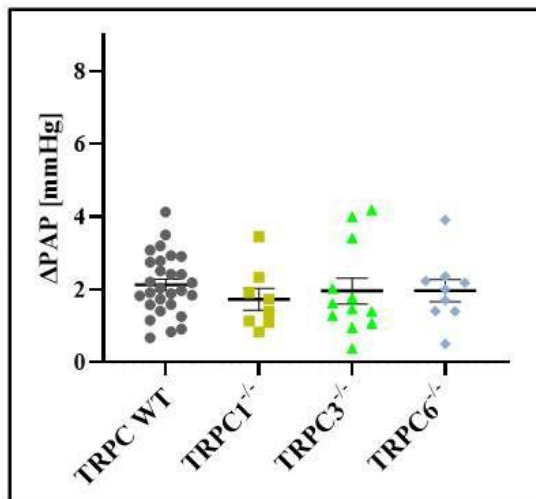
Bei der Induktion der Vasokonstriktion mit Hilfe von KCl zeigte sich ebenfalls ein Anstieg des PAP in WT Mauslungen. Lungen aus TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen reagierten mit einem zu den WT Mauslungen vergleichbaren PAP-Anstieg (**Abbildung 18**).



**Abbildung 18: Pulmonale Vasokonstriktion in WT, TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen nach Zugabe von KCl.**

Darstellung der relativen Änderung des PAP ( $\Delta$ PAP) in mmHg während der Untersuchung der pulmonalen Vasokonstriktion nach Zugabe von KCl. **A**) Es werden WT Lungen (n = 30) mit Lungen isoliert aus TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (n = 8) verglichen. **B**) Es werden WT Lungen (n = 30) mit Lungen isoliert aus TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (n = 12) verglichen. Signifikant, wenn \* (p ≤ 0,05). Δ: relative Änderung; PAP: mittlerer pulmonalarterieller Druck; mmHg: Millimeter Quecksilbersäule; Hox: Hypoxie; KCl: Kaliumchlorid; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

Zusätzlich wurde ebenfalls der PAP von TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Mauslungen nach Applikation von KCl gemessen. Nach Gabe von KCl zeigten WT Mauslungen einen Anstieg des PAP. In TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Mauslungen konnte ebenfalls ein PAP-Anstieg, vergleichbar zu den WT Mauslungen, beobachtet werden (**Abbildung 19**).

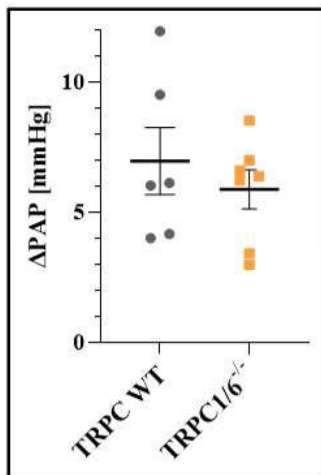


**Abbildung 19: Pulmonale Vasokonstriktion in WT, TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Lungen nach Zugabe von KCl.**

Darstellung der relativen Änderung des PAP ( $\Delta$ PAP) in mmHg während der Untersuchung der pulmonalen Vasokonstriktion nach Zugabe von KCl. Es werden WT Lungen (n = 30) mit Lungen isoliert aus TRPC1<sup>-/-</sup> (n = 8), TRPC3<sup>-/-</sup> (n = 12) TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen (n = 9) verglichen. Signifikant, wenn \* ( $p \leq 0,05$ ).  $\Delta$ : relative Änderung; PAP: mittlerer pulmonalarterieller Druck; mmHg: Millimeter Quecksilbersäule; Hox: Hypoxie; KCl: Kaliumchlorid; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

### 3.3 Pulmonale Vasokonstriktion nach Zugabe von ET-1

Um zu überprüfen, ob es sich bei der fehlenden Reaktion der TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen auf die langanhaltende Hypoxie-Exposition um eine Hypoxie-spezifische Antwort handelte, wurden Versuche mit dem vasokonstriktiv wirkenden Peptidhormon ET-1 durchgeführt. Physiologisch wird ET-1 unter hypoxischen Bedingungen vom Endothel der Pulmonalgefäße freigesetzt. ET-1 ist für die Vasokonstriktion der Pulmonalgefäße im Rahmen der prolongierten HPV verantwortlich und führt dabei zu einem Anstieg des PAP. So kann in Lungen, in denen das Endothel aus den Pulmonalgefäßen entfernt wurde, keine prolongierte HPV nachgewiesen werden (Young et al. 2019; Sommer et al. 2016). Bei der Applikation von ET-1 in WT und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mauslungen wurde ein Druckanstieg des PAP beobachtet (**Abbildung 20**), der in beiden Genotypen vergleichbar war.



**Abbildung 20: Pulmonale Vasokonstriktion in WT und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen nach Zugabe von ET-1.**

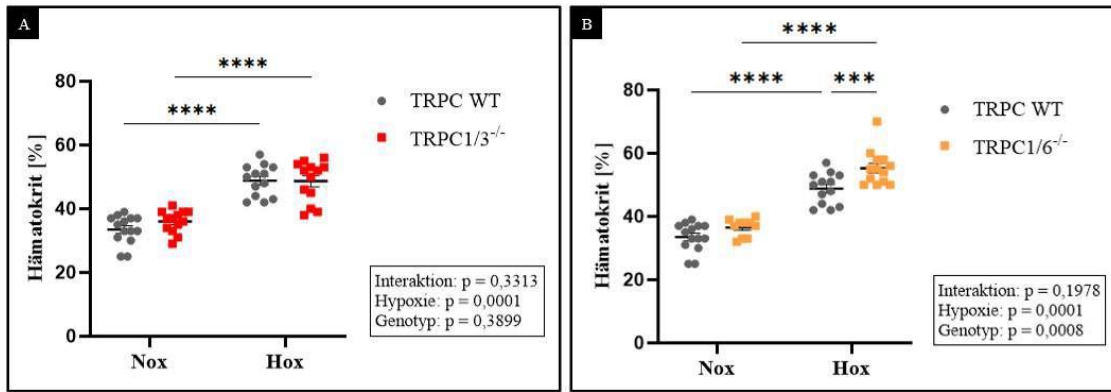
Darstellung der relativen Änderung des PAP ( $\Delta$ PAP) in mmHg während der Untersuchung der pulmonalen Vasokonstriktion nach Zugabe von ET-1. Es werden WT Lungen (n = 6) mit Lungen isoliert aus TRPC1/6<sup>-/-</sup> (n = 7) Mäusen verglichen.  $\Delta$ : relative Änderung; PAP: mittlerer pulmonaler arterieller Druck; mmHg: Millimeter Quecksilbersäule; Hox: Hypoxie; ET-1: Endothelin-1; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

### 3.4 Untersuchungen in TRPC1/3<sup>-/-</sup>, TRPC1/6<sup>-/-</sup> und WT Mäusen im Rahmen der PH-Entstehung

Zur Untersuchung der Bedeutung von TRPC1/3 und TRPC1/6 in der CHPH wurden TRPC1/3<sup>-/-</sup>, TRPC1/6<sup>-/-</sup> und WT Mäuse für 28 Tage unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration) Bedingungen gehalten. Im Anschluss wurden die Mäuse hämodynamisch und echokardiographisch untersucht, um Daten zu Druckverhältnissen und Muskelhypertrophie im Herzen zu erheben.

#### 3.4.1 Einfluss von Hypoxie auf die Hämodynamik in WT, TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen

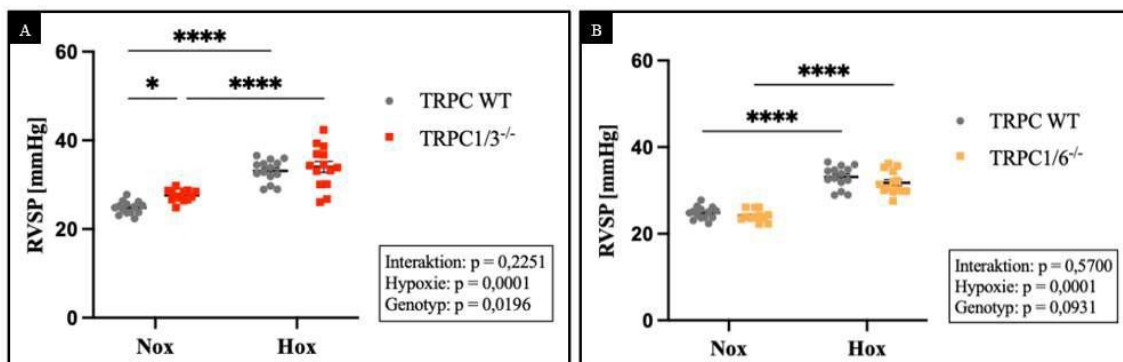
Zunächst wurde der Hämatokrit der Mäuse bestimmt, der unter Hypoxie durch eine gesteigerte Erythropoese zunimmt. In allen Genotypen wurde ein Anstieg des Hämatokrits beobachtet (**Abbildung 21**). Dabei konnte zwischen WT und TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen kein Unterschied festgestellt werden (**Abbildung 21 A**). TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse hingegen zeigten unter Hypoxie einen höheren Hämatokrit als die WT Mäuse (**Abbildung 21 B**).



**Abbildung 21: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den Hämatokrit-Wert in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC 1/6<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Darstellung des Hämatokrits nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration). **A)** Auswertung des Hämatokrits der WT Mäuse (Nox: n = 14, Hox: n = 13) im Vergleich zu TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 13, Hox: n = 13). **B)** Auswertung des Hämatokrits der WT Mäuse (Nox: n = 14, Hox: n = 13) im Vergleich zu TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 10, Hox: n = 13). Signifikant, wenn \*\*\* (p ≤ 0,001); \*\*\*\* (p ≤ 0,0001). %: Prozent; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

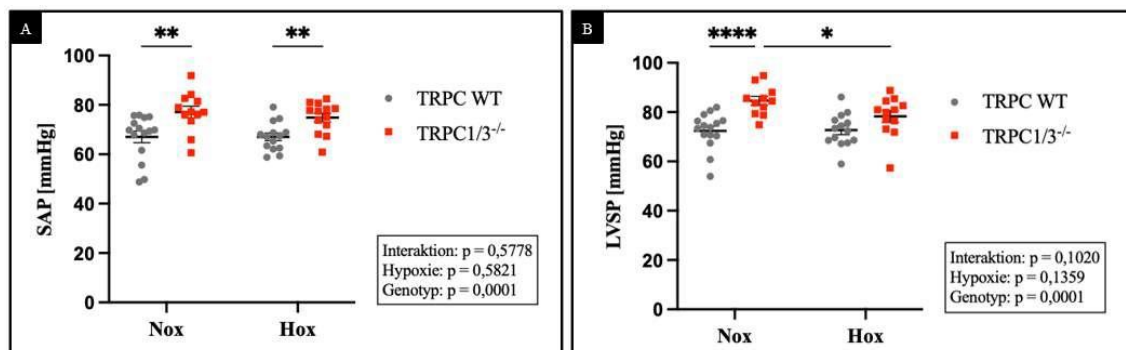
Außerdem wurde im Rahmen der hämodynamischen Messung der RVSP ermittelt, welcher als Maß für die Ausprägung der PH gilt. WT Mäuse reagierten unter Hypoxie mit einem Anstieg des RVSP (**Abbildung 22**). Eine vergleichbare Erhöhung des RVSP unter Hypoxie zeigte sich auch bei den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen. Allerdings wurde bei den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen unter Normoxie ein höherer RVSP als bei den WT Mäusen nachgewiesen. Unter Hypoxie konnte dieser Unterscheid zwischen beiden Genotypen nicht mehr beobachtet werden (**Abbildung 22 A**). TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten keinen Unterschied zu den WT Mäusen und reagierten auf Hypoxie mit einem zu den WT Mäusen vergleichbaren Anstieg des RVSP (**Abbildung 22 B**).



**Abbildung 22: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den RVSP in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Darstellung des RVSP in mmHg nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration). **A)** Auswertung des RVSP der WT Mäuse (Nox: n = 15, Hox: n = 14) verglichen mit den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 13, Hox: n = 14). **B)** Auswertung des RVSP der WT Mäuse (Nox: n = 15, Hox: n = 14) verglichen mit den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 12, Hox: n = 15). Signifikant, wenn \*\* (p ≤ 0,01); \*\*\*\* (p ≤ 0,0001). RVSP: *right ventricular systolic pressure*; mmHg: Millimeter Quecksilbersäule; %: Prozent; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

Zusätzlich wurden im Rahmen der hämodynamischen Messung der SAP sowie der LVSP zur Detektion möglicher linksventrikulärer Veränderungen bestimmt. Der SAP sowie LVSP zeigte sich in WT Mäusen unter Hypoxie nicht verändert (**Abbildung 23; Abbildung 24**). Bei TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten sich sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie ein höherer SAP als bei WT Mäusen. Dabei konnte jedoch innerhalb der TRPC1/3<sup>-/-</sup> Gruppe kein Unterschied des SAP unter Hypoxie festgestellt werden (**Abbildung 23 A**). Ebenfalls zeigte sich bei TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen unter Normoxie ein höherer LVSP als bei den WT Mäusen. Der LVSP sank unter Hypoxie-Exposition wieder ab, sodass zu den WT Mäusen unter Hypoxie vergleichbare LVSP Werte beobachtet werden konnten (**Abbildung 23 B**).

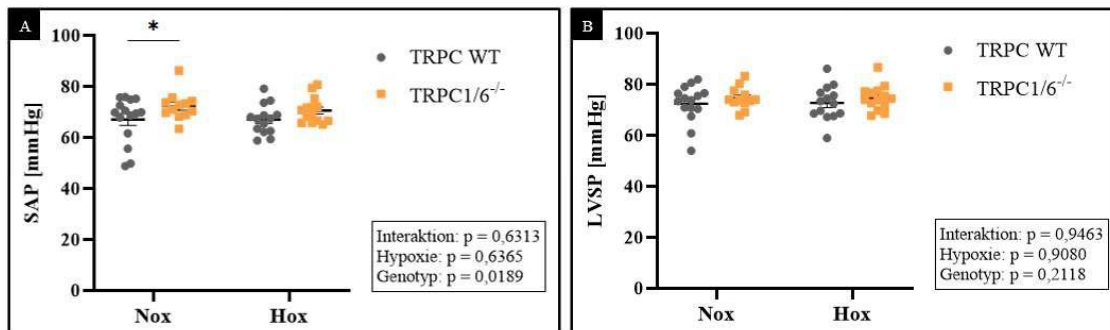


**Abbildung 23: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den SAP und LVSP in TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Darstellung des SAP und LVSP in mmHg nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration). **A)** Auswertung des SAP der WT Mäuse (Nox: n = 15, Hox: n = 14) verglichen mit den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 13, Hox: n = 14). **B)** Auswertung des LVSP der WT Mäuse (Nox: n = 15, Hox: n = 14) verglichen mit den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 12, Hox: n = 13). Signifikant, wenn \* (p ≤ 0,05); \*\* (p ≤ 0,01); \*\*\* (p ≤ 0,001). SAP: *systolic arterial pressure*; LVSP: *left ventricular systolic pressure*; mmHg: Millimeter Quecksilbersäule; %: Prozent; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

Bei TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen konnte unter Normoxie verglichen mit der Kontrollgruppe ebenfalls ein erhöhter SAP festgestellt werden. Unter Hypoxie konnte kein Unterschied mehr beobachtet werden (**Abbildung 24 A**). Der LVSP war in der Gruppe der

TRPC1/6<sup>-/-</sup> und WT Mäuse sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie vergleichbar (Abbildung 24 B).



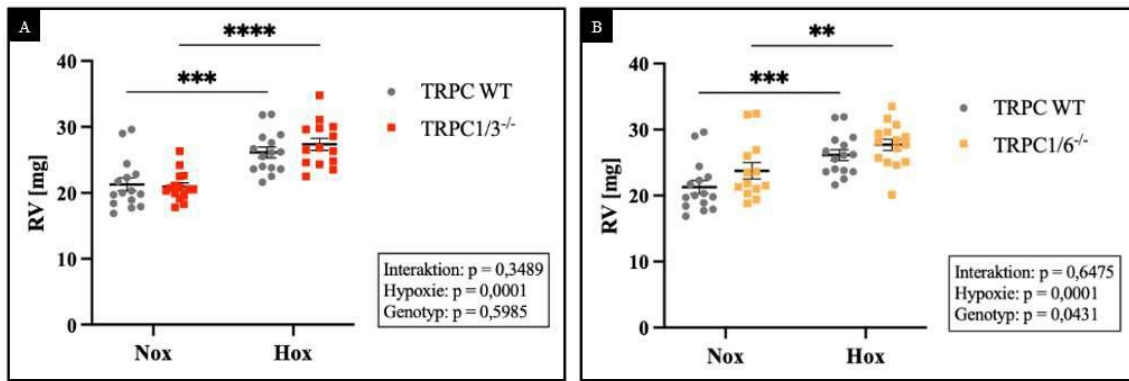
**Abbildung 24: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den SAP und LVSP in TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Darstellung des SAP und LVSP in mmHg nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration). **A)** Auswertung des SAP der WT Mäuse (Nox: n = 15, Hox: n = 14) verglichen mit den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 12, Hox: n = 14). **B)** Auswertung des LVSP der WT Mäuse (Nox: n = 15, Hox: n = 14) verglichen mit den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 12, Hox: n = 14). Signifikant, wenn \* ( $p \leq 0,05$ ). SAP: *systolic arterial pressure*; LVSP: *left ventricular systolic pressure*; mmHg: Millimeter Quecksilbersäule; %: Prozent; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

### 3.4.2 Kardiale Veränderungen nach chronischer Hypoxie-Exposition

Um zu untersuchen, ob TRPC1/3 und TRPC1/6 einen Einfluss auf die Entstehung der RHH in der CHPH haben, wurde die Masse des RV, der Fulton-Index sowie echokardiographisch die RVWT und die TAPSE bestimmt. Zur Bestimmung von möglichen Linksherzveränderungen wurde zusätzlich die Masse aus LV + S als ein Maß für die Linksherzhypertrophie (LHH) bestimmt.

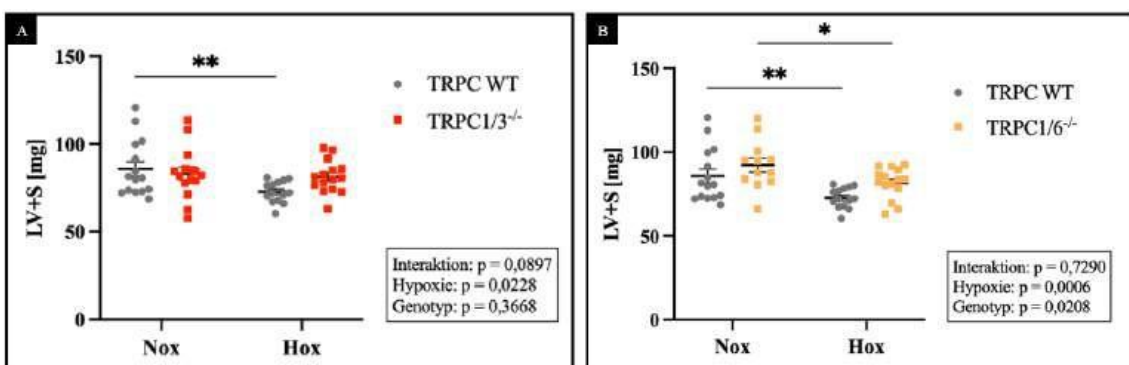
Unter Hypoxie war bei WT Mäusen ein signifikant schwererer RV zu beobachten (Abbildung 25). Auch bei TRPC1/3<sup>-/-</sup> (Abbildung 25 A) und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 25 B) zeigte der RV eine signifikant höhere Masse, wobei die Werte vergleichbar mit denen der WT Mäusen waren.



**Abbildung 25: Einfluss von chronischer Hypoxie auf das Gewicht des RV in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Darstellung der Masse des RV in mg nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration). **A)** Auswertung der Masse des RV der WT Mäuse (Nox: n = 15, Hox: n = 15) verglichen mit den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 15, Hox: n = 15). **B)** Auswertung der Masse des RV der WT Mäuse (Nox: n = 15, Hox: n = 15) verglichen mit den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 13, Hox: n = 15). Signifikant, wenn \* (p ≤ 0,05); \*\* (p ≤ 0,01); \*\*\* (p ≤ 0,001); \*\*\*\* (p ≤ 0,0001). RV: rechter Ventrikel; mg: Milligramm; %: Prozent; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer transient receptor potential channel

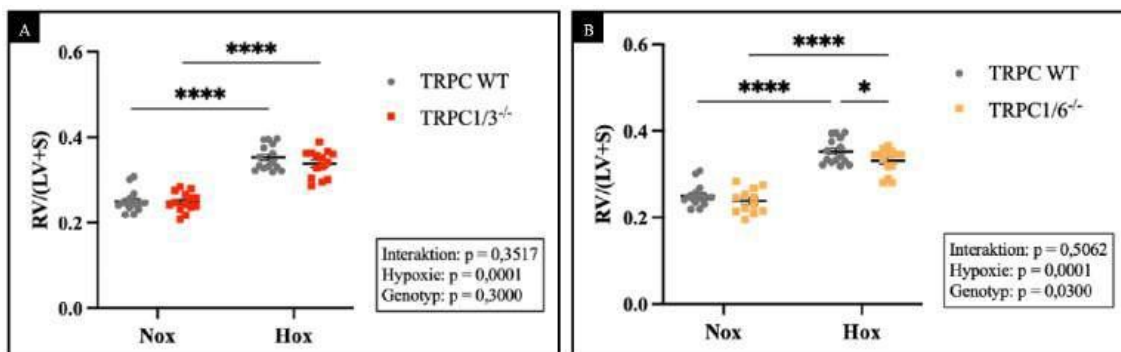
Zur Bestimmung der LHH wurde das Gewicht aus LV und S addiert. Das Gewicht aus LV und S war in WT Mäusen unter Hypoxie geringer (**Abbildung 26**). Bei den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich keine Änderung der Masse aus LV + S nach Hypoxie-Exposition. Die Werte waren sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie jedoch vergleichbar mit denen der WT Mäuse (**Abbildung 26 A**). Bei den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen hingegen wurde wie bei den WT Mäusen ein geringeres Gewicht des linken Herzens unter Hypoxie festgestellt. Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie konnte wiederum kein Unterschied zwischen beiden Genotypen festgestellt werden (**Abbildung 26 B**).



**Abbildung 26: Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Masse von LV + S in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Darstellung der Masse des linken Herzens in mg nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration). Bestimmung der Masse des linken Herzens aus der Summe des Herzgewichts aus LV und S. **A)** Auswertung der Masse des LV + S der WT Mäuse (Nox: n = 15, Hox: n = 15) verglichen mit den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 15, Hox: n = 15). **B)** Auswertung der Masse des LV + S der WT Mäuse (Nox: n = 15, Hox: n = 15) verglichen mit den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 13, Hox: n = 15). Signifikant, wenn \* (p ≤ 0,05); \*\* (p ≤ 0,01). LV: linker Ventrikel; S: Septum; mg: Milligramm; %: Prozent; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

Zudem wurde der Fulton-Index als Maß für die RHH bestimmt. Hierfür wurde die Masse des RV in Relation zur Masse des LV + S gestellt. Aufgrund des erhöhten Herzgewichts des RV zeigten WT Mäuse bei reduziertem Herzgewicht des LV + S einen erhöhten Fulton-Index (**Abbildung 27**). TRPC1/3<sup>-/-</sup> zeigten zu den WT Mäusen vergleichbare Werte des Fulton-Indices (**Abbildung 27 A**). Dahingegen konnte bei TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen zwar ein erhöhter Fulton-Index unter Hypoxie beobachtet werden, jedoch war dieser geringer verglichen mit den WT Mäusen (**Abbildung 27 B**).

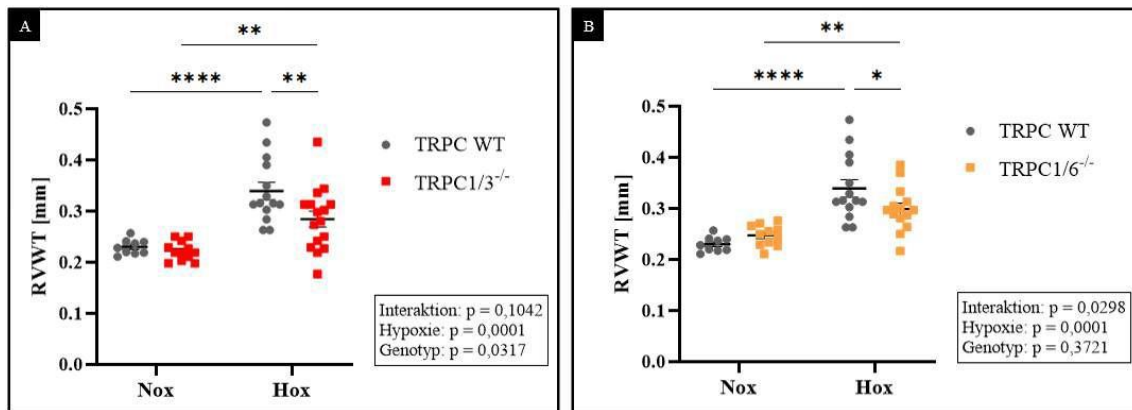


**Abbildung 27: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den Fulton-Index in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Darstellung des Fulton-Index nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration). Bestimmung des Fulton-Index durch Division des Herzgewichts des RV durch das Herzgewicht des LV + S. **A)** Auswertung des Fulton-Index der WT Mäuse (Nox: n = 15; Hox: n = 15) verglichen mit den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 15; Hox: n = 15). **B)** Auswertung des Fulton-Index der WT-Mäuse (Nox: n = 15; Hox: n = 15) verglichen mit den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 13; Hox: n = 15). Signifikant, wenn \*\*\*\* (p ≤ 0,0001). RV: rechter Ventrikel; LV: linker Ventrikel; S: Septum; %: Prozent; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

Neben der Herzmasse wurde zur weiteren Untersuchung der RHH auch die RVWT mit Hilfe von echokardiographischen Untersuchungen bestimmt. Unter Hypoxie zeigte sich bei WT Mäusen ein Anstieg der RVWT (**Abbildung 28**). Auch TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäuse reagierten unter Hypoxie mit einer Hypertrophie des rechten Ventrikels, wobei die Zunahme der RVWT unter Hypoxie im Gegensatz zu den WT Mäusen geringer ausfiel.

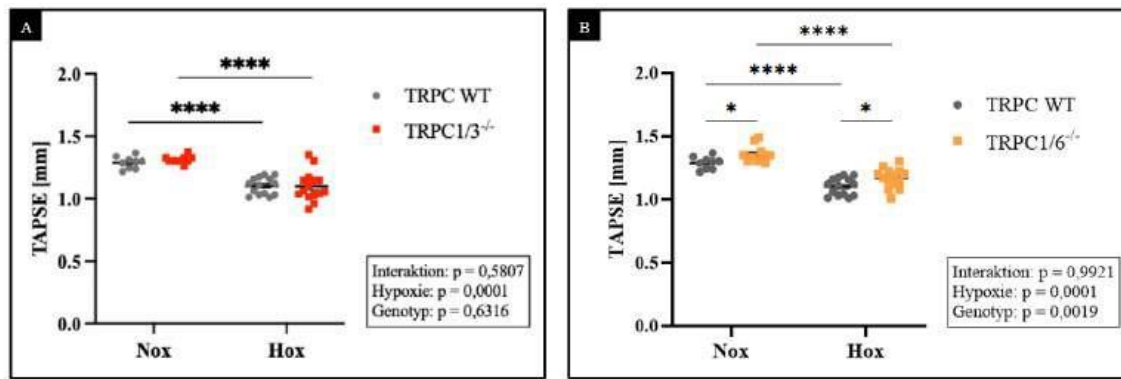
Unter Normoxie konnte kein Unterschied zu den WT Mäusen festgestellt werden (**Abbildung 28 A**). Bei den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen wurde ebenfalls eine erhöhte RVWT nach chronischer Hypoxie beobachtet, wobei die Zunahme unter Hypoxie verglichen mit der Kontrollgruppe ebenfalls geringer ausfiel. Unter Normoxie zeigten TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse zu den WT Mäusen vergleichbare Werte (**Abbildung 28 B**).



**Abbildung 28: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den RVWT in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Darstellung der RVWT in mm nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration). **A**) Auswertung der RVWT der WT Mäuse (Nox: n = 9; Hox: n = 14) verglichen mit den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 12; Hox: n = 16). **B**) Auswertung der RVWT der WT-Mäuse (Nox: n = 9; Hox: n = 14) verglichen mit den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 11; Hox: n = 14). Signifikant, wenn \* ( $p \leq 0,05$ ); \*\* ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ). RVWT: *right ventricle wall thickness*; mm: Millimeter; %: Prozent; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

Die RHH in CHPH kann zu einer Rechtsherzinsuffizienz führen, weshalb zudem die TAPSE als echokardiographisches Maß für die rechtsventrikuläre Funktion bestimmt wurde. Bei WT Mäusen wurde nach chronischer Hypoxie eine Abnahme der TAPSE beobachtet (**Abbildung 29**). Auch TRPC1/3<sup>-/-</sup> (**Abbildung 29 A**) und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse (**Abbildung 29 B**) zeigten eine reduzierte TAPSE unter Hypoxie. Während TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäuse dabei mit den WT Mäusen vergleichbare Werte zeigten (**Abbildung 29 A**), wurde bei TRPC 1/6<sup>-/-</sup> Mäusen unter beiden oxygenen Bedingungen eine zur Kontrollgruppe höhere TAPSE festgestellt (**Abbildung 29 B**).



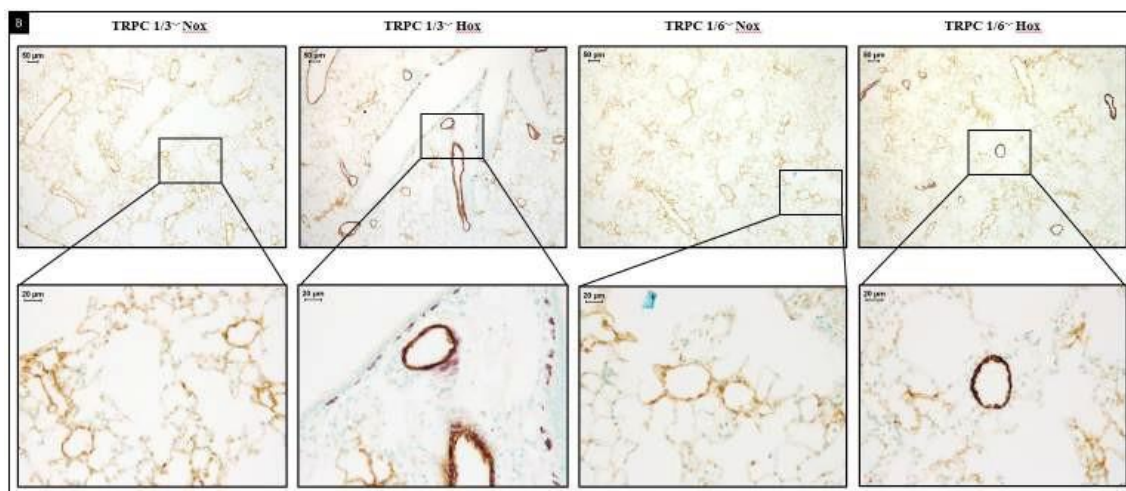
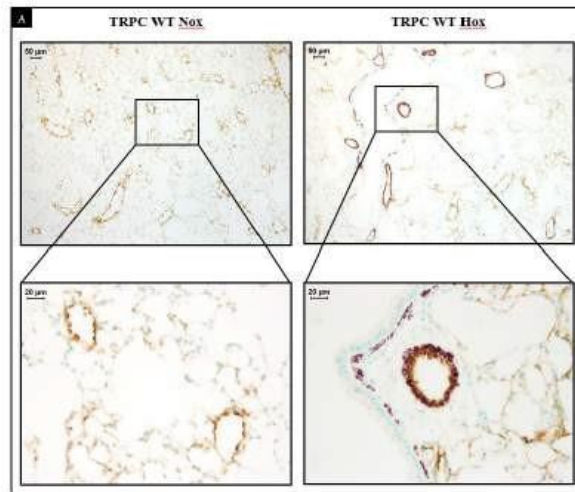
**Abbildung 29: Einfluss von chronischer Hypoxie auf die TAPSE in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Darstellung der TAPSE in mm nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration). **A**) Auswertung der TAPSE der WT Mäuse (Nox: n = 9; Hox: n = 14) verglichen mit den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 11; Hox: n = 15). **B**) Auswertung der TAPSE der WT-Mäuse (Nox: n = 9; Hox: n = 14) verglichen mit den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 11; Hox: n = 14). Signifikant, wenn \* (p ≤ 0,05); \*\*\*\* (p ≤ 0,0001). TAPSE: *tricuspid annular plane systolic excursion*; mm: Millimeter; %: Prozent; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

### 3.4.3 Einfluss von Hypoxie auf das vaskuläre *Remodeling* in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen

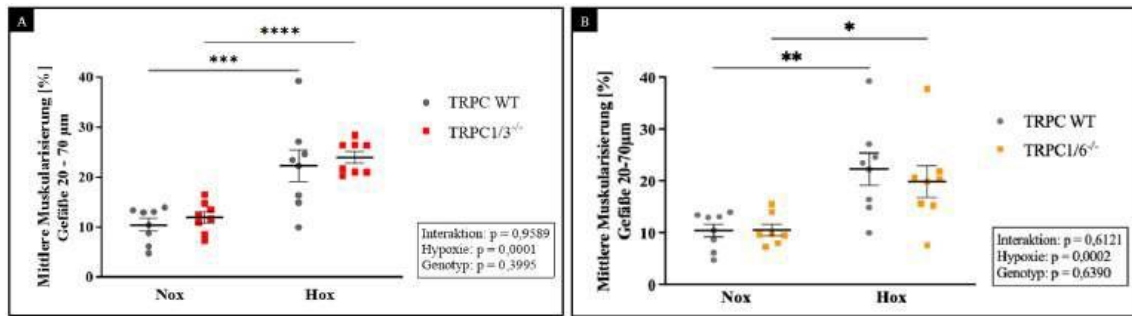
Durch die vorherigen Ergebnisse wurde gezeigt, dass sowohl WT Mäuse als auch TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse unter chronischer Hypoxie eine CHPH entwickeln. Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurden die Lungen von WT, TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen histologisch hinsichtlich des Vorliegens eines vaskulären *Remodelings* untersucht. Hierbei kommt es zu einem Umbau der kleinen Pulmonalgefäße, was sich in einer Zunahme des mittleren Muskularisierungsgrades widerspiegelt.

In WT Mäusen wurde nach chronischer Hypoxie eine Zunahme des mittleren Muskularisierungsgrades der Pulmonalgefäße beobachtet (**Abbildung 30 A**, **Abbildung 31**). Die histologische Untersuchung der Lungen von TRPC1/3<sup>-/-</sup> wie auch der Lungen von TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten zu den WT Mäusen vergleichbare Ergebnisse (**Abbildung 30 B**, **Abbildung 31 A**). Auch hier wurde eine vermehrte Muskularisierung der Pulmonalgefäße unter Hypoxie festgestellt.



**Abbildung 30: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von WT, TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen.**

Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von kleinen Pulmonalgefäßen (Durchmesser 20 – 70  $\mu\text{m}$ ) mit  $\alpha$ -smooth muscle actin (violett) und den von-Willebrand-Faktor (braun) nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 %  $\text{O}_2$  Konzentration, normobar) bzw. normoxischen Bedingungen (21 %  $\text{O}_2$  Konzentration, normobar). **A)** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung als Übersichtsbild (obere Leiste, 200-fache Vergrößerung, Maßstab 50  $\mu\text{m}$ ) und der Nahansicht (untere Leiste, 400-fache Vergrößerung, , Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ) von WT Mäusen. **B)** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung der Übersicht (obere Leiste, 200-fache Vergrößerung, Maßstab 50  $\mu\text{m}$ ) und Nahansicht (untere Leiste, 400-fache Vergrößerung, , Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ) von TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen.  $\mu\text{m}$ : Mikrometer; %: Prozent;  $\text{O}_2$ : Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

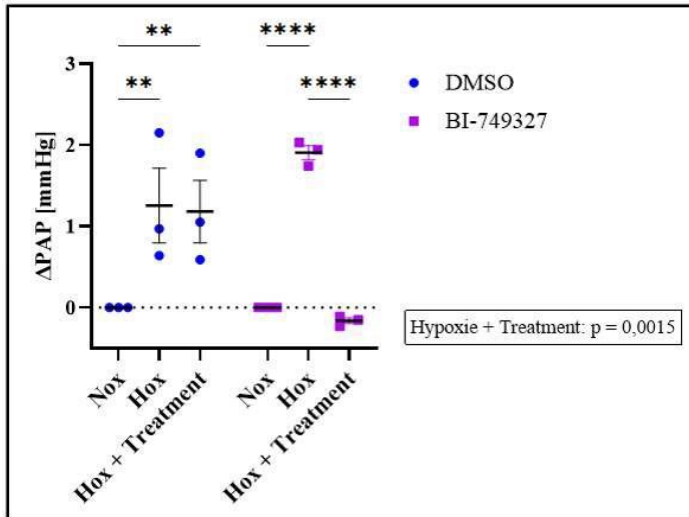


**Abbildung 31: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den mittleren Muskularisierungsgrad der kleinen Pulmonalgefäße in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Darstellung des mittleren Muskularisierungsgrades der kleinen Pulmonalgefäßen (Durchmesser 20 – 70 µm) in % nach 28 Tagen unter hypoxischen (10 % O<sub>2</sub> Konzentration) bzw. normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub> Konzentration). **A)** Auswertung des mittleren Muskularisierungsgrades der WT Mäuse (Nox: n = 8, Hox: n = 8) verglichen mit den TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 8, Hox: n = 8). **B)** Auswertung des mittleren Muskularisierungsgrades der WT Mäuse (Nox: n = 8, Hox: n = 8) verglichen mit den TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen (Nox: n = 8, Hox: n = 8). Signifikant, wenn \*\* (p ≤ 0,01); \*\*\* (p ≤ 0,001); \*\*\*\* (p ≤ 0,0001). %: Prozent; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

### 3.5 Einfluss des TRPC6-Inhibitors BI-749327 in WT Mäusen

Die zuvor gezeigten Resultate zeigen, dass TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse nicht auf akute Hypoxie im Sinne einer HPV reagieren. Dennoch entwickeln sie unter chronischer Hypoxie eine CHPH. Daher sollte im nächsten Schritt ein spezifischer TRPC6-Inhibitor untersucht werden. Dazu wurde der TRPC6-Inhibitor BI-749327 eingesetzt. Lungen von WT Mäusen reagierten unter Hypoxie mit einem Anstieg des mPAP. Auch nach Zugabe von DMSO, was als Lösungsmittel für den Inhibitor verwendet wurde, stieg der mPAP in der Kontrollgruppe unter Hypoxie vergleichbar wie vor der Gabe an. Nach der Gabe von BI-749327 konnte kein Anstieg des mPAP mehr beobachtet werden. Die Werte waren vergleichbar mit denen unter Normoxie (**Abbildung 32**).




**Abbildung 32: Pulmonale Vasokonstriktion in WT Lungen nach Zugabe von DMSO als Kontrollsubstanz bzw. des TRPC6-Inhibitors BI-749327.**


Darstellung des  $\Delta$ PAP in mmHg während der Untersuchung der pulmonalen Vasokonstriktion nach Zugabe von DMSO als Kontrollsubstanz und dem TRPC6-Inhibitor BI-743927. Nach Messung des  $\Delta$ PAP unter Hypoxie ohne Substanzen erfolgte die Applikation von DMSO bzw. BI-743927. A) Auswertung des  $\Delta$ PAP in Lungen von WT Mäusen ( $n = 3$ ) nach Gabe von DMSO. B) Auswertung des  $\Delta$ PAP in Lungen von WT Mäusen ( $n = 3$ ) nach Gabe des TRPC6-Inhibitors BI-743927. Signifikant, wenn \*\* ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ).  $\Delta$ : relative Änderung; PAP: mittlerer pulmonaler arterieller Druck; DMSO: Dimethylsulfoxid; Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie; WT: Wildtyp; TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*

## 4 Diskussion

Eine Zusammenfassung der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse sind in einem Diagramm dargestellt (**Abbildung 33**). Die einzelnen Ergebnisse werden im Bezug zu vorangegangenen Studien im Folgenden diskutiert.

TRPC1/3				TRPC1/6		
	Nox	Hox			Nox	Hox
$\Delta$ PAP	—	—		$\Delta$ PAP	—	↓
Muskularisierung	—	—		Muskularisierung	—	—

	Nox	Hox			Nox	Hox
RV - Gewicht	—	—			RV - Gewicht	—
RVSP	↑	—		RVSP	—	—
RVWT	—	↓		RVWT	—	↓
TAPSE	—	—		TAPSE	↑	↑
LV + S - Gewicht	—	—		LV + S - Gewicht	—	—
LVSP	↑	—		LVSP	—	—
SAP	↑	↑		SAP	↑	—
Fulton-Index	—	—		Fulton-Index	—	↓

**Abbildung 33: Überblick der Ergebnisse.**

Dargestellt sind die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Unterschiede von TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen. Dabei zeigt “—“ nicht signifikante Ergebnisse, “↑“ signifikant höhere und “↓“ signifikant niedrigere Werte. TRPC: klassischer *transient receptor potential channel*, Nox: Normoxie; Hox: Hypoxie;  $\Delta$ : relative Änderung; PAP: mittlerer pulmonaler arterieller Druck; RV: rechter Ventrikel; RVSP: *right ventricle pressure*; RVWT: *right ventricle wall thickness*; TAPSE: *tricuspid annular plane systolic excursion*; LV: linker Ventrikel; S: Septum; SAP: *systolic arterial pressure*

### 4.1 Kritische Betrachtung des verwendeten Tiermodells

Zur detaillierten Entschlüsselung der Pathogenese der CHPH sind Tiermodelle notwendig. Da die Entstehung von CHPH durch multifaktorielle Komponenten bedingt ist und daher nicht nur die Hämodynamik sondern mehrere Organsysteme beeinflusst, ist eine Betrachtung an Zellkulturversuchen nicht ausreichend (Galiè et al. 2016; Herold 2020; Stiefelhagen 2021). Daher ist die Untersuchung am Tier unerlässlich. Aktuell existieren allerdings keine Tiermodelle, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Charakteristika die komplexen Veränderungen aller humanen PH-Unterformen in vollem

Umfang widerspiegelt. Speziell für die Gruppe 3 PH lässt sich das chronische Hypoxiemodell jedoch aufgrund der vergleichbaren kardiovaskulären Veränderungen sehr gut übertragen (Stenmark et al. 2009). Für das Tiermodell in dieser Arbeit wurde die Maus gewählt. Hauptgrund hierfür ist die Existenz von Mäusen mit einer globalen Deletion von sowohl TRPC1 und 3 als auch von TRPC1 und 6 (Stenmark et al. 2009; Pak et al. 2010). Da es sich hierbei jedoch um einen globalen Knockout handelt, hat der Verlust dieser Gene in allen Körperzellen durch mögliche kompensatorische Gegenregulationen womöglich Auswirkungen auf andere Gen- und Proteinexpressionen (Malczyk et al. 2013; Malczyk 2017; Mayser 2021; Weissmann et al. 2006). So zeigen Genexpressionsanalysen in TRPC3<sup>-/-</sup> Mauslungen bereits unter Normoxie eine signifikant niedrigere Expression von TRPC1 (Mayser 2021). In TRPC1<sup>-/-</sup> Mauslungen zeigte sich im Gegensatz keine veränderte Expression von TRPC3, jedoch konnte eine kompensatorische Hochregulation von TRPC7 nachgewiesen werden (Malczyk et al. 2013). Zudem zeigen TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte Genexpression von TRPC5 sowie eine erhöhte Expression von TRPC 7 (Malkmus 2022). Daher können auch Auswirkungen der Doppelknockouts auf die Gen- und Proteinexpression nicht ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung der HPV wurde das Modell der ILU gewählt, wodurch der Einfluss von Veränderungen im pO<sub>2</sub> in der Inspirationsluft auf die pulmonale Vasokonstriktion direkt detektiert werden konnte. Zur Untersuchung der Pathomechanismen der CHPH wurde das Modell der chronischen Hypoxie-Exposition gewählt, welches sehr gut reproduzierbare Ergebnisse zeigt. Eine Exposition von über vier Wochen führt dabei sicher zur Entstehung einer PH sowie einer RHH (Stenmark et al. 2009; Gomez-Arroyo et al. 2012; Ikeda et al. 2019). So können die pathophysiologischen Veränderungen im kardiovaskulären Systems von PH erkrankten Patienten und Patientinnen auch in diesem Tiermodell beobachtet werden (Pak et al. 2010; Stenmark et al. 2009; Yuan 2011). Jedoch wird in den Mäusen nach chronischer Hypoxie-Exposition lediglich eine mild ausgeprägte PH ausgelöst (Bikou et al. 2020; Gomez-Arroyo et al. 2012; Stenmark et al. 2009), welche nach Reoxygenierung reversibel ist.

Die Ausprägung der PH kann durch die zusätzliche Gabe des VEGF-Antagonisten Sugen5416 verstärkt werden. Dabei kommt es zur Ausbildung von charakteristischen plexiformen Läsionen in den Pulmonalgefäßen, die im Menschen nicht vorzufinden sind. Zudem variiert die Reaktion auf die Gabe von Sugen5416, sodass eine

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht gewährleistet ist (Stenmark et al. 2009; Taraseviciene-Stewart et al. 2001; Pak et al. 2010; Colvin und Yeager 2014; Bikou et al. 2020; Abe et al. 2010; Vitali et al. 2014; Ciuclan et al. 2011). Außerdem ist die genaue Rolle von VEGF in der CHPH-Pathogenese noch nicht abschließend geklärt (Schermuly et al. 2011). Daher wurde in dieser Arbeit auf eine Modifikation des Modells der chronischen Hypoxie-Exposition mittels Sugen5416 verzichtet. Auch andere Modelle wie die Applikation des Pyrrolizidinalkaloid Monocrotalin stellten keine Option im Rahmen dieser Arbeit dar. Das Monocrotalin löst zwar eine ausgeprägte PH aus, im Mausmodell führt es jedoch aufgrund fehlender hepatischer Umwandlung in den toxischen Metaboliten nicht immer zu reproduzierbaren Ergebnissen (Colvin und Yeager 2014; Stenmark et al. 2009; Gomez-Arroyo et al. 2012; Raoul et al. 2007; Dumitrascu et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypoxie-Exposition, wie vorwiegend in der Literatur beschrieben, unter normobaren Bedingungen vorgenommen. Dadurch kann eine bessere Vergleichbarkeit zu Daten aus anderen Studien gewährleistet werden. Hierbei wird durch eine Reduktion der O<sub>2</sub>-Konzentration der verminderte O<sub>2</sub>-Partialdruck erreicht (Pak et al. 2010; Kapitsinou et al. 2016; Tian et al. 2021b).

## **4.2 Auswahl von TRPC1/3 und TRPC1/6 als Kandidat in der CHPH-Entstehung**

CHPH ist eine schwerwiegende Erkrankung, welche auf molekularer Ebene auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen ist (Tuder 2017; Ward und McMurtry 2009; Sommer et al. 2008). Eine wichtige Rolle in der Pathologie der CHPH spielen die Kontraktion von PSMCs in pulmonalvaskulären Gefäßen sowie die Proliferation dieser PSMCs, was zur Verringerung des Gefäßvolumens und zum Anstieg des PVR führt. Gesteuert werden diese Mechanismen über die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase (Ward und McMurtry 2009; Wang et al. 2008; Stenmark et al. 2006; Sommer et al. 2008). Die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wird von unterschiedlichen Kanälen, wie TRPC Kanälen, reguliert (Wang et al. 2008; Ward und McMurtry 2009; Worley et al. 2007). In diesem Zusammenhang konnte in vielen Studien bereits gezeigt werden, dass unter anderem TRPC1, 3 und 6 Proteine einen möglichen Einfluss auf die CHPH-Entstehung haben (Malczyk 2017; Malkmus 2022; Mayser 2021; Weissmann et al. 2006). Es wurde bereits beschrieben, dass TRPC Proteine, wie TRPC1, 3 und 6, in den PSMCs in Mäusen, Ratten sowie auch im Menschen exprimiert werden

(Firth et al. 2007; Lin et al. 2004; Malczyk et al. 2013). In murinen Lungen wurde eine hohe Expression von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 nachgewiesen, wobei TRPC1 im Vergleich besonders stark exprimiert wird (Malczyk et al. 2013). Unter hypoxischen Bedingungen wurde sogar eine verstärkte Expression von TRPC1 auf mRNA Ebene nachgewiesen (Malczyk 2017). Außerdem wurde eine Hypoxie-abhängige TRPC6-Expression beobachtet (Lin et al. 2004; Yu et al. 2009; Xia et al. 2014; Wang et al. 2006). Zudem wurde in humanen Studien bei Patienten und Patientinnen, welche an PH erkrankt waren, eine Hochregulation von TRPC3 und TRPC6 nachgewiesen (Yu et al. 2004). In vorangegangenen Studien wurde außerdem gezeigt, dass es durch die Deletion von TRPC Proteinen zu gegenregulierenden Kompensationsmechanismen kommt. So konnte in TRPC1<sup>-/-</sup> Mäusen nach chronischer Hypoxie-Exposition eine Hochregulation von TRPC6 festgestellt werden (Xia et al. 2014). Des Weiteren wurde in TRPC3<sup>-/-</sup> Mäusen unter Hypoxie eine Hochregulation von TRPC1 und TRPC6 nachgewiesen (Mayser 2021).

Außerdem wurde in Versuchen mit akuter Hypoxie kein Einfluss von TRPC1<sup>-/-</sup> und TRPC3<sup>-/-</sup> auf die Phasen der HPV nachgewiesen (Malczyk et al. 2013; Mayser 2021). Für TRPC6<sup>-/-</sup> Mauslungen hingegen wurde gezeigt, dass es zu keiner akuten Phase bei unveränderter prolongierter Phase unter akuter Hypoxie kommt (Weissmann et al. 2006). TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mauslungen zeigten sogar keine Reaktion mehr auf akute und langanhaltende Hypoxie-Exposition (Malkmus 2022; Malkmus et al. 2022).

Darüber hinaus zeigten sowohl TRPC1<sup>-/-</sup> als auch TRPC3<sup>-/-</sup> Mäuse nach chronischer Hypoxie-Exposition einen verminderten RVSP sowie eine geringere Muskularisierung in den kleinen Lungengefäßen (Malczyk 2017; Mayser 2021). Zudem stellten *Malkmus et al.* fest, dass TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse ebenfalls partiell vor PH geschützt waren, wobei keine Veränderungen der rechtsventrikulären Funktion sowie des vaskulären *Remodelings* festgestellt werden konnten (Malkmus 2022; Malkmus et al. 2022). Der partielle Schutz in TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen ist nicht auf eine Veränderung im Muskularisierungsgrad der Pulmonalgefäße, sondern wohl viel mehr auf die fast fehlende akute und prolongierte HPV zurückzuführen (Malkmus et al. 2022). Diese Resultate lassen vermuten, dass insbesondere das Zusammenspiel von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 eine maßgebliche Rolle in der CHPH-Entstehung spielen. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Interaktion für die Pathogenese der CHPH in Hinblick auf HPV, vaskuläres *Remodeling* und RHH entscheidend ist. Hierfür wurden TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse untersucht.

### 4.3 Rolle von TRPC1/3 und TRPC1/6 in der HPV

Akute alveoläre Hypoxie führt in den Pulmonalgefäßen zur HPV, welche biphasisch in einer akuten und prolongierten Phase verläuft (Lumb und Slinger 2015; Leach et al. 1994; McLoughlin 2018; Talbot et al. 2005; Ward und McMurtry 2009). Bisher wurde nur für TRPC6 ein Einfluss auf die akute Phase nachgewiesen (Weissmann et al. 2006). Eine Rolle von TRPC6 auf die prolongierte Phase konnte durch *Weissmann et al.* nicht gezeigt werden (Weissmann et al. 2006). Im Kontrast zu TRPC6 spielen TRPC1 und TRPC3 sowohl in der akuten als auch prolongierten Phase der HPV keine Rolle (Malczyk 2017; Mayser 2021). Interessanterweise konnten *Malkmus et al.* in TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen, dass das simultane globale Fehlen von TRPC1, 3 und 6 zu einem vollständigen Verlust beider Phasen der HPV führt (Malkmus 2022). Während der Verlust der akuten Phase auf TRPC6 zurückzuführen sein könnte, ist der Mechanismus der prolongierten Phase noch nicht vollständig geklärt (Malkmus 2022; Mayser 2021; Malczyk 2017; Fuchs et al. 2011).

Um die Frage, warum eine Deletion von TRPC1, TRPC3 oder TRPC6 keinen Einfluss auf die prolongierte HPV hat, das Fehlen aller drei Proteine jedoch zu einem Verlust der akuten und prolongierten HPV führt, wurden hier TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> im Modell der ILU untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass es in TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mauslungen ebenfalls zu einem vollständigen Verlust der akuten sowie der prolongierten HPV kommt, während der Verlust von TRPC1/3 nur einen Effekt auf die akute Phase der HPV hat. Interessanterweise gab es jedoch keine Unterschiede zwischen TRPC1/6<sup>-/-</sup> und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mauslungen. Beide Genotypen zeigten einen Verlust beider HPV-Phasen (Malkmus 2022; Malkmus et al. 2022). Zum einen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass TRPC6 die akute Reaktion auf Hypoxie vermittelt. Des Weiteren bildet TRPC1 mit TRPC6 wahrscheinlich einen funktionellen Kanal, der die prolongierte Phase vermittelt, da der Verlust von TRPC1 oder TRPC6 allein keinen Einfluss auf diese hat. Darüber hinaus scheint TRPC3 allein keinen Einfluss auf die HPV auszuüben, in Kombination mit TRPC1 scheint es jedoch ebenfalls zur Vermittlung der akuten Phase der HPV beizutragen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Aktivierung der akuten und prolongierten Phase der HPV über unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird. Außerdem wird verdeutlicht, wie komplex das Zusammenspiel der verschiedenen TRP-Proteine ist und wie bedeutsam deren Zusammensetzung in heteromeren Kanälen für die Funktionalität der Kontraktilität der PSMCs im Rahmen der HPV ist.

Es ist beschrieben worden, dass der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei akuter Hypoxie direkt durch  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, darunter auch Ionen-Kanäle wie TRPC6, vermittelt wird, was zur Kontraktion der PASMCs führt (Dunham-Snary et al. 2017; Post et al. 1992; Harder et al. 1985; Olschewski et al. 2002; Weissmann et al. 2006). Bei langanhaltender Hypoxie hingegen wird ET-1 aus EC ausgeschüttet, was über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung zur Vasokonstriktion führt (Yoshiyoshi et al. 1991; Shimoda et al. 2002; Sato et al. 2000; Ozen et al. 2020; McCulloch et al. 1996; Davenport et al. 2016; Liu et al. 2001; Turner und Kozlowski 1997). Um zu testen, ob TRPC1/6 Einfluss auf die ET-1 Ausschüttung nimmt, wurde in dieser Arbeit ET-1 appliziert. Dabei zeigte sich zwischen TRPC1/6<sup>-/-</sup> und WT Lungen kein Unterschied auf die Reaktion unter akuter Hypoxie nach ET-1 Applikation. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass während der prolongierten HPV möglicherweise ET-1 durch TRPC1/6 aktiviert wird, wodurch es in TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen zu einem Fehlen der prolongierten Phase kommt, da ET-1 auch in TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen eine zu den WT Lungen vergleichbare Vasokonstriktion auslöst. Dadurch wird gezeigt, dass TRPC1/6 eine Hypoxie-spezifische und entscheidende Komponente der prolongierten Phase der HPV darstellt. Um die Funktion von TRPC6 und TRPC1/6 weiter zu untersuchen, wurden Inhibitoren von TRPC6 oder TRPC1/6 getestet, um mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu finden. Dabei zeigte sich nur nach Applikation des TRPC6-Inhibitors BI-749327 eine inhibitorische Wirkung auf die akute HPV in behandelten WT Lungen. Damit wurde hier nachgewiesen, dass der Inhibitor BI-749327 spezifisch TRPC6 inhibiert. *Jain et al.* haben ebenfalls den TRPC6-Inhibitor BI-749327 untersucht und konnten mittels ILU sowie im Hypoxie-Modell die Spezifität des Inhibitors nachweisen. Trotz kleinerer Unterschiede in den Methoden, wie die Dauer der Hypoxie-Exposition oder der intraperitonealen Applikation im Hypoxie-Modell, beweisen die Untersuchungen die Effektivität sowie Spezifität des TRPC6-Inhibitors BI-749327 (Jain et al. 2021). Der TRPC1/6-Inhibitor GSMTx4 zeigte hingegen keinen Effekt auf akute Hypoxie (Daten werden nicht gezeigt). Ebenfalls konnte kein Effekt des TRPC1/6-Inhibitors SAR7334 auf akute Hypoxie gezeigt werden (Daten werden nicht gezeigt). Möglicherweise ist dies auf eine unzureichende Dosierung der Inhibitoren zurückzuführen. Eine weitere Testung unterschiedlicher Dosierungen war aufgrund zeitlicher Aspekte nicht mehr möglich, weshalb die Daten im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Weitere Versuche, um geeignete Inhibitoren gegen TRPC1/6 zu testen, müssen in Zukunft durchgeführt werden, um diese letztendlich kurativ im CHPH Modell zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass TRPC1/3 nur einen Einfluss auf die akute Phase der HPV hat. Für TRPC6 und TRPC1/6 hingegen konnte eine Schlüsselrolle in der Regulation der HPV nachgewiesen werden. Während TRPC6 eine entscheidende Rolle in der akuten Phase der HPV spielt (Weissmann et al. 2006), scheint TRPC1/6 zu einem zusätzlichen Verlust der prolongierten Phase zu führen. Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt. Möglicherweise aktiviert TRPC1/6 ET-1, wodurch es zur Kontraktion kommt.

#### **4.4 Rolle von TRPC1/3 und TRPC1/6 in der chronischen Hypoxie**

Chronische alveoläre Hypoxie, die z. B. bei langem Aufenthalt in großer Höhe auftritt, kann beim Menschen zur Entstehung einer CHPH führen (Herold 2020; Simonneau et al. 2009). Im Mausmodell kann die CHPH durch die Exposition von Hypoxie über 28 Tage mit einer Sauerstoffkonzentration von 10% imitiert werden (Stenmark et al. 2009; Ciucan et al. 2011; Colvin und Yeager 2014). Typische Veränderungen im Rahmen der CHPH im Menschen und Tiermodell sind ein erhöhter Hämatokrit sowie einer Veränderung des rechten Herzens mit einem Anstieg des RVSP und einer vermehrten RHH (Stenmark et al. 2009; Galiè et al. 2016). Außerdem zeigt sich typischerweise eine verstärkte Muskularisierung der kleinen Pulmonalgefäße, vor allem verursacht durch die Neomuskularisierung und Proliferation der PSMCs im Rahmen des vaskulären *Remodelings* (Stenmark et al. 2009; Xia et al. 2014).

##### **4.4.1. Der Einfluss von TRPC1/3 und TRPC1/6 auf die Entstehung von CHPH**

Chronische Hypoxie-Exposition führt zu einer Ausschüttung des Glykoprotein-Hormons Erythropoetin in den Nieren, wodurch die Bildung der Erythrozyten im Knochenmarkt gefördert wird, was zu einem erhöhten Hämatokrit führt. Die Bestimmung des Hämatokrit-Wertes im Rahmen von tierexperimentellen Versuchen stellt eine Kontrolle der Hypoxie-Exposition dar (Hooper und Mellor 2011; Wheatley et al. 2011). Sowohl bei WT als auch bei TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen konnte ein erhöhter Hämatokrit gemessen werden. Interessanterweise zeigten TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine stärkere Hämatopoese unter Hypoxie im Vergleich zu den WT Mäusen. Eine ähnliche Beobachtung wurde nur in TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen gemacht (Malkmus 2022), jedoch nicht in TRPC1<sup>-/-</sup> (unveröffentlicht), TRPC3<sup>-/-</sup> (Mayser 2021) und TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen unter Hypoxie (unveröffentlicht). Eine mögliche Erklärung für die verstärkte Hämatopoese

unter Hypoxie bei TRPC1/6<sup>-/-</sup> und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen könnte sein, dass der globale KO von TRPC1/6 die Blutbildung im Knochenmark oder den Abbau der Erythrozyten in der Milz und damit den Hämatokrit beeinflusst. Es wurde bereits gezeigt, dass TRPC Proteine wie TRPC1 und TRPC6 in der Milz, dem Knochenmark bzw. in den Stammzellen im Knochenmark sowie anderen Geweben exprimiert werden (Formoso et al. 2020; Tano et al. 2014; Ichikawa und Inoue 2014)). Dabei spielen insbesondere TRPC1 und TRPC6 eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus der Stammzellen im Knochenmark (Ichikawa und Inoue 2014), wodurch der Verlust von TRPC1 und TRPC6 zu einem erhöhten Zellzyklus und damit einer gesteigerten Hämatopoese führen könnte. Durch Hypoxie Exposition könnte dieser Effekt nochmals verstärkt werden, weshalb ein erhöhter Hämatokrit bei TRPC1/6<sup>-/-</sup> nur in der Hypoxie-Gruppe feststellbar ist.

Charakteristisch für CHPH ist der Anstieg des RVSP. In der vorliegenden Arbeit wurde unter Hypoxie jedoch kein Einfluss von TRPC1/3 oder TRPC1/6 auf den RVSP festgestellt, obwohl TRPC1<sup>-/-</sup> (Malczyk 2017; Malczyk et al. 2013), TRPC3<sup>-/-</sup> (Mayser 2021) und TRPC6<sup>-/-</sup> (Weissmann et al. 2006; Xia et al. 2014) unter chronischer Hypoxie einen verminderten Anstieg im RVSP zeigten. Die Rolle von TRPC6 ist allerdings kontrovers in der Literatur diskutiert, was vermutlich auf die Länge der Hypoxiedauer zurückzuführen ist. Da TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse nach 28 tägiger Hypoxie-Exposition partiell vor CHPH geschützt waren (Weissmann et al. 2006), nach 21 tägiger Hypoxie jedoch nicht (Xia et al. 2014), könnte TRPC6 unter chronischer Hypoxie-Exposition im Verlauf der Erkrankung eine Rolle spielen. Außerdem konnten *Xia et al.* bereits einen reduzierten RVSP unter Normoxie in TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen beobachten (Xia et al. 2014). Allerdings ergeben sich zwischen der Studie von *Xia et al.* und *Weissmann et al.* Unterschiede. Bei *Xia et al.* wurden u. a. nur Männchen verwendet. Zudem kamen die Mäuse bereits in jüngerem Alter zum Einsatz und die Anzahl der Tiere pro Messung variierte zwischen 9 und 33, was die statistische Aussagekraft der Ergebnisse beeinflussen kann. Außerdem bleibt unklar, ob die verschiedenen Gruppen, die *Xia et al.* verwendet haben, alle zeitgleich Hypoxie ausgesetzt wurden (Xia et al. 2014). Daneben wurde auch für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt, dass sie partiell vor CHPH geschützt waren, da sie mit einem verringerten Anstieg des RVSP auf chronische Hypoxie reagierten (Malkmus 2022).

Ursache für einen RVSP Anstieg unter Hypoxie ist der erhöhte PVR, induziert durch ein reduziertes Gefäßlumen (Waxman 2012; Larsen 2016; Hartner 2019). Dabei haben zwei

Mechanismen Einfluss auf das Lumen der Gefäße, das vaskuläre *Remodeling* (Tuder et al. 2013b; Klinke 2005; Waxman 2012) und die Kontraktion der Gefäße (Licker et al. 2021; Lumb und Slinger 2015; Strielkov et al. 2018). Während TRPC1<sup>-/-</sup> (Malczyk 2017) und TRPC3<sup>-/-</sup> Mäuse (Mayser 2021) durch eine verminderte Muskularisierung charakterisiert sind, welcher zum verminderten RVSP Anstieg unter Hox führen könnte, wurden keine Effekte von TRPC6 (Weissmann et al. 2006) und TRPC1/3/6 (Malkmus 2022) auf den mittleren Muskularisierungsgrad der pulmonalen Gefäße im Vergleich zu WT Mäusen beobachtet. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach Hypoxie-Exposition wie WT Mäuse auch eine vermehrte mittlere Muskularisierung der pulmonalen Gefäße unter chronischer Hypoxie. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den RVSP Daten entsprechender Mäuse. Weder TRPC1/3<sup>-/-</sup> noch TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse waren vor CHPH geschützt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht, weshalb TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Kontrast zu TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup>, TRPC6<sup>-/-</sup> und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nicht vor CHPH geschützt waren. Da der Anstieg des RVSP nicht ausschließlich durch das vaskuläre *Remodeling*, sondern auch durch Kontraktion von Gefäßen beeinflusst wird, wurden TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch zusätzlich auf ihre Kontraktilität untersucht. *Malkmus et al.* konnte einen partiellen Schutz von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen vor CHPH nachweisen. Dies wurde auf die verminderte Kontraktilität der pulmonalen Gefäße zurückgeführt, welcher womöglich auf einen veränderten Kollagenhaushalt zurückzuführen ist (Malkmus 2022). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Kontraktilität der pulmonalen Gefäße von TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> untersucht. Dabei konnten keine Effekte von TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup>, TRPC6<sup>-/-</sup>, TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen auf KCl und damit auf die Kontraktilität der pulmonalen Gefäße beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Einfluss der Doppelknockouts auf den RVSP sowie das vaskuläre *Remodeling* könnte sein, dass das gleichzeitige Ausschalten von zwei Proteinen zu Kompensationsmechanismen führt, wodurch andere Signalwege vermehrt reguliert werden und ein beeinflussender Effekt verhindert wird, was im Folgenden nun genauer betrachtet wird. Es wurde bereits gezeigt, dass TRPC1, TRPC3 und TRPC6 in murinen Lungen exprimiert werden (Malczyk et al. 2013; Wang et al. 2020; Formoso et al. 2020). Kompensationsmechanismen bei Deletion bestimmter TRPC Gene sind bisher jedoch noch weitestgehend unbekannt. Bekannt ist allerdings, dass die Deletion

unterschiedlicher TRPC Gene über *Up-* und *Downstreaming* zur Gegenregulation anderer TRPC Kanäle führt. In Genexpressionsanalysen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass hypoxische Bedingungen zu einer veränderten Expression der TRPC Proteine in PASMCs führt (Malczyk 2017; Malczyk et al. 2013; Malkmus 2022; Mayser 2021). In Ratten führt Hypoxie z. B. zu einer zwei- bis dreifach gesteigerten Expression von TRPC1 und TRPC6, wobei sich kein Einfluss auf die Expression von TRPC3 zeigt (Wang et al. 2006; Lin et al. 2004; Malczyk et al. 2013). In Patienten und Patientinnen mit PH konnte ebenfalls eine erhöhte TRPC6 Genexpression beobachtet werden (Yu et al. 2004). Außerdem konnte in KO Mauslinien beispielsweise gezeigt werden, dass TRPC6<sup>-/-</sup> PASMCs unter Hypoxie eine vermehrte Expression von TRPC3 und TRPC7 zeigten (Firth et al. 2007; Freichel et al. 2004; Dietrich et al. 2005b). Da TRPC6<sup>-/-</sup> Mauslungen unter akuter Hypoxie jedoch ohne eine akute Phase im Rahmen der HPV reagierten, scheint die vermehrte Expression von TRPC3 TRPC6 funktionell nicht oder nur unvollständig zu ersetzen (Firth et al. 2007). *Mayser et al.* zeigen außerdem, dass die Deletion von TRPC3 im Rahmen der akuten Hypoxie zu einer Hochregulation von TRPC1 führt. Eine Herabregulation von TRPC5 unter akuter Hypoxie, wie sie in WT Mäusen zu beobachten ist, konnte dahingegen nicht nachgewiesen werden (Mayser 2021).

Die Mechanismen der Gegenregulation könnten dementsprechend auch verursachen, dass die entsprechenden KO Mäuse vor CHPH nicht oder nicht vollständig geschützt sind. Eine Genexpressionsanalyse von TRPC1/3 und TRPC1/6 wurde in dieser Arbeit aufgrund des Umfangs nicht vorgenommen. Ein Einfluss auf die Expression und Funktion anderer TRPC Kanäle ist jedoch auch hier zu erwarten. Daher ist es wichtig spezifische Inhibitoren in WT Mäusen zu untersuchen sowie Studien zur Genexpressionsanalysen bei TRPC1/3<sup>-/-</sup> sowie TRPC 1/6<sup>-/-</sup> Mäusen durchzuführen, um mögliche Kompensationsmechanismen zu ermitteln.

Zusammenfassend konnte mit den durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse nicht vor CHPH geschützt sind. Es konnte kein Einfluss der Doppelknockouts auf den RVSP gezeigt werden. Da der RVSP vom vaskulären *Remodeling* sowie der Kontraktilität der pulmonalen Gefäße abhängt, wurden hierfür genauere Untersuchungen in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen vorgenommen. Auch hier wurde, den RVSP Daten entsprechend, kein Einfluss der Doppelknockouts auf

die mittlere Muskularisierung sowie die Kontraktilität der pulmonalen Gefäße nachgewiesen.

#### **4.4.2 Der Einfluss von TRPC1/3 und TRPC1/6 auf die hämodynamische und strukturelle Herzphysiologie**

Durch chronische Hypoxie-Exposition kommt es außerdem zu einer RHH und dadurch zu einer reduzierten rechtsventrikulären Funktion (Stenmark et al. 2009; Galiè et al. 2016; Larsen 2016). Im Rahmen der RHH kommt es zu einer Zunahme des Gewichts des RV sowie zu einer erhöhten RVWT bei WT Mäusen im Vergleich zur Normoxie. Des Weiteren kann ein Anstieg des Fulton-Index als Maß für die RHH beobachtet werden. Zudem zeigen WT Mäuse unter Hypoxie eine niedrigere TAPSE als Zeichen für die reduzierte rechtsventrikuläre Funktion im Rahmen der RHH.

Bisher konnte in TRPC1<sup>-/-</sup> (Malczyk 2017; Malczyk et al. 2013), TRPC3<sup>-/-</sup> (Mayser 2021) und TRPC6<sup>-/-</sup> (Weissmann et al. 2006) Mäusen nicht gezeigt werden, dass diese TRP Proteine im Mechanismus der RHH eine Rolle spielen. Es konnte beispielsweise kein Einfluss von TRPC1<sup>-/-</sup> oder TRPC3<sup>-/-</sup> auf den Fulton-Index beobachtet werden (Mayser 2021; Malczyk et al. 2013). Bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen konnte hingegen ein partieller Einfluss auf die RHH unter chronischer Hypoxie nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine verminderte Zunahme der RVWT bei erhöhtem Gewicht des RV unter Hypoxie. Ein positiver Effekt auf die TAPSE konnte in den TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen mit den WT Mäusen unter Hypoxie allerdings nicht beobachtet werden (Malkmus 2022; Malkmus et al. 2022).

Der Einfluss von TRPC auf die RHH und die rechtsventrikuläre Funktion ist in der Literatur jedoch teilweise kontrovers diskutiert. *Xia et al.* zeigten in Untersuchungen im Gegensatz zu *Weissmann et al.* zum Beispiel sowohl unter Hypoxie als auch bereits unter Normoxie eine verminderte RHH bei TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen (Xia et al. 2014). Außerdem wurde im Rahmen dieser Untersuchungen ein verminderter Fulton-Index bei TRPC1<sup>-/-</sup> Mäusen nach chronischer Hypoxie Exposition festgestellt. Des Weiteren konnten *Xia et al.* bei TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls eine verminderte RHH unter Hypoxie nachweisen (Xia et al. 2014). Allerdings ist zu beachten, dass ein direkter Vergleich der Untersuchungen von *Xia et al.* und *Weissmann et al.* bzw. der in diesem Rahmen durchgeführten Experimenten nicht möglich ist, da sich die Versuchsbedingungen teils

unterschieden. Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, wurden bei *Xia et al.* nur männliche und teils auch jüngere Mäuse verwendet. Zudem unterscheiden sich die Versuchszahlen, was Effekte auf die statistische Aussagekraft hat (Xia et al. 2014). Von entscheidender Bedeutung ist jedoch sicherlich, wie bereits erwähnt, die unterschiedliche Hypoxiedauer, der die Mäuse ausgesetzt waren.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen unter Hypoxie, wie bei WT Mäusen, ein erhöhtes Gewicht des RV nachgewiesen werden. Allerdings zeigten TRPC1/6<sup>-/-</sup> wie auch TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäuse eine geringere Zunahme der RVWT unter chronischer Hypoxie Exposition im Vergleich zu den WT Mäusen. Zusätzlich zur Beurteilung der rechtsventrikulären Funktion wurde die TAPSE ermittelt. Diese wurde durch TRPC1/3<sup>-/-</sup> nicht beeinflusst. In der Gruppe der TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigte sich auch eine reduzierte TAPSE unter chronischer Hypoxie, allerdings konnte sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie eine höhere TAPSE verglichen mit den WT Mäusen beobachtet werden. Zusätzlich wurde als Maß für die RHH der Fulton-Index bestimmt. TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten wie WT Mäuse unter chronischer Hypoxie einen Anstieg des Fulton-Index, welcher in der TRPC1/6<sup>-/-</sup> Gruppe jedoch etwas geringer ausfiel. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die RHH als auch die rechtsventrikuläre Funktion unter Hypoxie-Exposition durch TRPC1/3 nicht beeinflusst werden. TRPC1/6 hingegen scheint eine partielle Rolle für die RHH und die rechtsventrikuläre Funktion zu spielen. Es zeigten sich den Werten der WT Gruppe entsprechende Daten für das RV-Gewicht und den RVSP. Allerdings konnte unter chronischer Hypoxie in der Gruppe der TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen mit den WT Mäusen ein geringer Anstieg des RVWT sowie des Fulton-Index bei gleichzeitig verbesserter TAPSE beobachtet werden. Allerdings ist zu beachten, dass Angaben über den Fulton-Index als Maß für die RHH insgesamt kritisch zu betrachten sind. Obwohl der Fulton-Index als Maß für die RHH gilt, ist dieser nur aussagekräftig, wenn keine Veränderungen des linken Herzens auftreten. Um einen solchen Einfluss auf den Fulton-Index zu beurteilen, wurde in dieser Arbeit zusätzlich das Gewicht aus LV + S bestimmt. Das Gewicht aus LV + S zeigte unter hypoxischen Bedingungen in den KO Linien vergleichbare Werte wie die WT Mäuse, sodass insgesamt bei beiden Doppelknockouts von keiner Beeinflussung der Rechtsherzhypertrophie im Vergleich zu WT Mäusen ausgegangen werden kann.

Auch der LVSP als Maß für die linksventrikuläre Funktion sowie der SAP, welcher bei Erhöhung ein Hinweis für Veränderungen im linksventrikulären Auswurftrakt ist, wurden

im Rahmen dieser Arbeit bestimmt und waren unter Hypoxie bei WT Mäusen unverändert. Es wurde unter hypoxischen Bedingungen kein Effekt von TRPC1/6 auf den LVSP und SAP nachgewiesen. Bei TRPC1/3 zeigte sich unter chronischer Hypoxie ein erhöhter SAP verglichen mit der WT Gruppe, wobei kein Einfluss auf den LVSP beobachtet werden konnte. Zur genaueren Analyse des kombinierten Einflusses von TRPC1 und TRPC3 bzw. TRPC6 auf die kardiale Funktion und die Hämodynamik sind allerdings in Zukunft noch weitere Untersuchungen notwendig, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr vorgenommen werden konnten. In der Literatur ist insgesamt nur wenig über den Einfluss von TRP Proteinen auf das linke Herz bekannt, insbesondere für den Einfluss von TRPC1 und TRPC6 auf die Hämodynamik des linken Herzens. Bei TRPC3<sup>-/-</sup> Mäusen wurde nach chronischer Hypoxie kein Unterschied im SAP oder eine Zunahme der Masse aus LV + S verglichen mit WT Kontrollmäusen festgestellt (Mayer 2021).

TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten hingegen unter beiden oxygenen Bedingungen sowohl eine Erhöhung der Masse aus LV mit S als auch einen Anstieg des LVSP und SAP. Es wird vermutet, dass das simultane globale Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine zu einer rechts- und linksventrikulären Hypertrophie führt und somit die Hämodynamik der Maus beeinflusst (Malkmus 2022). Es ist bekannt, dass TRPC Proteine, wie TRPC1, 3, 4, 5 und 6, auch im Herzen exprimiert werden. Dort spielen sie eine Schlüsselrolle in der Antwort der kardialen Zellen auf ischämischen Stress und werden bei Ischämie vermehrt exprimiert (Falcón et al. 2020). Eine vermehrte Expression von TRPC3 führt beispielsweise zur ventrikulären Hypertrophie als Kompensation des Zellverlusts durch kardiale Ischämie (Falcón et al. 2020; Nakayama et al. 2006). Zudem wurde bereits gezeigt, dass der singuläre Verlust von TRPC1, 3 oder 6 eine kardiale Hypertrophie verhindert (Seth et al. 2009; Wu et al. 2010). Die Deletion von mehreren TRPC Proteinen könnte womöglich zu Kompensationsmechanismen im Herzen führen, weshalb TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen unter Hypoxie eine RHH aufwiesen sowie TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse generell eine verbesserte rechtsventrikuläre Funktion zeigten. Das genaue Zusammenspiel der einzelnen TRPC Proteine in den pulmonalen Gefäßen sowie im Herzen muss in Zukunft daher weiter untersucht werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Deletion von TRPC6 einen positiven Effekt auf die RHH bei CHPH hat, welcher bei zusätzlichem Verlust von TRPC1 partiell kompensiert wurde. Das kombinierte Fehlen von TRPC1 mit TRPC3 bzw.

TRPC6 hatte keinen maßgeblichen Einfluss auf die RHH. Da insbesondere der Fulton-Index auch von den strukturellen Gegebenheiten des linken Herzens abhängt, wurden hierfür genauere Untersuchungen in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen vorgenommen. Auch hier zeigten die Doppelknockouts keinen bedeutenden Einfluss auf die strukturellen und hämodynamischen Bedingungen des linken Herzens. Die Masse des LV mit S, der SAP sowie der LVSP waren unter chronischer Hypoxie verglichen mit den WT Kontrollmäusen, abgesehen von dem SAP in der TRPC1/3<sup>-/-</sup> Gruppe, unverändert. Insgesamt konnte für TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> kein Schutz vor CHPH nachgewiesen werden.

#### **4.5 TRPC-Kanäle als potenzielle Therapiemöglichkeit**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass vor allem TRPC1/6 in der Pathogenese der CHPH relevant sein könnte. Ein Einfluss von TRPC1/3 konnte weder in Bezug auf die HPV noch auf die CHPH Entstehung und das *Remodeling* nachgewiesen werden.

In TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen wurde ein fehlender Anstieg des mPAP sowohl während der akuten als auch während der prolongierten Phase der HPV beobachtet. Dabei wurde durch spezifische Untersuchungen mittels des TRPC6-Inhibitors BI-743927 gezeigt, dass vor allem TRPC6 ein Schlüsselfaktor in der akuten Phase der HPV ist. Dennoch entwickelten TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine CHPH, charakterisiert durch eine erhöhte RHH, einen erhöhten RVSP sowie einen erhöhten mittleren Muskularisierungsgrad als Zeichen des stattgefundenen *Remodelings* der Pulmonalgefäße. Diese Ergebnisse bestätigen bisherige Studien, dass die HPV und die CHPH über unterschiedliche Mechanismen reguliert werden. Es ist davon auszugehen, dass TRPC1/6 eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der HPV spielt, jedoch bietet der globale KO von TRPC1/6 keinen Schutz vor der Entstehung einer CHPH. Zum genaueren Verständnis müssten weitere Untersuchungen vorgenommen werden, unter anderem durch die Verwendung von induzierbaren KO Mäusen oder das kurative Verabreichen von Inhibitoren. Zum besseren Verständnis der vorliegenden Daten, erhoben in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen, wären zudem Genexpressionsanalysen notwendig, um kompensatorische Gegenregulationen durch andere Proteine nachzuweisen.

Ein wichtiger Schlüsselfaktor in der Untersuchung von TRPC Proteinen und deren Funktion ist der Einsatz von spezifischen Inhibitoren oder induzierbaren KO Mäusen. Mit Hilfe dieser wäre es auch *in vitro* möglich, unter anderem den Einfluss von TRPC1/3 oder TRPC1/6 auf die Hypoxie-induzierte Proliferation, Migration und Apoptose von PASMCs zu untersuchen. Dadurch könnten weitere wichtige Erkenntnisse zum Mechanismus des *Remodelings* gewonnen werden. Die Verwendung von zelltypspezifischen und induzierbaren KO Mäusen bietet außerdem den Vorteil, dass ein Einfluss auf andere physiologische Systeme der Maus ausgeschlossen werden könnten. Auch für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen sind solche Untersuchungen wesentlich.

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Arbeit vor allem TRPC1/6 als potenzielle therapeutische Zielstruktur. Der konkrete therapeutische Nutzen kann aufgrund von fehlenden spezifischen Inhibitoren bisher jedoch nicht genau abgeschätzt werden. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um einen kurativen Ansatz in der Behandlung der CHPH für Patienten und Patientinnen zu ermöglichen.

## 5 Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist ein Sammelbegriff für schwerwiegende Lungenerkrankungen, die durch einen erhöhten pulmonal-arteriellen Mitteldruck (mPAP) von  $> 20$  mmHg definiert sind. In dieser Arbeit wurde die PH assoziiert mit Lungenerkrankungen und/oder chronischer Hypoxie untersucht. Dabei lag der Fokus auf der Hypoxie-induzierten PH (CHPH). Alveoläre Hypoxie führt zur physiologischen, reversiblen Kontraktion der Pulmonalgefäße, die als hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) bezeichnet wird. Hierdurch werden nicht ausreichend ventilerte Lungenareale geringer durchblutet. Globale Hypoxie, die z. B. in großen Höhen auftritt, führt zur HPV in der gesamten Lunge, wodurch der mPAP temporär ansteigt. Dabei kommt es auf Molekularebene durch einen Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Einstrom zur Kontraktion der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs). Andauernde globale Hypoxie führt zu einem dauerhaften Anstieg des mPAP und letztlich zum vaskulären *Remodeling*. Das vaskuläre *Remodeling* stellt einen pathologischen und irreversiblen Mechanismus dar, wodurch das Lumen der Pulmonalgefäße dauerhaft verengt wird. Dadurch kommt es zur Überbelastung des rechten Ventrikels und damit zu einer vermehrten Rechtsherzhypertrophie (RHH) begleitet von einem erhöhten rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSP). Dies führt zum Krankheitsbild der CHPH. Trotz der hohen Prävalenz von CHPH gibt es aktuell noch keine kurativen therapeutischen Möglichkeiten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Bedeutung der klassischen transienten Rezeptor Potential (TRPC) Proteine 1 und 3 sowie 1 und 6 für die Entstehung der CHPH zu untersuchen. Aufgrund ihrer Funktion als spannungsunabhängige, nicht-selektive Kationen-Kanäle, permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$ , wurde die Hypothese aufgestellt, dass sie eine Rolle in der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase spielen und damit sowohl die HPV als auch das vaskuläre *Remodeling* beeinflussen. Um die Rolle von TRPC1/3 und TRPC1/6 zu untersuchen, wurden TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse mittels isolierter, ventilierter und blutfrei perfundierter Lunge (ILU) sowie im Modell der chronischen Hypoxie mit einer Sauerstoffkonzentration von 10 % über 28 Tage untersucht und mit Wildtyp (WT) Mäusen verglichen. Es konnte bei TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen nur ein geringer Einfluss auf die HPV und kein Einfluss auf die Entstehung einer CHPH nachgewiesen werden. TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse hingegen reagierten auf akute Hypoxie im Gegensatz zu WT Mäusen nicht mit einem Anstieg des mPAP. Jedoch konnte auch für TRPC1/6<sup>-/-</sup> kein Einfluss auf die Entstehung der CHPH beobachtet werden. Sowohl TRPC1/3<sup>-/-</sup> als auch TRPC1/6<sup>-/-</sup>

Mäuse reagierten auf chronische Hypoxie in gleichem Ausmaß wie WT Mäuse mit einem Anstieg der RHH sowie des RVSP und bildeten eine CHPH aus. In der histologischen Analyse konnte dieses Ergebnis bestätigt werden, da TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse analog zu den WT Mäusen einen erhöhten mittleren Muskularisierungsgrad aufwiesen. Inwieweit Gegenregulationen durch andere Proteine diese Ergebnisse beeinflusst haben, bleibt in zukünftigen Studien zu untersuchen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass insbesondere TRPC1/6 in der Regulation der HPV von Bedeutung ist und daher auch in der CHPH relevant sein könnte, weshalb in Zukunft Studien mit zellspezifischen und induzierbaren Knockouts durchgeführt werden sollten.

## 6 Summary

Pulmonary hypertension (PH) is a term used for a collection of serious lung diseases, all of which are defined by an increase in mean pulmonary arterial pressure (mPAP) above 20 mmHg. This dissertation examined PH associated with lung diseases and/or chronic hypoxia, focusing on hypoxia-induced PH (CHPH). Alveolar hypoxia leads to the physiological, reversible contraction of pulmonary vessels, known as hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV). This results in reduced blood flow to poorly ventilated lung areas. Global hypoxia, which occurs at high altitudes, for example, triggers HPV throughout the lung, temporarily raising mPAP. On a molecular level, this process involves the influx of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), causing contraction of the pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs). Prolonged global hypoxia leads to a persistent increase in mPAP and to vascular remodelling. Vascular remodelling is a pathological mechanism that permanently narrows the lumen of pulmonary vessels, leading to an overload of the right ventricle, right ventricular hypertrophy (RVH), and elevated right ventricular systolic pressure (RVSP). This results in a condition known as CHPH. Despite the high prevalence of CHPH, there are currently no curative therapeutical options available.

The aim of this study was to investigate the significance of the classical transient receptor potential (TRPC) proteins 1 and 3, as well as 1 and 6, in the development of CHPH. Due to their function as voltage-independent, non-selective cation channels permeable to  $\text{Ca}^{2+}$ , the hypothesis was proposed that they play a role in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, thereby influencing both HPV and vascular remodelling. To investigate the role of TRPC1/3 and TRPC1/6, TRPC1/3<sup>-/-</sup> and TRPC1/6<sup>-/-</sup> mice were studied using isolated, ventilated, and blood-free perfused lungs (ILU) as well as a chronic hypoxia model with 10 % oxygen concentration over 28 days, and were compared with wild-type (WT) mice. In TRPC1/3<sup>-/-</sup> mice, only a mild influence on HPV and no influence on the development of CHPH was observed. However, TRPC1/6<sup>-/-</sup> mice did not exhibit an increase in mPAP in response to acute hypoxia, unlike WT mice. Nevertheless, TRPC1/6<sup>-/-</sup> mice did not show an influence on the development of CHPH. Both TRPC1/3<sup>-/-</sup> and TRPC1/6<sup>-/-</sup> responded to chronic hypoxia, like WT mice, with an increase in RVH and RVSP, and developed CHPH. This result was confirmed in histological analysis, as TRPC1/3<sup>-/-</sup> and TRPC1/6<sup>-/-</sup> mice, similar to WT mice, showed an increased average degree of muscularization. The extent to which counter-regulation by other proteins influenced these results remains to be investigated in future studies.

In summary, this study demonstrated that TRPC1/6 is particularly important in the regulation of HPV and could therefore be relevant in CHPH, suggesting that future studies with cell-specific and inducible knockouts should be conducted.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

$\Delta$	Delta
%	Prozent
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Calcium-Konzentration
< / >	Kleiner / größer als
$\leq / \geq$	Kleiner / größer gleich
$^{\circ}C$	Grad Celsius
$\mu l$	Mikroliter
$\mu m$	Mikrometer
$\mu M$	Mikromolar
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BNP	B-natriuretisches Peptid ( <i>Brain natriuretic peptide</i> )
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	Circa
$Ca^{2+}$	Calcium
CHPH	Chronische Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie
cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung ( <i>chronic obstructiv pulmonary disease</i> )
CTEPH	Chronische thromboembolische Pulmonale Hypertonie
C-Terminus	Kohlenstoff-Terminus
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzellen ( <i>endothelial cells</i> )
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET-1	Endothelin-1
ET <sub>A</sub> -/ET <sub>B</sub> - Rezeptoren	Endothelin-A-/Endothelin-B-Rezeptoren

G	Fallbeschleunigung (9,81 Meter pro Sekundenquadrat)
g	Gramm
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
Hox	Hypoxie
HPV	Hypoxische, pulmonale Vasokonstriktion
HZV	Herzzeitvolumen
I.E.	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
ILU	Isolierte, ventilierte und blutfrei-perfundierte Lunge
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPAH	Idiopathische PAH
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
l/Min.	Liter pro Minute
LHH	Linksherzhypertrophie
LV	Linker Ventrikel
LVP	Linksventrikulärer Druck ( <i>left ventricular pressure</i> )
LVSP	Linksventrikulärer systolischer Druck ( <i>left ventricular systolic pressure</i> )
M	Molar
max.	Maximal
mg / kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol/l	Millimol pro Liter
mPAP	Mittlerer PAP ( <i>mean PAP</i> )
mRNA	Boten RNA ( <i>messenger RNA</i> )
mV	Millivolt

MW	Mittelwert
N	Stickstoff
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nmol/l	Nanomol pro Liter
NO	Stickstoffmonoxid
Nox	Normoxie
N-Terminus	Amino-Terminus
NT-proBNP	N-terminales Vorläuferhormon des BNPs ( <i>N-terminal prohormone of BNP</i> )
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
Orai	<i>Calcium release-activated calcium channel protein</i>
PA	Pulmonalarterie
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PAP	Pulmonalarterieller Druck ( <i>pulmonary arterial pressure</i> )
PAP <sub>sys</sub>	Systolischer pulmonalarterieller Druck ( <i>systolic pulmonary arterial pressure</i> )
PASMCs	Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen ( <i>pulmonary arterial smooth muscle cells</i> )
PBS	Phosphatpufferlösung ( <i>phosphat-buffered saline</i> )
PCWP	Pulmonalkapillärer Verschlussdruck ( <i>pulmonary capillary wedge pressure</i> )
PEA	Pulmonale Endarteriektomie
PEEP	<i>Positive end-expiratory pressure</i>
PH	Pulmonale Hypertonie
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
pO <sub>2</sub>	Partieller Sauerstoffdruck
PVR	Pulmonal-vaskulärer Widerstand ( <i>pulmonary vascular resistance</i> )
r	Radius
RHH	Rechtsherzhypertrophie
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )

ROC	<i>Receptor operated channel</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RV	Rechter Ventrikel
RVSP	Rechtsventrikulärer systolischer Druck ( <i>right ventricular systolic pressure</i> )
RVWT	Wandstärke des rechten Herzens ( <i>right ventricular wall thickness</i> )
S	Septum
SAP	Systolisch arterieller Druck ( <i>systolic arterial pressure</i> )
SARS-CoV-2	Schweres-akutes-Atemwegsyndrom-Coronavirus Typ 2 ( <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i> )
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SOC	<i>Store operated channel</i>
sog.	Sogenannt
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STIM	<i>Stromal Interaction Molecule</i>
TAPSE	<i>Tricuspid annular plane systolic excursion</i>
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TRPA	Ankyriner TRP
TRPC	Klassischer ( <i>classical</i> ) TRP
TRPM	Melastatiner TRP
TRPML	Mucolipin TRP
TRPN	<i>No-mechanoreceptor potential C TRP</i>
TRPP	Polycystein TRP
TRPV	Vanilloider TRP
TTE	Transthorakale Echokardiographie
u.a.	Unter anderem
VEGF	Vaskulärer Endothelwachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organisation</i> )
WT	Wildtyp
WU	Wood-Einheit ( <i>wood unit</i> )
z. B.	zum Beispiel

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des diagnostischen Algorithmus bei Pulmonaler Hypertonie</b> .....	6
<b>Abbildung 2: Vasculäres Remodeling</b> .....	15
<b>Abbildung 3: Phylogenetischer Baum der TRP-Superfamilie</b> .....	19
<b>Abbildung 4: Aufbau der verschiedenen TRP-Subfamilien</b> .....	20
<b>Abbildung 5: Struktureller Aufbau des TRPC-Proteins und des TRPC-Kanals</b> .....	21
<b>Abbildung 6: Versuchsaufbau der experimentellen Versuchstierhaltung</b> .....	35
<b>Abbildung 7: Versuchsaufbau der Lungenspülung und Organentnahme</b> .....	38
<b>Abbildung 8: Lungenspülung und Organentnahme</b> .....	39
<b>Abbildung 9: Aufbau der isolierten, ventilerten und blutfrei-perfundierten Lunge (ILU)</b> .....	45
<b>Abbildung 10: Versuchsablauf der ILU</b> .....	48
<b>Abbildung 11: Versuchsdurchführung der ILU mit Zugabe von U46619 und KCl</b> .....	48
<b>Abbildung 12: Versuchsdurchführung der ILU mit Zugabe von ET-1</b> .....	49
<b>Abbildung 13: Versuchsdurchführung der ILU mit Zugabe des TRPC 6-Inhibitors BI-743927 / DMSO</b> .....	50
<b>Abbildung 14: Akute und langanhaltende Hypoxie in WT und TRPC1/3<sup>-/-</sup> Lungen</b> .....	52
<b>Abbildung 15: Akute und langanhaltende Hypoxie in WT und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen</b> .....	53
<b>Abbildung 16: Pulmonale Vasokonstriktion in WT, TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen nach Zugabe von U46619</b> .....	54
<b>Abbildung 17: Pulmonale Vasokonstriktion in WT, TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Lungen nach Zugabe von U46619</b> .....	54
<b>Abbildung 18: Pulmonale Vasokonstriktion in WT, TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen nach Zugabe von KCl</b> .....	55
<b>Abbildung 19: Pulmonale Vasokonstriktion in WT, TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Lungen nach Zugabe von KCl</b> .....	56
<b>Abbildung 20: Pulmonale Vasokonstriktion in WT und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen nach Zugabe von ET-1</b> .....	57

<b>Abbildung 21: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den Hämatokrit-Wert in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen .....</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 22: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den RVSP in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen .....</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 23: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den SAP und LVSP in TRPC1/3<sup>-/-</sup> Mäusen .....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 24: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den SAP und LVSP in TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen .....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 25: Einfluss von chronischer Hypoxie auf das Gewicht des RV in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen .....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 26: Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Masse von LV + S in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen .....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 27: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den Fulton-Index in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen .....</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 28: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den RVWT in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen .....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 29: Einfluss von chronischer Hypoxie auf die TAPSE in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen .....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 30: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von WT, TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Lungen.....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 31: Einfluss von chronischer Hypoxie auf den mittleren Muskularisierungsgrad der kleinen Pulmonalgefäße in TRPC1/3<sup>-/-</sup> und TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen .....</b>	<b>66</b>
<b>Abbildung 32: Pulmonale Vasokonstriktion in WT Lungen nach Zugabe von DMSO als Kontrollsubstanz bzw. des TRPC6-Inhibitors BI-749327. ....</b>	<b>67</b>
<b>Abbildung 33: Überblick der Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>

## **9 Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1: Hämodynamische Unterteilung der Pulmonalen Hypertonie .....</b>	<b>2</b>
<b>Tabelle 2: Klassifikation der PH von Nizza 2013.....</b>	<b>3</b>
<b>Tabelle 3: Alveolar-Standardprogramm zur Entwässerung von Lungen.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 4: Arbeitsschritte zur Entfernung von Paraffin und Rehydrierung der Lungenschnitte.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabelle 5: Protokoll für die Doppelfärbung mit Antikörper gegen <math>\alpha</math>-smooth muscle actin und vWF.....</b>	<b>43</b>

## 10 Literaturverzeichnis

Aaronson, Philip I.; Robertson, Tom P.; Knock, Gregory A.; Becker, Silke; Lewis, Tristan H.; Snetkov, Vladimir; Ward, Jeremy P. T. (2006): Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. In: *The Journal of Physiology* 570 (1), S. 53–58. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.098855.

Abe, Kohtaro; Toba, Michie; Alzoubi, Abdallah; Ito, Masako; Fagan, Karen A.; Cool, Carlyne D. et al. (2010): Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. In: *Circulation* 121 (25), S. 2747–2754. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.927681.

Bikou, Olympia; Hajjar, Roger J.; Hadri, Lahouaria; Sassi, Yassine (2020): Induction and Characterization of Pulmonary Hypertension in Mice using the Hypoxia/SU5416 Model. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (160). DOI: 10.3791/59252.

Carratu, Pierluigi; Scoditti, Cristina; Maniscalco, Mauro; Seccia, Teresa Maria; Di Gioia, Giuseppe; Gadaleta, Felice et al. (2008): Exhaled and arterial levels of endothelin-1 are increased and correlate with pulmonary systolic pressure in COPD with pulmonary hypertension. In: *BMC pulmonary medicine* 8, S. 20. DOI: 10.1186/1471-2466-8-20.

Cassady, Steven J.; Reed, Robert M. (2019): Pulmonary Hypertension in COPD: A Case Study and Review of the Literature. In: *Medicina* 55 (8). DOI: 10.3390/medicina55080432.

Castillo-Galán, Sebastián; Arenas, Germán A.; Iturriaga, Rodrigo (2022): Contribution of STIM-Activated TRPC-ORAI Channels in Pulmonary Hypertension Induced by Chronic Sustained and Intermittent Hypoxia. In: *Current vascular pharmacology* 20 (3), S. 272–283. DOI: 10.2174/1570161120666220321141805.

Chazova, I.; Loyd, J. E.; Zhdanov, V. S.; Newman, J. H.; Belenkov, Y.; Meyrick, B. (1995): Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. In: *The American journal of pathology* 146 (2), S. 389–397.

Ciuclan, Loredana; Bonneau, Olivier; Hussey, Martin; Duggan, Nicholas; Holmes, Alan M.; Good, Robert et al. (2011): A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 184 (10), S. 1171–1182. DOI: 10.1164/rccm.201103-0412OC.

Clapham, D. E.; Runnels, L. W.; Strübing, C. (2001): The TRP ion channel family. In: *Nature reviews. Neuroscience* 2 (6), S. 387–396. DOI: 10.1038/35077544.

Colvin, Kelley L.; Yeager, Michael E. (2014): Animal Models of Pulmonary Hypertension: Matching Disease Mechanisms to Etiology of the Human Disease. In: *Journal of pulmonary & respiratory medicine* 4 (4). DOI: 10.4172/2161-105X.1000198.

Cussac, Laure-Anne; Cardouat, Guillaume; Tiruchellvam Pillai, Nichiren; Campagnac, Marilyne; Robillard, Paul; Montillaud, Anaïs et al. (2020): TRPV4 channel mediates adventitial fibroblast activation and adventitial remodeling in pulmonary hypertension. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 318 (1), L135-L146. DOI: 10.1152/ajplung.00084.2019.

Davenport, Anthony P.; Hyndman, Kelly A.; Dhaun, Neeraj; Southan, Christopher; Kohan, Donald E.; Pollock, Jennifer S. et al. (2016): Endothelin. In: *Pharmacological reviews* 68 (2), S. 357–418. DOI: 10.1124/pr.115.011833.

Derler, Isabella; Jardin, Isaac; Romanin, Christoph (2016): Molecular mechanisms of STIM/Orai communication. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 310 (8), C643-62. DOI: 10.1152/ajpcell.00007.2016.

Dietrich, Alexander; Fahlbusch, Meike; Gudermann, Thomas (2014): Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator? In: *Cells* 3 (4), S. 939–962. DOI: 10.3390/cells3040939.

Dietrich, Alexander; Kalwa, Hermann; Rost, Benjamin R.; Gudermann, Thomas (2005a): The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 451 (1), S. 72–80. DOI: 10.1007/s00424-005-1460-0.

Dietrich, Alexander; Kalwa, Hermann; Storch, Ursula; Mederos y Schnitzler, Michael; Salanova, Birgit; Pinkenburg, Olaf et al. (2007): Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 455 (3), S. 465–477. DOI: 10.1007/s00424-007-0314-3.

Dietrich, Alexander; Mederos y Schnitzler, Michael; Gollasch, Maik; Gross, Volkmar; Storch, Ursula; Dubrovska, Galyna et al. (2005b): Increased vascular smooth muscle

contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice. In: *Molecular and cellular biology* 25 (16), S. 6980–6989. DOI: 10.1128/MCB.25.16.6980-6989.2005.

Dumitrascu, Rio; Koebrich, Silke; Dony, Eva; Weissmann, Norbert; Savai, Rajkumar; Pullamsetti, Soni S. et al. (2008): Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. In: *BMC pulmonary medicine* 8, S. 25. DOI: 10.1186/1471-2466-8-25.

Dunham-Snary, Kimberly J.; Wu, Danchen; Sykes, Edward A.; Thakrar, Amar; Parlow, Leah R. G.; Mewburn, Jeffrey D. et al. (2017): Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: From Molecular Mechanisms to Medicine. In: *Chest* 151 (1), S. 181–192. DOI: 10.1016/j.chest.2016.09.001.

Earley, Scott; Brayden, Joseph E. (2015): Transient receptor potential channels in the vasculature. In: *Physiological reviews* 95 (2), S. 645–690. DOI: 10.1152/physrev.00026.2014.

Eddahibi, S.; Fabre, V.; Boni, C.; Martres, M. P.; Raffestin, B.; Hamon, M.; Adnot, S. (1999): Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin. In: *Circulation research* 84 (3), S. 329–336. DOI: 10.1161/01.res.84.3.329.

Eddahibi, S.; Humbert, M.; Fadel, E.; Raffestin, B.; Darmon, M.; Capron, F. et al. (2001): Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. In: *The Journal of clinical investigation* 108 (8), S. 1141–1150. DOI: 10.1172/JCI12805.

Eder, Petra; Molkentin, Jeffery D. (2011): TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. In: *Circulation research* 108 (2), S. 265–272. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.225888.

Ejikeme, Chidinma; Safdar, Zeenat (2024): Exploring the pathogenesis of pulmonary vascular disease. In: *Frontiers in Medicine* 11, S. 1402639. DOI: 10.3389/fmed.2024.1402639.

Erdmann, Erland (Hg.) (2011): Klinische Kardiologie. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. 8. Aufl. 2011. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1503398>.

Ewert, Ralf; Gläser, Sven; Bollmann, Tom; Schäper, Christoph (2011): Inhaled iloprost for therapy in pulmonary arterial hypertension. In: *Expert review of respiratory medicine* 5 (2), S. 145–152. DOI: 10.1586/ers.11.14.

Falcón, Débora; Galeano-Otero, Isabel; Martín-Bórnez, Marta; Fernández-Velasco, María; Gallardo-Castillo, Isabel; Rosado, Juan A. et al. (2020): TRPC Channels: Dysregulation and Ca<sup>2+</sup> Mishandling in Ischemic Heart Disease. In: *Cells* 9 (1). DOI: 10.3390/cells9010173.

Feske, Stefan (2019): CRAC channels and disease - From human CRAC channelopathies and animal models to novel drugs. In: *Cell calcium* 80, S. 112–116. DOI: 10.1016/j.ceca.2019.03.004.

Firth, Amy L.; Remillard, Carmelle V.; Yuan, Jason X-J (2007): TRP channels in hypertension. In: *Biochimica et biophysica acta* 1772 (8), S. 895–906. DOI: 10.1016/j.bbadis.2007.02.009.

Formoso, Karina; Susperreguy, Sebastian; Freichel, Marc; Birnbaumer, Lutz (2020): RNA-seq analysis reveals TRPC genes to impact an unexpected number of metabolic and regulatory pathways. In: *Scientific Reports* 10 (1), S. 7227. DOI: 10.1038/s41598-020-61177-x.

Freichel, M.; Vennekens, R.; Olausson, J.; Hoffmann, M.; Müller, C.; Stolz, S. et al. (2004): Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. In: *Biochemical and biophysical research communications* 322 (4), S. 1352–1358. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.08.041.

Fuchs, Beate; Rupp, Markus; Ghofrani, Hossein A.; Schermuly, Ralph T.; Seeger, Werner; Grimminger, Friedrich et al. (2011): Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. In: *Respiratory research* 12 (1), S. 20. DOI: 10.1186/1465-9921-12-20.

Galiè, Nazzareno; Humbert, Marc; Vachiery, Jean-Luc; Gibbs, Simon; Lang, Irene; Torbicki, Adam et al. (2016): 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint 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: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). In: *European heart journal* 37 (1), S. 67–119. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv317.

Galiè, Nazzareno; McLaughlin, Vallerie V.; Rubin, Lewis J.; Simonneau, Gerald (2019): An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. In: *The European respiratory journal* 53 (1). DOI: 10.1183/13993003.02148-2018.

Gibbons, G. H.; Dzau, V. J. (1994): The emerging concept of vascular remodeling. In: *The New England journal of medicine* 330 (20), S. 1431–1438. DOI: 10.1056/NEJM199405193302008.

Gomez-Arroyo, Jose; Saleem, Sheinei J.; Mizuno, Shiro; Syed, Aamer A.; Bogaard, Harm J.; Abbate, Antonio et al. (2012): A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 302 (10), L977-91. DOI: 10.1152/ajplung.00362.2011.

Guibert, Christelle; Ducret, Thomas; Savineau, Jean-Pierre (2011): Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells. In: *Advances in experimental medicine and biology* 704, S. 687–706. DOI: 10.1007/978-94-007-0265-3\_36.

Hadzic, Stefan; Wu, Cheng-Yu; Gredic, Marija; Kojonazarov, Baktybek; Pak, Oleg; Kraut, Simone et al. (2021): The effect of long-term doxycycline treatment in a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 320 (5), L903-L915. DOI: 10.1152/ajplung.00048.2021.

Hall, S. M.; Davie, N.; Klein, N.; Haworth, S. G. (2011): Endothelin receptor expression in idiopathic pulmonary arterial hypertension: effect of bosentan and epoprostenol treatment. In: *The European respiratory journal* 38 (4), S. 851–860. DOI: 10.1183/09031936.00167010.

Harder, D. R.; Madden, J. A.; Dawson, C. (1985): Hypoxic induction of Ca<sup>2+</sup>-dependent action potentials in small pulmonary arteries of the cat. In: *Journal of Applied Physiology* 59 (5), S. 1389–1393. DOI: 10.1152/jappl.1985.59.5.1389.

Hartmann, Jana; Dragicevic, Elena; Adelsberger, Helmuth; Henning, Horst A.; Sumser, Martin; Abramowitz, Joel et al. (2008): TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. In: *Neuron* 59 (3), S. 392–398. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.06.009.

Hartner, Ruben B. (2019): Pulmonale und systemische Hämodynamik bei Belastung. Diplomarbeit. Medizinische Universität Graz, Graz. Universitätsklinik für Innere

Medizin, klinische Abteilung für Pulmonologie. Online verfügbar unter [file:///C:/Users/lisa-/Downloads/Diplomarbeit%20\(002\).pdf](file:///C:/Users/lisa-/Downloads/Diplomarbeit%20(002).pdf), zuletzt geprüft am 04.12.2023.

Herold, Gerd (2020): Innere Medizin 2021. Köln: Herold Gerd.

Hoendermis, E. S. (2011): Pulmonary arterial hypertension: an update. In: *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* 19 (12), S. 514–522. DOI: 10.1007/s12471-011-0222-1.

Hoeper, M. M. (2009): The new definition of pulmonary hypertension. In: *The European respiratory journal* 34 (4), S. 790–791. DOI: 10.1183/09031936.00056809.

Hoeper, M. M.; Ghofrani, H. A.; Gorenflo, M.; Grünig, E.; Schranz, D.; Rosenkranz, S. (2010): Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie: Europäische Leitlinien 2009. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 64 (7), S. 401–414. DOI: 10.1055/s-0029-1244112.

Hoeper, Marius M.; Ghofrani, Hossein-Ardeschir; Grünig, Ekkehard; Klose, Hans; Olschewski, Horst; Rosenkranz, Stephan (2017): Pulmonary Hypertension. In: *Deutsches Arzteblatt Online*. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0073.

Hof, Thomas; Chaigne, Sébastien; Récalde, Alice; Sallé, Laurent; Brette, Fabien; Guinamard, Romain (2019): Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. In: *Nature reviews. Cardiology* 16 (6), S. 344–360. DOI: 10.1038/s41569-018-0145-2.

Hofmann, Thomas; Schaefer, Michael; Schultz, Günter; Gudermann, Thomas (2002): Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11), S. 7461–7466. DOI: 10.1073/pnas.102596199.

Hooper, T.; Mellor, A. (2011): Cardiovascular physiology at high altitude. In: *Journal of the Royal Army Medical Corps* 157 (1), S. 23–28. DOI: 10.1136/jramc-157-01-04.

Horowitz, A.; Menice, C. B.; Laporte, R.; Morgan, K. G. (1996): Mechanisms of smooth muscle contraction. In: *Physiological reviews* 76 (4), S. 967–1003. DOI: 10.1152/physrev.1996.76.4.967.

Humbert, Marc; Kovacs, Gabor; Hoeper, Marius M.; Badagliacca, Roberto; Berger, Rolf M. F.; Brida, Margarita et al. (2022): 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and

treatment of pulmonary hypertension. In: *European heart journal* 43 (38), S. 3618–3731. DOI: 10.1093/eurheartj/ehac237.

Humbert, Marc; Kovacs, Gabor; Hoeper, Marius M.; Badagliacca, Roberto; Berger, Rolf M. F.; Brida, Margarita et al. (2023): 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. In: *The European respiratory journal* 61 (1). DOI: 10.1183/13993003.00879-2022.

Huppelsberg, Jens; Walter, Kerstin; Huckstorf, Christine (2003): *Kurzlehrbuch Physiologie*. 42 Tabellen ; [nach dem neuen GK 1]. Stuttgart: Thieme.

Hyvelin, J. M.; Guibert, C.; Marthan, R.; Savineau, J. P. (1998): Cellular mechanisms and role of endothelin-1-induced calcium oscillations in pulmonary arterial myocytes. In: *The American journal of physiology* 275 (2), L269-82. DOI: 10.1152/ajplung.1998.275.2.L269.

Ichikawa, Jun; Inoue, Ryuji (2014): TRPC6 regulates cell cycle progression by modulating membrane potential in bone marrow stromal cells. In: *British Journal of Pharmacology* 171 (23), S. 5280–5294. DOI: 10.1111/bph.12840.

Ikeda, Kahori T.; Hale, Philip T.; Pauciulo, Michael W.; Dasgupta, Nupur; Pastura, Patricia A.; Le Cras, Timothy D. et al. (2019): Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension in Different Mouse Strains: Relation to Transcriptome. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 60 (1), S. 106–116. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0435OC.

Inoue, Ryuji; Jensen, Lars Jørn; Shi, Juan; Morita, Hiromitsu; Nishida, Motohiro; Honda, Akira; Ito, Yushi (2006): Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. In: *Circulation research* 99 (2), S. 119–131. DOI: 10.1161/01.RES.0000233356.10630.8a.

Jain, Pritesh P.; Lai, Ning; Xiong, Mingmei; Chen, Jiyuan; Babicheva, Aleksandra; Zhao, Tengting et al. (2021): TRPC6, a therapeutic target for pulmonary hypertension. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 321 (6), L1161-L1182. DOI: 10.1152/ajplung.00159.2021.

Jaïs, Xavier; Brenot, Philippe; Bouvaist, Hélène; Jevnikar, Mitja; Canuet, Matthieu; Chabanne, Céline et al. (2022): Balloon pulmonary angioplasty versus riociguat for the treatment of inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension (RACE): a

multicentre, phase 3, open-label, randomised controlled trial and ancillary follow-up study. In: *The Lancet. Respiratory medicine* 10 (10), S. 961–971. DOI: 10.1016/S2213-2600(22)00214-4.

Kapitsinou, Pinelopi P.; Rajendran, Ganeshkumar; Astleford, Lindsay; Michael, Mark; Schonfeld, Michael P.; Fields, Timothy et al. (2016): The Endothelial Prolyl-4-Hydroxylase Domain 2/Hypoxia-Inducible Factor 2 Axis Regulates Pulmonary Artery Pressure in Mice. In: *Molecular and cellular biology* 36 (10), S. 1584–1594. DOI: 10.1128/MCB.01055-15.

Kim, Jinsung; Ko, Juyeon; Myeong, Jongyun; Kwak, Misun; Hong, Chansik; So, Insuk (2019): TRPC1 as a negative regulator for TRPC4 and TRPC5 channels. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 471 (8), S. 1045–1053. DOI: 10.1007/s00424-019-02289-w.

King, Christopher S.; Shlobin, Oksana A. (2020): The Trouble With Group 3 Pulmonary Hypertension in Interstitial Lung Disease: Dilemmas in Diagnosis and the Conundrum of Treatment. In: *Chest* 158 (4), S. 1651–1664. DOI: 10.1016/j.chest.2020.04.046.

Kizub, Igor V.; Strielkov, Ievgen V.; Shaifta, Yasin; Becker, Silke; Prieto-Lloret, Jesus; Snetkov, Vladimir A. et al. (2013): Gap junctions support the sustained phase of hypoxic pulmonary vasoconstriction by facilitating calcium sensitization. In: *Cardiovascular Research* 99 (3), S. 404–411. DOI: 10.1093/cvr/cvt129.

Klinke, Rainer (Hg.) (2005): Physiologie. Zahlreiche Tabellen. Unter Mitarbeit von Christian Bauer. 5., komplett überarb. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.

Kourembanas, S.; Marsden, P. A.; McQuillan, L. P.; Faller, D. V. (1991): Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. In: *The Journal of clinical investigation* 88 (3), S. 1054–1057. DOI: 10.1172/JCI115367.

Kovacs, G.; Berghold, A.; Scheidl, S.; Olschewski, H. (2009): Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. In: *The European respiratory journal* 34 (4), S. 888–894. DOI: 10.1183/09031936.00145608.

Kraut, Simone (2014): Pathomechanismen der Schlafapnoe im Mausmodell: Rolle der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase. Gießen, Lahn: VVB Laufersweiler Verlag. Online verfügbar unter <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2014/10849/>, zuletzt geprüft am 20.02.2023.

Kunert-Keil, Christiane; Bisping, Frederike; Krüger, Jana; Brinkmeier, Heinrich (2006): Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. In: *BMC Genomics* 7, S. 159. DOI: 10.1186/1471-2164-7-159.

Kwon, Yong Soo; Chi, Su Young; Shin, Hong Joon; Kim, Eun Young; Yoon, Byeong Kab; Ban, Hee Jung et al. (2010): Plasma C-reactive protein and endothelin-1 level in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension. In: *Journal of Korean medical science* 25 (10), S. 1487–1491. DOI: 10.3346/jkms.2010.25.10.1487.

Larsen, Reinhard (2016): Physiologie des Herzens und des Kreislaufs. In: Reinhard Larsen (Hg.): *Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege*. Unter Mitarbeit von Tobias Fink und Tilmann Müller-Wolff. 9., vollst. überarb. Auflage 2016. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 646–663.

Leach, R. M.; Robertson, T. P.; Twort, C. H.; Ward, J. P. (1994): Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. In: *The American journal of physiology* 266 (3 Pt 1), L223-31. DOI: 10.1152/ajplung.1994.266.3.L223.

Levin, E. R. (1995): Endothelins. In: *The New England journal of medicine* 333 (6), S. 356–363. DOI: 10.1056/NEJM199508103330607.

Licker, Marc; Hagerman, Andres; Jeleff, Alexandre; Schorer, Raoul; Ellenberger, Christoph (2021): The hypoxic pulmonary vasoconstriction: From physiology to clinical application in thoracic surgery. In: *Saudi Journal of Anaesthesia* 15 (3), S. 250–263. DOI: 10.4103/sja.sja\_1216\_20.

Lin, Mo-Jun; Leung, George P. H.; Zhang, Wei-Min; Yang, Xiao-Ru; Yip, Kay-Pong; Tse, Chung-Ming; Sham, James S. K. (2004): Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca<sup>2+</sup> channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. In: *Circulation research* 95 (5), S. 496–505. DOI: 10.1161/01.RES.0000138952.16382.ad.

Liu, Q.; Sham, J. S.; Shimoda, L. A.; Sylvester, J. T. (2001): Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 280 (5), L856-65. DOI: 10.1152/ajplung.2001.280.5.L856.

Liu, Xianji; Yao, Xiaoqiang; Tsang, Suk Ying (2020): Post-Translational Modification and Natural Mutation of TRPC Channels. In: *Cells* 9 (1). DOI: 10.3390/cells9010135.

Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2019): Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Lumb, Andrew B.; Slinger, Peter (2015): Hypoxic pulmonary vasoconstriction: physiology and anesthetic implications. In: *Anesthesiology* 122 (4), S. 932–946. DOI: 10.1097/ALN.0000000000000569.

Malczyk, Monika (2017): Die Rolle von TRPC-Kanälen in der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in der Maus. Online verfügbar unter [http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2017/13192/pdf/MalczykMonika\\_2017\\_05\\_18.pdf](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2017/13192/pdf/MalczykMonika_2017_05_18.pdf).

Malczyk, Monika; Veith, Christine; Fuchs, Beate; Hofmann, Katharina; Storch, Ursula; Schermuly, Ralph T. et al. (2013): Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 188 (12), S. 1451–1459. DOI: 10.1164/rccm.201307-1252OC.

Malkmus, Kathrin (2022): Die Bedeutung von TRPC1, 3 und 6 für die Pathogenese der durch chronische Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie. Gießen, Lahn: VVB Laufersweiler Verlag (Edition Scientifique).

Malkmus, Kathrin; Brosien, Monika; Knoepp, Fenja; Schaffelhofer, Lisa; Grimminger, Friedrich; Rummel, Christoph et al. (2022): Deletion of classical transient receptor potential 1, 3 and 6 alters pulmonary vasoconstriction in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. In: *Frontiers in physiology* 13, S. 1080875. DOI: 10.3389/fphys.2022.1080875.

Mandras, Stacy A.; Mehta, Hirsch S.; Vaidya, Anjali (2020): Pulmonary Hypertension: A Brief Guide for Clinicians. In: *Mayo Clinic proceedings* 95 (9), S. 1978–1988. DOI: 10.1016/j.mayocp.2020.04.039.

Marini, Matilde; Titz, Mustafa; Souza Monteiro de Araújo, Daniel; Geppetti, Pierangelo; Nassini, Romina; Logu, Francesco de (2023): TRP Channels in Cancer: Signaling Mechanisms and Translational Approaches. In: *Biomolecules* 13 (10). DOI: 10.3390/biom13101557.

Mayser, Caroline Dorothea (2021): Die Rolle des klassischen transienten Rezeptorpotential 3 Kanalproteins bei der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Maus. Online verfügbar unter <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2021/16012/>.

McCulloch, K. M.; Docherty, C. C.; Morecroft, I.; MacLean, M. R. (1996): EndothelinB receptor-mediated contraction in human pulmonary resistance arteries. In: *British Journal of Pharmacology* 119 (6), S. 1125–1130. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb16013.x.

McLoughlin, Paul (2018): Hypoxic pulmonary vasoconstriction: Building a solid base. In: *Experimental physiology* 103 (9), S. 1181–1182. DOI: 10.1113/EP087179.

Meyrick, B.; Reid, L. (1979): Hypoxia and incorporation of 3H-thymidine by cells of the rat pulmonary arteries and alveolar wall. In: *The American journal of pathology* 96 (1), S. 51–70.

Milger-Kneidinger, Katrin; Held Matthias (2024): Aktuelle leitliniengerechte Therapie der pulmonal arteriellen Hypertonie. Zertifizierte Fortbildung. Unter Mitarbeit von Janssen-Cilag GmbH: CME-Verlag. Online verfügbar unter [Minke, Baruch; Cook, Boaz \(2002\): TRP channel proteins and signal transduction. In: \*Physiological reviews\* 82 \(2\), S. 429–472. DOI: 10.1152/physrev.00001.2002.](https://www.cme-kurs.de/cdn2/pdf/Handout_LL-Therapie-der-PAH.pdf#:~:text=Derzeit%20stehen%20insgesamt%20elf%20Wirkstoffe%20zur%20Verf%C3%BCgung%2C%20die,von%20individuellen%20Risikofaktoren%20und%20Begleiterkrankungen%20einge-setzt%20werden%20k%C3%B6nnen., zuletzt geprüft am 07.05.2025.</a></p></div><div data-bbox=)

Montell, Craig (2005): The TRP superfamily of cation channels. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005 (272), re3. DOI: 10.1126/stke.2722005re3.

Montell, Craig; Birnbaumer, Lutz; Flockerzi, Veit; Bindels, René J.; Bruford, Elspeth A.; Caterina, Michael J. et al. (2002): A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. In: *Molecular cell* 9 (2), S. 229–231. DOI: 10.1016/s1097-2765(02)00448-3.

Naeije, Robert; D'Alto, Michele (2016): The Diagnostic Challenge of Group 2 Pulmonary Hypertension. In: *Progress in cardiovascular diseases* 59 (1), S. 22–29. DOI: 10.1016/j.pcad.2016.05.003.

Nakayama, Hiroyuki; Wilkin, Benjamin J.; Bodi, Ilona; Molkenkin, Jeffery D. (2006): Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart.

In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (10), S. 1660–1670. DOI: 10.1096/fj.05-5560com.

Olschewski, Andrea; Hong, Zhigang; Nelson, Daniel P.; Weir, E. Kenneth (2002): Graded response of K<sup>+</sup> current, membrane potential, and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> to hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283 (5), L1143-L1150. DOI: 10.1152/ajplung.00104.2002.

Opitz, Christian (2017): Pulmonale Hypertonie: Was ist neu? In: *Deutsches Arzteblatt Online*. DOI: 10.3238/PersKardio.2017.03.31.01.

Ozen, Gulsev; Benyahia, Chabha; Amgoud, Yasmine; Patel, Jigisha; Abdelazeem, Heba; Bouhadoun, Amel et al. (2020): Interaction between PGI<sub>2</sub> and ET-1 pathways in vascular smooth muscle from Group-III pulmonary hypertension patients. In: *Prostaglandins & other lipid mediators* 146, S. 106388. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2019.106388.

Pak, Oleg; Janssen, Wiebke; Ghofrani, Hossein Ardeschir; Seeger, Werner; Grimminger, Friedrich; Schermuly, Ralph Theo; Weissmann, Norbert (2010): Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. In: *Drug Discovery Today: Disease Models* 7 (3-4), S. 89–97. DOI: 10.1016/j.ddmod.2011.02.002.

Pak, Oleg; Nolte, Anika; Knoepp, Fenja; Giordano, Luca; Pecina, Petr; Hüttemann, Maik et al. (2022): Mitochondrial oxygen sensing of acute hypoxia in specialized cells - Is there a unifying mechanism? In: *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics* 1863 (8), S. 148911. DOI: 10.1016/j.bbabi.2022.148911.

Peng, W.; Michael, J. R.; Hoidal, J. R.; Karwande, S. V.; Farrukh, I. S. (1998): ET-1 modulates K<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-channel activity and arterial tension in normoxic and hypoxic human pulmonary vasculature. In: *The American journal of physiology* 275 (4), L729-39. DOI: 10.1152/ajplung.1998.275.4.L729.

Pepke-Zaba, J.; Morrell, N. W. (2005): The endothelin system and its role in pulmonary arterial hypertension (PAH). In: *Thorax* 60 (6), S. 443–444. DOI: 10.1136/thx.2004.031724.

Physiologie. 93 Tabellen (2010). Unter Mitarbeit von Jan C. Behrends. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

Piciu, Florentina; Balas, Mihaela; Badea, Madalina Andreea; Cucu, Dana (2023): TRP Channels in Tumoral Processes Mediated by Oxidative Stress and Inflammation. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 12 (7). DOI: 10.3390/antiox12071327.

Pietra, Giuseppe G.; Capron, Frederique; Stewart, Susan; Leone, Ornella; Humbert, Marc; Robbins, Ivan M. et al. (2004): Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. In: *Journal of the American College of Cardiology* 43 (12 Suppl S), 25S-32S. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.02.033.

Pitton, M. B.; Kemmerich, G.; Herber, S.; Schweden, F.; Mayer, E.; Thelen, M. (2002): Chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie: Diagnostische Wertigkeit von Mehrschicht-CT und selektiver Pulmonalis-DSA. In: *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 174 (4), S. 474-479. DOI: 10.1055/s-2002-25117.

Post, J. M.; Hume, J. R.; Archer, S. L.; Weir, E. K. (1992): Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. In: *The American journal of physiology* 262 (4 Pt 1), C882-90. DOI: 10.1152/ajpcell.1992.262.4.C882.

Raoul, William; Wagner-Ballon, Oriane; Saber, Guitanouch; Hulin, Anne; Marcos, Elisabeth; Giraudier, Stéphane et al. (2007): Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. In: *Respiratory research* 8 (1), S. 8. DOI: 10.1186/1465-9921-8-8.

Renna, Nicolás F.; Las Heras, Natalia de; Miatello, Roberto M. (2013): Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. In: *International journal of hypertension* 2013, S. 808353. DOI: 10.1155/2013/808353.

Robertson, T. P.; Aaronson, P. I.; Ward, J. P. (1995): Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca<sup>2+</sup> in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca<sup>2+</sup> sensitization. In: *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 268 (1), H301-H307. DOI: 10.1152/ajpheart.1995.268.1.H301.

Robertson, Tom P.; Aaronson, Philip I.; Ward, Jeremy P. T. (2003): Ca<sup>2+</sup> sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 284 (6), L1121-6. DOI: 10.1152/ajplung.00422.2002.

- Rosenkranz, S.; Behr, J.; Ewert, R.; Ghofrani, H. A.; Grünig, E.; Halank, M. et al. (2011): Rechtsherzkatheter-Untersuchung bei pulmonaler Hypertonie. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 136 (50), 2601-16; quiz 2617-20. DOI: 10.1055/s-0031-1292858.
- Rosenkranz, Stephan (2011): Pulmonale Hypertonie. In: Erland Erdmann (Hg.): *Klinische Kardiologie. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*, Bd. 11. 8. Aufl. 2011. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 309–334.
- Rubens, C.; Ewert, R.; Halank, M.; Wensel, R.; Orzechowski, H. D.; Schultheiss, H. P.; Hoeffken, G. (2001): Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. In: *Chest* 120 (5), S. 1562–1569. DOI: 10.1378/chest.120.5.1562.
- Samanta, Amrita; Hughes, Taylor E. T.; Moiseenkova-Bell, Vera Y. (2018): Transient Receptor Potential (TRP) Channels. In: *Sub-cellular biochemistry* 87, S. 141–165. DOI: 10.1007/978-981-10-7757-9\_6.
- Sato, K.; Morio, Y.; Morris, K. G.; Rodman, D. M.; McMurtry, I. F. (2000): Mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction involves ET(A) receptor-mediated inhibition of K(ATP) channel. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 278 (3), L434-42. DOI: 10.1152/ajplung.2000.278.3.L434.
- Sauvageau, Stéphanie; Thorin, Eric; Caron, Alexandre; Dupuis, Jocelyn (2007): Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET(A) and ET(B) receptor interactions. In: *Journal of vascular research* 44 (5), S. 375–381. DOI: 10.1159/000102534.
- Schermuly, Ralph T.; Ghofrani, Hossein A.; Wilkins, Martin R.; Grimminger, Friedrich (2011): Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. In: *Nature reviews. Cardiology* 8 (8), S. 443–455. DOI: 10.1038/nrcardio.2011.87.
- Schindl, Rainer; Fritsch, Reinhard; Jardin, Isaac; Frischauf, Irene; Kahr, Heike; Muik, Martin et al. (2012): Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca<sup>2+</sup> influx. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (42), S. 35612–35620. DOI: 10.1074/jbc.M112.400952.

Schmidt, Robert F. (Hg.) (2007): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. 30., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).

Seo, B.; Oemar, B. S.; Siebenmann, R.; Segesser, L. von; Lüscher, T. F. (1994): Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. In: *Circulation* 89 (3), S. 1203–1208. DOI: 10.1161/01.cir.89.3.1203.

Seth, Malini; Zhang, Zhu-Shan; Mao, Lan; Graham, Victoria; Burch, Jarrett; Stiber, Jonathan et al. (2009): TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. In: *Circulation research* 105 (10), S. 1023–1030. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206581.

Shimoda, L. A.; Sylvester, J. T.; Sham, J. S. (1998): Inhibition of voltage-gated K<sup>+</sup> current in rat intrapulmonary arterial myocytes by endothelin-1. In: *The American journal of physiology* 274 (5), L842-53. DOI: 10.1152/ajplung.1998.274.5.L842.

Shimoda, L. A.; Sylvester, J. T.; Sham, J. S. (2000): Mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> by endothelin-1 in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 278 (1), L157-64. DOI: 10.1152/ajplung.2000.278.1.L157.

Shimoda, Larissa A.; Sham, James S. K.; Liu, Qiang; Sylvester, J. T. (2002): Acute and chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction: a central role for endothelin-1? In: *Respiratory physiology & neurobiology* 132 (1), S. 93–106. DOI: 10.1016/s1569-9048(02)00052-6.

Silbernagl, Stefan; Despopoulos, Agamemnon (2007): Taschenatlas Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme (Thieme Electronic Book Library).

Simonneau, Gérald; Robbins, Ivan M.; Beghetti, Maurice; Channick, Richard N.; Delcroix, Marion; Denton, Christopher P. et al. (2009): Updated clinical classification of pulmonary hypertension. In: *Journal of the American College of Cardiology* 54 (1 Suppl), S43-S54. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.04.012.

Sommer, N.; Dietrich, A.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Gudermann, T.; Schulz, R. et al. (2008): Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. In:

*The European respiratory journal* 32 (6), S. 1639–1651. DOI: 10.1183/09031936.00013908.

Sommer, N.; Richter, M. J.; Tello, K.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Ghofrani, H. A.; Gall, H. (2017): Update pulmonalerterielle Hypertonie : Definitionen, Diagnose, Therapie. In: *Der Internist* 58 (9), S. 937–957. DOI: 10.1007/s00108-017-0301-5.

Sommer, Natascha; Strielkov, Ievgen; Pak, Oleg; Weissmann, Norbert (2016): Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. In: *The European respiratory journal* 47 (1), S. 288–303. DOI: 10.1183/13993003.00945-2015.

Song, Jia-Lin; Zheng, Si-Yi; He, Rui-Lan; Gui, Long-Xin; Lin, Mo-Jun; Sham, James S. K. (2021): Serotonin and chronic hypoxic pulmonary hypertension activate a NADPH oxidase 4 and TRPM2 dependent pathway for pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and migration. In: *Vascular pharmacology* 138, S. 106860. DOI: 10.1016/j.vph.2021.106860.

Stenmark, Kurt R.; Fagan, Karen A.; Frid, Maria G. (2006): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. In: *Circulation research* 99 (7), S. 675–691. DOI: 10.1161/01.RES.0000243584.45145.3f.

Stenmark, Kurt R.; Meyrick, Barbara; Galie, Nazzareno; Mooi, Wolter J.; McMurtry, Ivan F. (2009): Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (6), L1013-32. DOI: 10.1152/ajplung.00217.2009.

Stiefelhagen, Peter (2021): Die Rechtsherzinsuffizienz ist eine Systemerkrankung. In: *CV* 21 (2), S. 10–11. DOI: 10.1007/s15027-021-3491-7.

Storch, Ursula; Forst, Anna-Lena; Philipp, Maximilian; Gudermann, Thomas; Mederos y Schnitzler, Michael (2012): Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (5), S. 3530–3540. DOI: 10.1074/jbc.M111.283218.

Strielkov, Ievgen; Krause, Nicole Catherine; Sommer, Natascha; Schermuly, Ralph Theo; Ghofrani, Hossein Ardeschir; Grimminger, Friedrich et al. (2018): Hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated mouse pulmonary arterial vessels. In: *Experimental physiology* 103 (9), S. 1185–1191. DOI: 10.1113/EP087117.

Susperreguy, Sebastian; Yamashita, Megumi; Choi, Chan-II; Liao, Yanhong; Burch, Lauranell H.; Blankenship, Terry L. et al. (2024): Genetic evidence against involvement of TRPC proteins in SOCE, ROCE, and CRAC channel function. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 121 (49), e2411389121. DOI: 10.1073/pnas.2411389121.

Sylvester, J. T.; Shimoda, Larissa A.; Aaronson, Philip I.; Ward, Jeremy P. T. (2012): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. In: *Physiological reviews* 92 (1), S. 367–520. DOI: 10.1152/physrev.00041.2010.

Tai, Yilin; Yang, Shenglian; Liu, Yong; Shao, Wei (2017): TRPC Channels in Health and Disease. In: *Advances in experimental medicine and biology* 976, S. 35–45. DOI: 10.1007/978-94-024-1088-4\_4.

Talbot, Nick P.; Balanos, George M.; Dorrington, Keith L.; Robbins, Peter A. (2005): Two temporal components within the human pulmonary vascular response to approximately 2 h of isocapnic hypoxia. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 98 (3), S. 1125–1139. DOI: 10.1152/jappphysiol.00903.2004.

Tano, Jean-Yves; Solanki, Sumeet; Lee, Robert H.; Smedlund, Kathryn; Birnbaumer, Lutz; Vazquez, Guillermo (2014): Bone marrow deficiency of TRPC3 channel reduces early lesion burden and necrotic core of advanced plaques in a mouse model of atherosclerosis. In: *Cardiovascular Research* 101 (1), S. 138–144. DOI: 10.1093/cvr/cvt231.

Taraseviciene-Stewart, L.; Kasahara, Y.; Alger, L.; Hirth, P.; Mc Mahon, G.; Waltenberger, J. et al. (2001): Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (2), S. 427–438. DOI: 10.1096/fj.00-0343com.

Tian, Heshen; Liu, Lei; Wu, Ying; Wang, Ruiwen; Jiang, Yongliang; Hu, Ruicheng et al. (2021a): Resistin-like molecule  $\beta$  acts as a mitogenic factor in hypoxic pulmonary hypertension via the Ca<sup>2+</sup>-dependent PI3K/Akt/mTOR and PKC/MAPK signaling pathways. In: *Respiratory research* 22 (1), S. 8. DOI: 10.1186/s12931-020-01598-4.

Tian, Qiuyun; Fan, Xiaofang; Ma, Jianshe; Li, Dantong; Han, Yujiao; Yin, Xianghong et al. (2021b): Critical role of VGLL4 in the regulation of chronic normobaric hypoxia-

induced pulmonary hypertension in mice. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (8), e21822. DOI: 10.1096/fj.202002650RR.

Trulock, Elbert P.; Edwards, Leah B.; Taylor, David O.; Boucek, Mark M.; Keck, Berkeley M.; Hertz, Marshall I. (2004): The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult lung and heart-lung transplant report--2004. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 23 (7), S. 804–815. DOI: 10.1016/j.healun.2004.05.013.

Tuder, Rubin M. (2017): Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. In: *Cell and tissue research* 367 (3), S. 643–649. DOI: 10.1007/s00441-016-2539-y.

Tuder, Rubin M.; Archer, Stephen L.; Dorfmueller, Peter; Erzurum, Serpil C.; Guignabert, Christophe; Michelakis, Evangelos et al. (2013a): Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. In: *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl), D4-12. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.025.

Tuder, Rubin M.; Stacher, Elvira; Robinson, Jeffrey; Kumar, Rahul; Graham, Brian B. (2013b): Pathology of pulmonary hypertension. In: *Clinics in chest medicine* 34 (4), S. 639–650. DOI: 10.1016/j.ccm.2013.08.009.

Turner, J. L.; Kozlowski, R. Z. (1997): Relationship between membrane potential, delayed rectifier K<sup>+</sup> currents and hypoxia in rat pulmonary arterial myocytes. In: *Experimental physiology* 82 (4), S. 629–645. DOI: 10.1113/expphysiol.1997.sp004052.

Veith, Christine; Neghabian, Dariusch; Luitel, Himan; Wilhelm, Jochen; Egemnazarov, Bakytbek; Muntanjohl, Caja et al. (2020): FHL-1 is not involved in pressure overload-induced maladaptive right ventricular remodeling and dysfunction. In: *Basic research in cardiology* 115 (2), S. 17. DOI: 10.1007/s00395-019-0767-5.

Vitali, Sally H.; Hansmann, Georg; Rose, Chase; Fernandez-Gonzalez, Angeles; Scheid, Annette; Mitsialis, S. Alex; Kourembanas, Stella (2014): The Sugden 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up. In: *Pulmonary circulation* 4 (4), S. 619–629. DOI: 10.1086/678508.

Wang, Hongbo; Cheng, Xiaoding; Tian, Jinbin; Xiao, Yuling; Tian, Tian; Xu, Fuchun et al. (2020): TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small

molecular probes. In: *Pharmacology & therapeutics* 209, S. 107497. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107497.

Wang, Jian; Weigand, Letitia; Lu, Wenju; Sylvester, J. T.; Semenza, Gregg L.; Shimoda, Larissa A. (2006): Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> in pulmonary arterial smooth muscle cells. In: *Circulation research* 98 (12), S. 1528–1537. DOI: 10.1161/01.RES.0000227551.68124.98.

Wang, Jian; Xu, Chuyi; Zheng, Qiuyu; Yang, Kai; Lai, Ning; Wang, Tao et al. (2017): Orai1, 2, 3 and STIM1 promote store-operated calcium entry in pulmonary arterial smooth muscle cells. In: *Cell Death Discovery* 3, S. 17074. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.74.

Wang, Youjun; Deng, Xiaoxiang; Hewavitharana, Thamara; Soboloff, Jonathan; Gill, Donald L. (2008): Stim, ORAI and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 35 (9), S. 1127–1133. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2008.05018.x.

Ward, Jeremy P. T.; McMurtry, Ivan F. (2009): Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. In: *Current opinion in pharmacology* 9 (3), S. 287–296. DOI: 10.1016/j.coph.2009.02.006.

Waxman, Aaron B. (2012): Exercise physiology and pulmonary arterial hypertension. In: *Progress in cardiovascular diseases* 55 (2), S. 172–179. DOI: 10.1016/j.pcad.2012.07.003.

Weissmann, Norbert; Dietrich, Alexander; Fuchs, Beate; Kalwa, Hermann; Ay, Mahmut; Dumitrascu, Rio et al. (2006): Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (50), S. 19093–19098. DOI: 10.1073/pnas.0606728103.

Wheatley, K.; Creed, M.; Mellor, A. (2011): Haematological changes at altitude. In: *Journal of the Royal Army Medical Corps* 157 (1), S. 38–42. DOI: 10.1136/jramc-157-01-07.

Worley, Paul F.; Zeng, Weizhong; Huang, Guo N.; Yuan, Joseph P.; Kim, Joo Young; Lee, Min Goo; Muallem, Shmuel (2007): TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. In: *Cell calcium* 42 (2), S. 205–211. DOI: 10.1016/j.ceca.2007.03.004.

Wu, Xu; Eder, Petra; Chang, Baojun; Molkenin, Jeffery D. (2010): TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (15), S. 7000–7005. DOI: 10.1073/pnas.1001825107.

Xia, Yang; Yang, Xiao-Ru; Fu, Zhenzhen; Paudel, Omkar; Abramowitz, Joel; Birnbaumer, Lutz; Sham, James S. K. (2014): Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 63 (1), S. 173–180. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01902.

Yasunobu, Yuji; Oudiz, Ronald J.; Sun, Xing-Guo; Hansen, James E.; Wasserman, Karlman (2005): End-tidal PCO<sub>2</sub> abnormality and exercise limitation in patients with primary pulmonary hypertension. In: *Chest* 127 (5), S. 1637–1646. DOI: 10.1378/chest.127.5.1637.

Yoshiyoshi, M.; Nishioka, K.; Nakao, K.; Saito, Y.; Matsumura, M.; Ueda, T. et al. (1991): Plasma endothelin concentrations in patients with pulmonary hypertension associated with congenital heart defects. Evidence for increased production of endothelin in pulmonary circulation. In: *Circulation* 84 (6), S. 2280–2285. DOI: 10.1161/01.cir.84.6.2280.

Young, Jason M.; Williams, David R.; Thompson, A. A. Roger (2019): Thin Air, Thick Vessels: Historical and Current Perspectives on Hypoxic Pulmonary Hypertension. In: *Frontiers in Medicine* 6, S. 93. DOI: 10.3389/fmed.2019.00093.

Yu, Ying; Fantozzi, Ivana; Remillard, Carmelle V.; Landsberg, Judd W.; Kunichika, Naomi; Platoshyn, Oleksandr et al. (2004): Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (38), S. 13861–13866. DOI: 10.1073/pnas.0405908101.

Yu, Ying; Keller, Steve H.; Remillard, Carmelle V.; Safrina, Olga; Nicholson, Ann; Zhang, Shenyan L. et al. (2009): A functional single-nucleotide polymorphism in the

TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. In: *Circulation* 119 (17), S. 2313–2322. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.782458.

Yu, Ying; Sweeney, Michele; Zhang, Shen; Platoshyn, Oleksandr; Landsberg, Judd; Rothman, Abraham; Yuan, Jason X-J (2003): PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 284 (2), C316-30. DOI: 10.1152/ajpcell.00125.2002.

Yuan, Jason X.-J. (2011): Textbook of pulmonary vascular disease. New York: Springer.

Zamora, M. A.; Dempsey, E. C.; Walchak, S. J.; Stelzner, T. J. (1993): BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 9 (4), S. 429–433. DOI: 10.1165/ajrcmb/9.4.429.

## 11 Eigenständigkeitserklärung

### Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **12 Veröffentlichungen**

Malkmus, K.; Brosien, M.; Knoepp, F.; Schaffelhofer, L.; Grimminger, F.; Rummel, C.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Birnbaumer, L.; Weissmann, N.; Kraut, S. (2022): Deletion of classical transient receptor potential 1, 3 and 6 alters pulmonary vasoconstriction in chronic hypoxie-induced pulmonary hypertension in mice. *Frontiers in physiology* (13), S. 1080875. DOI: 10.3389/fphys.2022.1080875

## 13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all jenen bedanken, die mich während meiner Experimente und beim Verfassen dieser Doktorarbeit unterstützt haben. Ohne eure Hilfe, euer Wissen, eure Geduld und euer Vertrauen wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt:

**Prof. Dr. Norbert Weißmann**, der dieses Projekt erst ermöglicht hat; durch die Bereitstellung sämtlicher Materialien, des Arbeitsplatzes und eine engagierte und wohlwollende Betreuung.

**Prof. Dr. Alexander Dietrich** vom Walther-Straub-Institut in München danke ich herzlich für die Bereitstellung der gentechnisch modifizierten Mauslinien, die die Grundlage der Experimente bildeten.

Ein ganz besonderer Dank geht an **Dr. Monika Brosien**, für ihre persönliche Betreuung während der gesamten Projektzeit, auch über ihre Zeit am CPI hinaus. Ich danke dir für deine gute Unterstützung in allen Bereichen, deine zahlreichen Erklärungen, kreativen Lösungsansätze und deine Flexibilität.

Ebenso herzlich danke ich **Dr. Simone Kraut** für ihre tatkräftige Hilfe, die vielen lustigen Momente im Labor, ihre unermüdliche Motivation zu jeder Tageszeit und dafür, dass du stets eine Lösung für jedes meiner Probleme gefunden hast, insbesondere in der herausfordernden Endphase dieser Arbeit. Ohne dich wäre die Fertigstellung in dieser Form kaum möglich gewesen.

Ein besonders großer Dank gilt auch **Dr. Kathrin Malkmus** und **Dr. Julia Schäffer** für die herzliche Aufnahme in das Team, eure Geduld bei meinen zahllosen Fragen, eure konstante Hilfsbereitschaft und die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse, innerhalb und außerhalb des Labors. Ich blicke mit einem Lächeln auf diese besondere Zeit mit euch zurück.

Ein herzliches Dankeschön richte ich auch an alle technischen Assistentinnen und Assistenten der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme, die Unterstützung bei den Experimenten, die reibungslose Organisation und die schnelle Lösung aller kleinen und großen Herausforderungen. Mein besonderer Dank gilt dabei **Carmen Homberger**, **Nils Schupp** und **Susanne Lich**. Ein ganz spezieller Dank geht an **Karin Quanz** für ihr

beeindruckendes Organisationstalent, ihre Hilfsbereitschaft und ihr stets offenes Ohr, selbst in stressigen Zeiten.

Meinen Freundinnen und Freunden danke ich von Herzen für ihre konstante Unterstützung, ihren Zuspruch in schwierigen Momenten und dafür, dass sie stets an mich geglaubt haben. Insbesondere danke ich **Anouk Begerow** für die schönen gemeinsamen Stunden im Labor und seitdem auch darüber hinaus und **Nico Zimmermann**, dafür, dass du mir in jeder Lebenslage zur Seite stehst und dass selbst anstrengende Doppelfärbungen mit dir doppelt so viel Freude gemacht haben, unabhängig von der Uhrzeit.

Schließlich und vor allem gilt mein tiefster Dank meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die mich mit unermüdlicher Liebe und uneingeschränkter Unterstützung auf meinem Weg begleitet haben. Ihr habt euch oft selbst zurückgenommen, um mir ein gutes Leben, ein erfolgreiches Studium und letztlich auch diese Arbeit zu ermöglichen. Dafür danke ich euch von ganzem Herzen.

