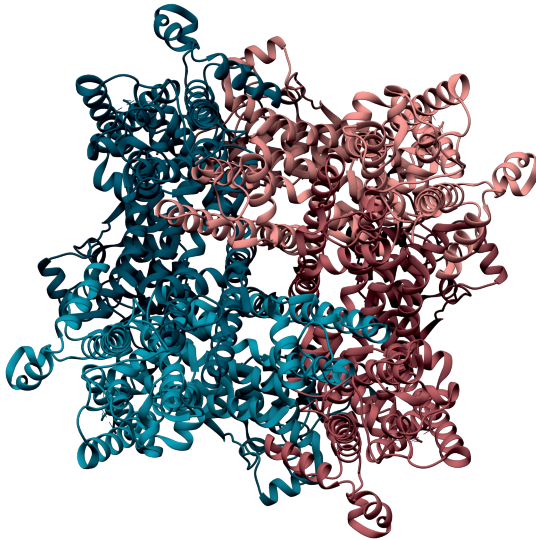


**KATHRIN MALKMUS**

---

Die Bedeutung von TRPC1, 3 und 6 für die  
Pathogenese der durch chronische Hypoxie  
induzierten pulmonalen Hypertonie



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2022

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2022

© 2022 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY

Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890

email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie  
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: apl. Prof. Dr. Christoph Rummel

und

dem Zentrum für Innere Medizin  
Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Norbert Weißmann

**Die Bedeutung von TRPC1, 3 und 6 für die Pathogenese  
der durch chronische Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Kathrin Malkmus**

Tierärztin aus Fulda

Gießen 2022

---

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter: apl. Prof. Dr. Christoph Rummel  
Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 03.08.2022

---

*Die Wissenschaft geht nicht immer vorwärts. Es ist ein bisschen wie ein Zauberwürfel. Manchmal musst du mit einem Zauberwürfel mehr Chaos anrichten, bevor du es richtig machen kannst.*

Jocelyn Bell Burnell

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>7</b>
2.1	Pulmonale Hypertonie des Menschen .....	7
2.1.1	Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie .....	7
2.1.2	Epidemiologie und Prognose .....	10
2.1.3	Pathogenese .....	11
2.1.4	Pulmonale Hypertonie und linksventrikuläre Hypertrophie .....	13
2.1.5	Pulmonale Hypertonie und rechtsventrikuläre Hypertrophie .....	14
2.1.6	Klinik und Gruppeneinteilung .....	15
2.1.7	Therapie .....	16
2.2	Mausmodelle der pulmonalen Hypertonie .....	17
2.2.1	Chronische Hypoxieexposition .....	17
2.2.2	Sugen5416 und chronische Hypoxie .....	18
2.2.3	Monocrotalin .....	19
2.2.4	Wahl des Modells der chronischen Hypoxieexposition in der Maus .....	20
2.3	Transiente Rezeptor Potential Proteine .....	20
2.3.1	Die TRP Superfamilie .....	20
2.3.2	Die klassische TRP Subfamilie .....	22
2.3.3	Rolle von TRPC Kanälen bei PH .....	24
2.4	Ziel der vorliegenden Arbeit .....	24
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1	Material .....	26
3.1.1	Geräte und Software .....	26
3.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	29
3.1.3	Chemikalien .....	30
3.1.4	<i>Kits und Assays</i> .....	33
3.1.5	Antikörper für Western Blot .....	34
3.1.6	Antikörper für Immunhistochemie .....	34
3.1.7	Enzyme und Standards .....	35
3.1.8	Primer .....	35
3.1.9	Puffer und Lösungen .....	37
3.1.10	Medien .....	39
3.1.11	Medienzusammensetzung .....	40
3.1.12	Mauslinien .....	40
3.1.13	Versuchstiere .....	41
3.1.14	Tierversuchsgenehmigungen .....	41
3.2	Methoden .....	42
3.2.1	Mausmodell: Chronische Hypoxieexposition .....	42
3.2.2	Echokardiographie .....	43
3.2.3	Hämodynamische Messung .....	44
3.2.4	Messung des Hämatokriten .....	45
3.2.5	Präparation der Lunge .....	45
3.2.6	Ermittlung der Herzgewichte .....	46
3.2.7	Immunhistochemische Färbung .....	46

3.2.8	<i>Picro-Sirius Red</i> Färbung.....	49
3.2.9	Isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Lunge .....	50
3.2.10	Myographie von isolierten Blutgefäßen .....	51
3.2.11	Isolierung und Kultivierung muriner pulmonalarterieller glatter Muskelzellen.....	52
3.2.12	Proliferationsassay .....	53
3.2.13	Migrationsassay .....	54
3.2.14	Apoptoseassay .....	55
3.2.15	Calciummessungen.....	56
3.2.16	RNA Isolation .....	60
3.2.17	Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion.....	61
3.2.18	Relative Quantifizierung mittels Echtzeit PCR.....	61
3.2.19	Proteinextraktion .....	62
3.2.20	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	63
3.2.21	Trizin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	63
3.2.22	Western Blot .....	64
3.2.23	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> .....	65
3.2.24	Statistik .....	67
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>68</b>
4.1	Beschreibung der Linien TRPC WT und TRPC1/3/6 <sup>-/-</sup> .....	68
4.2	Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Entstehung einer chronischen Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie .....	69
4.2.1	Hämodynamische Messungen .....	69
4.2.2	Echokardiografische Messungen.....	71
4.2.3	Histologische Bestimmung des Muskularisierungsgrades der Lungengefäße .....	75
4.3	Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf PASMC nach chronischer Hypoxieexposition .....	76
4.3.1	Proliferation .....	76
4.3.2	Migration.....	77
4.3.3	Apoptose .....	78
4.3.4	Genexpression.....	79
4.3.5	Proteinexpression .....	81
4.4	Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den Ca <sup>2+</sup> -Haushalt von PASMC nach chronischer Hypoxieexposition .....	85
4.4.1	Untersuchung des Rezeptor-vermittelten Ca <sup>2+</sup> -Einstroms.....	86
4.4.2	Untersuchung des Speicher-vermittelten Ca <sup>2+</sup> -Einstroms .....	88
4.4.3	Untersuchung regulatorischer Kompensationen des Rezeptor- und Speicher-vermittelten Ca <sup>2+</sup> -Einstroms.....	90
4.5	Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf physiologische Eigenschaften (Phänotyp).....	94
4.5.1	Hämodynamische Messungen .....	94
4.5.2	Echokardiografische Messungen.....	96
4.5.3	Histologische Bestimmung des Kollagengehalts des rechten und linken Ventrikels sowie der Lunge .....	98
4.5.4	Untersuchungen der Kontraktilität von Pulmonalarterie und Aorta .....	100
4.5.5	Genexpression.....	101
4.5.6	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> .....	105
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>107</b>
5.1	Wahl von TRPC1, 3 und 6 als Kandidat für die Entstehung von CHPH.....	107
5.2	Verwendete Modelle.....	109

## Inhaltsverzeichnis

---

5.2.1	Wahl des Tiermodells.....	109
5.2.2	Wahl des Zellkulturmodells.....	111
5.3	Bedeutung von TRPC1, 3 und 6 für die Entstehung einer CHPH.....	112
5.3.1	TRPC1, 3 und 6 <i>in vivo</i> .....	112
5.3.2	TRPC1, 3 und 6 <i>in vitro</i> .....	114
5.4	Einfluss des globalen Knockouts von TRPC1, 3 und 6 auf die Physiologie der Maus.....	123
5.4.1	Entstehung von rechts- und linksventrikulärer Hypertrophie.....	123
5.4.2	Einfluss auf den Kollagenhaushalt.....	127
5.5	Resümee und Ausblick.....	129
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>135</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>153</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>155</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>156</b>
<b>12</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>157</b>
12.1	Isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Lunge.....	157
12.2	Veröffentlichungen.....	158
12.3	Kongressbeiträge.....	158
12.4	Förderung.....	159
<b>13</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>160</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta
%	Prozent
°C	Grad Celsius
α-SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym ( <i>angiotensin-converting enzyme</i> )
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 ( <i>angiotensin-converting enzyme 2</i> )
AGT	Angiotensinogen
AM	Acetoxymethylester
Ang(1-7)	Angiotensin (1-7)
AngI	Angiotensin I
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
AT1R	Angiotensin-Rezeptor 1
B <sub>2</sub> M	β <sub>2</sub> -Mikroglobulin
BMPR2	Knochenmorphogenetischer Proteinrezeptor Typ 2 ( <i>bone morphogenetic protein receptor type 2</i> )
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub>	Extrazelluläre Calciumkonzentration
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Calciumkonzentration
CamKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin abhängige Proteinkinase II
CAV-1	Caveolin-1
cc	<i>coiled-coil domain</i>
cDNA	Komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat

## Abkürzungsverzeichnis

---

CHE	Chronische Hypoxieexposition
CHPH	Chronische Hypoxie induzierte pulmonale Hypertonie
CIRB	Calmodulin- und Inositoltriphosphat-Rezeptorbindungsdomäne
cm	Zentimeter ( <i>centimetre</i> )
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CPA	Cyklopiazonsäure ( <i>cyclopiazonic acid</i> )
CO	Herzminutenvolumen ( <i>cardiac output</i> )
Ct	<i>cycle treshold</i>
DAG	Diacylglycerol
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DPBS	Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>dulbecco's phosphat buffered saline</i> )
EdU	5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin
EF	Auswurfraction ( <i>ejection fraction</i> )
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET-1	Endothelin-1
FBS	Fetales bovines Serum
g	Erdbeschleunigung
gr	Gramm
G	Gauge
h	Stunden ( <i>hour</i> )
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HR	Hepes-Ringer-Lösung
I. E.	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> -Rezeptor

## Abkürzungsverzeichnis

---

IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
IVC	<i>individually ventilated cage</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
LHD	Linksherzerkrankung ( <i>left heart disease</i> )
LV	Linker Ventrikel
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
LVID	Linksventrikulärer Innendurchmesser ( <i>left ventricular internal diameter</i> )
LVSP	Linksventrikulärer systolischer Druck ( <i>left ventricular systolic pressure</i> )
LVWT	Linksventrikuläre Wandstärke ( <i>left ventricular wall thickness</i> )
M	Molar
mA	Milliampere
MasR	<i>mitochondrial assembly receptor</i>
MCT	Monocrotalin
MCTP	Monocrotalinpyrrol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHC	Myosin schwere Kette ( <i>myosin heavy chain</i> )
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
µM	Mikromolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mN	Millinewton
mPAP	Mittlerer pulmonalarterieller Druck ( <i>mean pulmonary artery pressure</i> )

## Abkürzungsverzeichnis

---

MW	Mittelwert
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ionen
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
Orai	<i>calcium release-activated calcium channel protein</i>
p-CamKII	Phosphorylierte CamKII
p-IP <sub>3</sub> R	Phosphorylierter IP <sub>3</sub> R
p-p38	Phosphoryliertes p38
PA	Pulmonalarterie
PAAT	Pulmonalarterielle Akzelerationszeit ( <i>pulmonary artery acceleration time</i> )
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	Pulmonalarterieller Druck ( <i>pulmonary artery pressure</i> )
PASMC	Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen ( <i>murine pulmonary arterial smooth muscle cells</i> )
PAWP	Pulmonalarterieller Verschlussdruck ( <i>pulmonary artery wedge pressure</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphat buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDE-5	Phosphodiesterase 5
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PH	Pulmonale Hypertonie
pg	Pikogramm
PLC	Phospholipase C
PLN	Phospholamban

## Abkürzungsverzeichnis

---

PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Pulmonalvenöser Druck ( <i>pulmonary venous pressure</i> )
PVR	Pulmonaler Gefäßwiderstand ( <i>pulmonary vascular resistance</i> )
PVR <sub>Recho</sub>	Echokardiografisch bestimmter PVR
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROC	Rezeptoraktivierter Kanal ( <i>receptor operated channel</i> )
ROCE	Rezeptor-vermittelter Ca <sup>2+</sup> -Einstrom ( <i>receptor operated calcium entry</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RTqPCR	Semi-quantitative Echtzeit PCR ( <i>real-time semi-quantitative PCR</i> )
RV	Rechter Ventrikel
RVET	Rechtsventrikuläre Ejektionsdauer ( <i>right ventricular ejection time</i> )
RVH	Rechtsventrikuläre Hypertrophie
RVID	Rechtsventrikulärer Innendurchmesser ( <i>right ventricular internal diameter</i> )
RVSP	Rechtsventrikulärer systolischer Druck ( <i>right ventricular systolic pressure</i> )
RVWT	Rechtsventrikuläre Wandstärke ( <i>right ventricular wall thickness</i> )
Ryr	Ryanodinrezeptor
s	Sekunden
S	Septum
SAP	Systemischer arterieller Druck ( <i>systemic arterial pressure</i> )
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SERCA	Calcium-ATPase des SR
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
sGC	Lösliche Guanylatzyklase ( <i>soluble guanylate cyclase</i> )
SMC	Glatte Muskelzellen ( <i>smooth muscle cells</i> )
SOC	Speicheraktivierter Kanal ( <i>store operated channel</i> )
SOCE	Speicher-vermittelter Ca <sup>2+</sup> -Einstrom ( <i>store operated calcium entry</i> )
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

## Abkürzungsverzeichnis

---

Stim	Stromales Interaktionsmolekül
Su5416	Sugen5416
TAPSE	<i>tricuspid annular plane systolic excursion</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
TRP	Transient Rezeptor Potential
TRPA	Ankyrin TRP
TRPC	Klassischer TRP ( <i>classical TRP</i> )
TRPM	Melastatin TRP
TRPML	Mucolipin TRP
TRPN	<i>no mechanoreceptor potential C TRP</i>
TRPP	Polycystin TRP
TRPV	Vanilloid TRP
U	Einheit ( <i>unit</i> )
VEGF	Vaskulärer Endothelwachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VEGFR2	Vaskulärer Endothelwachstumsfaktor Rezeptor 2 ( <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i> )
V	Volt
vWF	von-Willebrand-Faktor
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
WT	Wildtyp
WU	Wood Einheiten ( <i>wood units</i> )

## 2 Einleitung

### 2.1 Pulmonale Hypertonie des Menschen

#### 2.1.1 Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie

Als pulmonale Hypertonie (PH) werden Erkrankungen bezeichnet, die mit einer Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (*mean pulmonary artery pressure*, mPAP) einhergehen (Galiè 2015; Simonneau 2019). Bis vor kurzem wurde eine Erhöhung des mPAP auf  $\geq 25$  mmHg im Ruhezustand als PH definiert (Galiè 2015). Jedoch wird neuerdings der Vorschlag des *6th World Symposium on Pulmonary Hypertension*, dass bereits ein mPAP  $> 20$  mmHg auf PH schließen lässt, bei der Diagnostik von PH angewendet. Der Goldstandard für die Messung des mPAP und für die Diagnosestellung ist die Rechtsherzkatheterisierung (Simonneau 2019).

Pulmonale Hypertonie kann mithilfe des pulmonalarteriellen Verschlussdrucks (*pulmonary artery wedge pressure*, PAWP) und des pulmonalen vaskulären Widerstands (*pulmonary vascular resistance*, PVR) in prä- und postkapilläre PH unterteilt werden. Bei der Messung des PAWP wird mittels eines Ballonkatheters ein Ast der *Arteria pulmonalis* vorübergehend verschlossen und der Druck distal des geblockten Ballons gemessen. Der PAWP ist ein Maß für den bestehenden Druck im linken Vorhof und damit der Druckbelastung des linken Ventrikels (LV). Der pulmonale vaskuläre Widerstand beschreibt den Gesamtwiderstand der Lungengefäße gegen den strömenden Blutfluss und wird in Wood-Einheiten (*wood units*, WU) angegeben (Galiè 2015; Hoeper 2013; Simonneau 2019; Vachiéry 2019). Bei einem PAWP von  $> 15$  mmHg und einem mPAP von  $> 20$  mmHg spricht man von einer postkapillären PH, deren weitere Unterteilung mithilfe des PVR erfolgt. So wird ein PVR  $< 3$  WU als isolierte, postkapilläre PH, ein PVR  $\geq 3$  WU als kombinierte prä- und postkapilläre PH definiert. Im Gegensatz dazu spricht man bei Vorliegen eines PAWP  $\leq 15$  mmHg, eines mPAP  $> 20$  mmHg sowie eines PVR  $\geq 3$  WU von einer präkapillären PH (Simonneau 2019).

Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) klassifiziert die PH anhand von ätiologischen und pathophysiologischen Kriterien in fünf Kategorien (*6th World*

*Symposium on Pulmonary Hypertension*) (**Simonneau** 2019) (**Tabelle 2.1.1**). Eine PH der Gruppe 1, 3 und 4 kann der präkapillären, eine PH der Gruppe 2 der postkapillären PH zugeteilt werden. Bei einer PH der Gruppe 2 kann es aufgrund von Linksherzerkrankungen (*left heart disease*, LHD) und einem erhöhten linksventrikulären Druck sekundär zu einem erhöhten PVR kommen, sodass eine kombinierte prä- und postkapilläre PH vorliegt (**Simonneau** 2019). Eine PH der Gruppe 5 kann - abhängig von der Grunderkrankung - sowohl als postkapilläre als auch als präkapilläre PH vorliegen (**Galiè** 2015; **Simonneau** 2019).

**Tabelle 2.1.1: Klinische Klassifikation der PH nach 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension** (verändert nach **Simonneau** 2019)

- 1 Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
  - 1.1 Idiopathische PAH
  - 1.2 Hereditäre PAH
  - 1.3 Medikamenten-/Toxininduziert
  - 1.4 Assoziiert mit
    - 1.4.1 Kollagenosen (Bindegewbserkrankungen)
    - 1.4.2 HIV-Infektion
    - 1.4.3 Portaler Hypertonie
    - 1.4.4 Kongenitaler Herzerkrankung
    - 1.4.5 Schistosomiasis
  - 1.5 PAH mit effektiver Langzeittherapie mit Calciumkanalblockern
  - 1.6 Pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose
  - 1.7 Persistierende pulmonale Hypertonie (PH) des Neugeborenen
- 2 PH bei Linksherzerkrankung
  - 2.1 PH nach Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Auswurfraction
  - 2.2 PH nach Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Auswurfraction
  - 2.3 Herzklappenerkrankungen
  - 2.4 Kongenitale/Erworbene kardiovaskuläre Erkrankungen
- 3 PH bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
  - 3.1 Obstruktive Lungenerkrankungen
  - 3.2 Restriktive Lungenerkrankungen
  - 3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiven und obstruktiven Mustern
  - 3.4 Hypoxie ohne Lungenerkrankungen
  - 3.5 Pulmonale Entwicklungsstörungen
- 4 PH bei pulmonalarteriellen Obstruktionen
  - 4.1 Chronische thromboembolische PH
  - 4.2 andere pulmonalarterielle Obstruktionen
- 5 PH mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen
  - 5.1 Hämatologische Erkrankungen
  - 5.2 Systemische und metabolische Erkrankungen
  - 5.3 Andere
  - 5.4 Komplexe kongenitale Herzerkrankungen

Die Gruppe 1 der WHO-Klassifikation umfasst Patienten mit präkapillärer pulmonalerarterieller Hypertonie (PAH). Diese werden weiter unterteilt in idiopathische (IPAH), hereditäre, medikamenten- bzw. toxininduzierte oder mit anderen Erkrankungen assoziierte PH (**Simonneau** 2019). Die Diagnosestellung der IPAH erfolgt, wenn keine familiären Vorerkrankungen oder Risikofaktoren identifiziert werden können (**Schermuly** 2011). Bei 82% der Patienten mit hereditärer PH liegt eine Mutation im Knochenmorphogenetischen Proteinrezeptor Typ II (*bone morphogenetic protein receptor type 2*, BMPR2) Gen zugrunde (**Evans** 2016). Zu den PAH-auslösenden Medikamenten und Toxinen zählen Appetitzügler, wie Aminorex und Fenfluramin, Chemotherapeutika, wie Dasatinib und Interferon  $\alpha$ , und Rauschmittel, wie Kokain und Amphetamine (**Montani** 2013).

Eine pulmonale Hypertonie aufgrund von Erkrankungen des linken Herzens wird von der WHO in Gruppe 2 der PH-Erkrankungen eingeordnet. Der dabei auftretende erhöhte linksventrikuläre Druck führt zu einer erhöhten Nachlast und resultiert in einer Verdickung der pulmonalen Venen, dilatierten Lungenkapillaren und einem interstitiellen Ödem. Eine PH tritt hier sekundär mit Erhöhung des mPAP auf  $\geq 25$  mmHg auf (**Galiè** 2009; **Thomas** 2020).

Die Gruppe 3 umfasst alle Patienten, bei denen PH in Zusammenhang mit Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie vorliegt (**Simonneau** 2013). Beispiele für Lungenerkrankungen, die mit PH assoziiert sind, sind interstitielle Lungenerkrankungen, wie idiopathische interstitielle Pneumonien und Sarkoidose, chronisch obstruktive pulmonale Erkrankungen, das Syndrom der kombinierten Fibrose und des Emphysems sowie - in selteneren Fällen - das Schlafapnoesyndrom (**Galiè** 2009; **Thomas** 2020). Obwohl viele Faktoren eine Erhöhung des PVR verursachen können, ist diese meist mit alveolärer Hypoxie verbunden (**Chaouat** 2005). Tritt eine PH in Zusammenhang mit Lungenerkrankungen auf, kommt es zu einer Verschlechterung der bereits reduzierten Leistungsfähigkeit der Lunge, einer Verstärkung der Hypoxämie und einer reduzierten Überlebensrate (**Galiè** 2009; **Seeger** 2013; **Thomas** 2020). Auch ein andauernder Aufenthalt in großen Höhen, der mit globaler alveolärer Hypoxie einhergeht, resultiert in der Entstehung von PH (**Simonneau** 2009). Etwa 140 Millionen Menschen leben in über 2500 m Höhe über dem Meeresspiegel, sind permanent chronischer Hypoxie ausgesetzt und haben ein hohes Risiko an chronischer Hypoxie induzierter PH (CHPH) zu erkranken (**Herrera** 2010). Meist tritt in diesen Fällen nur eine milde Form der PH auf. Liegt dennoch eine schwere PH in Zusammenhang mit

Lungenerkrankungen vor ( $mPAP \geq 35$  mmHg), sollte nach weiteren Ursachen für PH gesucht werden (**Chaouat** 2005; **Thomas** 2020).

In Gruppe 4 der WHO-Klassifikation werden PH Patienten mit chronischen Thromboembolien zusammengefasst (**Simonneau** 2013). Durch Störung der Homöostase oder Fibrinolyse kommt es zur Bildung von intraluminalen Thromben oder Emboli, die zur vaskulären Okklusion pulmonaler Arterien führen. Die daraus resultierende Erhöhung des PAP hat einen Anstieg der Scherkräfte in den noch durchbluteten pulmonalen Arterien zur Folge, was zu einem Gefäßumbau (vaskuläres Remodelling) führt. Risikofaktoren für diese Erkrankung sind unter anderem chronische Entzündungen, Splenektomie und Schilddrüsenerkrankungen (**Dartevelle** 2004; **Hoeper** 2006; **Piazza** 2011).

Die Gruppe 5 beinhaltet PH mit unklaren Ursachen und multifaktoriellen Mechanismen. Dazu zählen unter anderem hämatologische, systemische und metabolische Erkrankungen (**Simonneau** 2013).

### 2.1.2 Epidemiologie und Prognose

Weltweit sind bis zu 100 Millionen Menschen an PH erkrankt, wobei ein Anstieg der Prävalenz zu beobachten ist (**Galiè** 2015; **Schermuly** 2011; **Wijeratne** 2018). Diese beträgt derzeit etwa 1% der gesamten Weltpopulation und wird in der Gruppe der über 65-Jährigen auf ca. 10% geschätzt (**Hoeper** 2017). Dabei sind Frauen mit einem Verhältnis von 1,8 häufiger betroffen als Männer (**Galiè** 2015). Die Mortalitätsrate bei PH Patienten beträgt nach einem Jahr 35,9% und nach fünf Jahren 61,5% (**Wijeratne** 2018).

Pulmonalarterielle Hypertonie ist eine seltene Form der PH mit einer Prävalenz zwischen 15 und 60 Fällen pro eine Million Einwohner in Europa. Etwa die Hälfte der PAH Patienten sind von idiopathischer, hereditärer oder medizin- bzw. toxininduzierter PAH betroffen (**Galiè** 2015). Mithilfe neu entwickelter Therapien konnte die 3-Jahres-Überlebensrate von Patienten der Gruppe 1 von etwa 40% in den 1980er Jahren auf 80% verbessert werden (**Hoeper** 2008). Die Gruppen 2 und 3 sind - mit einem Anteil von jeweils 48% aller PH Erkrankten - die beiden häufigsten Formen der PH in Europa (**Hoeper** 2016). Bei Patienten der Gruppe 3 ist die PH häufig milde ausgeprägt und schwerere Verläufe sind nur selten zu beobachten (**Hurdmann**

2013; **Galiè** 2015). Mit einer Prävalenz von 3,2 Fällen pro eine Million Einwohner ist die PH der Gruppe 4 die am seltensten auftretende Form (**Galiè** 2015).

### 2.1.3 Pathogenese

Als PH werden Erkrankungen mit unterschiedlichen pathophysiologischen Kriterien und multifaktoriellen Ursachen zusammengefasst. Daher gibt es eine große Anzahl an pathogenetischen Abläufen, die zur Entstehung von PH beitragen. Jedoch existieren aber auch pathogenetische Merkmale, wie z.B. das vaskuläre Remodelling, die allen Formen der PH, unabhängig ihrer Ätiologie, zugrunde liegen (**Pietra** 2004). In Abhängigkeit von dem Ziel dieser Arbeit wird im Folgenden ausschließlich auf das vaskuläre Remodelling eingegangen.

Äußere Einflüsse, wie z.B. Hypoxie, führen in den nicht ventilierten Lungenarealen zu einer akuten, reversiblen Vasokonstriktion der Gefäße. Dieser Mechanismus dient, bei vorliegen partieller alveolärer Hypoxie, dazu, eine Durchblutung von gut ventilerten Lungenarealen zu gewährleisten und wird als Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnet. Halten diese äußeren Einflüsse an, kommt es zum Umbau der Gefäßwand, was zur Entstehung der PH führt (**Grimminger** 2017; **Malczyk** 2013; **Sommer** 2016). Als vaskuläres Remodelling wird sowohl die Verdickung der Gefäßwand als auch die daraus resultierende Reduktion des Gefäßlumens bezeichnet. Diese Veränderungen können in allen drei Gefäßschichten stattfinden: der *Tunica intima*, der *Tunica media* und der *Tunica adventita* (**Pietra** 2004; **Stenmark** 2009). Dabei sind die einzelnen Gefäßschichten je nach Form der PH unterschiedlich stark am Remodelling beteiligt. Während das Remodelling der *Tunica intima* in der PAH eine entscheidende Rolle spielt, sind bei der CHPH die Veränderung von *Tunica media* und *Tunica adventita* ausschlaggebend (**Stenmark** 2005; **Tuder** 2007). Es kommt 1) zu einer Zunahme der Muskularisierung, 2) zu einer Muskularisierung von zuvor nicht muskularisierten kleinen pulmonalen Arterien und 3) zu einer reduzierten Anzahl dieser Arterien (**Rabinovitch** 1979).

Die Endothelzellen der *Tunica intima* weisen unter dem Einfluss von chronischer Hypoxie keine vermehrte Proliferation auf, nehmen aber über Botenstoffe Einfluss auf die glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) der *Tunica media* und beeinflussen so das Proliferations- und Apoptoseverhalten dieser Zellen (**Malczyk** 2016; **Voelkel und Tuder** 2000).

Die anhaltende Vasokonstriktion spielt bei der Freisetzung von Botenstoffen eine entscheidende Rolle. Sie führt zu einer Dysfunktion der Endothelzellen, die in einer reduzierten Produktion von Vasodilatoren, wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin, sowie einer erhöhten Produktion von Vasokonstriktoren, wie Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) und Endothelin-1 (ET-1), resultiert. Folglich nimmt der Gefäßtonus zu und das vaskuläre Remodelling der *Tunica media* wird induziert (Galiè 2004).

Eine Besonderheit des vaskulären Remodellings der *Tunica intima* stellen die sogenannten plexiformen Läsionen, wie sie bei PAH Patienten vorkommen können, dar. Dabei verursachen fokale proliferierende Endothelzellen zusammen mit Myofibroblasten Läsionen des Endothels, die zu einer Obliteration des Gefäßlumens führen (Humbert 2004). Proximal dieser Obliteration können zudem konzentrische Läsionen beobachtet werden, die aus dem Umbau plexiformer Läsionen hervorgehen und charakteristisch für das Vorliegen einer schweren Form der PAH sind. Zudem ist bekannt, dass auch SMC solche konzentrischen Läsionen bilden können. Allerdings herrscht Unklarheit über die gemeinsamen Progenitorzellen dieser Läsionen, da Endothelzellen unter Einfluss des *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder des Transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) zu SMC differenzieren können (Tuder 2007; Frid 2002).

Das Remodelling der *Tunica media*, an dem insbesondere SMC maßgeblich beteiligt sind, ist von großer Bedeutung für die Entstehung von CHPH. Durch die Bildung von apoptoseresistenten SMC und die Transformation der SMC vom kontraktile zum proliferierenden Phänotyp, kommt es zur pathologischen Muskularisierung kleiner pulmonaler Arterien (Fernandez 2015; Schermuly 2011; Stenmark 2018). Zusätzlich führt ein gesteigertes Migrationsverhalten der SMC zur Muskularisierung von zuvor nicht muskularisierten Gefäßen (Stenmark 2018).

An diesen Veränderungen sind unter anderem vom Endothel sezernierte, vasoaktive Substanzen beteiligt. Zu diesen endothelialen Botenstoffen gehören PDGF, TGF- $\beta$ , Serotonin (5-Hydroxytryptamin) und der vaskuläre Endothelwachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) (Farber 2004; Schermuly 2011).

Die *Tunica adventitia* der Lungengefäße besteht aus heterogenen Fibroblasten und nimmt über die Sekretion von Botenstoffen Einfluss auf die *Tunica media* und *Tunica intima*

(Stenmark 2006). Veränderungen, die mit dem vaskulären Remodelling einhergehen, finden sich zuerst in der *Tunica adventita*. Erst danach sind sie auch in der *Tunica media* und *Tunica intima* zu beobachten. Proliferierende Fibroblasten können zu SMC differenzieren und in die *Tunica media* integrieren, die Proliferation von SMC über die Sekretion von Wachstumsfaktoren induzieren und Entzündungszellen und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark rekrutieren. Weiterhin trägt die vermehrte Synthese und Einlagerung von Kollagenfasern zur Dickenzunahme der *Tunica adventita* bei (Humbert 2004; Stenmark 2006; Tudor 2007).

#### 2.1.4 Pulmonale Hypertonie und linksventrikuläre Hypertrophie

Pulmonale Hypertonie in Zusammenhang mit LHD wird laut WHO-Klassifikation in eine systolische oder diastolische Dysfunktion des linken Herzens sowie in Mitralklappenerkrankung eingeteilt (Simonneau 2013; Shin 2010). Erstere können zudem anhand der Auswurffraktion (*ejection fraction*, EF) in Herzinsuffizienz mit reduzierter EF (repräsentiert dabei Erkrankungen mit systolischer Dysfunktion, wie ischämische und dilatative Kardiomyopathie) oder Herzinsuffizienz mit erhaltener EF (Erkrankungen mit diastolischer Dysfunktion, wie hypertrophe Kardiomyopathie und koronare Herzerkrankung) gegliedert werden (Guazzi 2012a; Fang 2012). Dabei ist die Prognose für LHD Patienten mit PH als deutlich schlechter zu bewerten als für LHD Patienten ohne PH (Bursi 2012).

Pathophysiologisch kommt es durch die LHD zunächst zu einer Zunahme des Fülldrucks im linken Vorhof und/oder im LV und, daraus resultierend, zu einem Anstieg des pulmonalvenösen Drucks (*pulmonary venous pressure*, PVP) (Vachiéry 2019). Dies führt zur Zerstörung alveolärer Kapillaren und einem akuten alveolären Ödem (West 1995). Bleibt ein erhöhter PVP bestehen, kommt es zum Remodelling der Kapillarmembranen, das durch Einlagerung von Typ IV Kollagen, einem erschwerten Gasaustausch und einer damit verbundenen verminderten Lungendiffusionskapazität charakterisiert ist (Guazzi 2012a). Darüber hinaus kommt es zum Gefäßumbau pulmonaler Venen und Arterien, mit Hypertrophie der *Tunica media* sowie der Bildung einer Neointima der distalen Pulmonalarterien, was den PVR weiter ansteigen lässt (Rich 2008). Die Aktivierung endogener vaskulärer Serinelastasen und Matrix-Metalloproteinasen führt zur Zerstörung elastischer

Laminae, zum Wachstum und zur Migration glatter Gefäßmuskelzellen und zur Synthese von Kollagen und Elastin (**Guazzi** 2012). In Abhängigkeit von Dauer und Schwere der LHD kann zudem eine gesteigerte Vasokonstriktion pulmonaler Arterien vorliegen. Hierbei kommt es aufgrund von Schäden des Endothels zu einer endothelialen Dysfunktion und Imbalance der vasoaktiven Substanzen NO und ET-1, welche die Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen beeinträchtigt. Jedoch ist im Vergleich zu anderen Formen der PH das vaskuläre Remodelling bei LHD-PH meist geringer ausgeprägt (**Fang** 2012).

Diese pathophysiologischen Veränderungen führen schließlich zu einem Anstieg des PAP und des rechtsventrikulären systolischen Drucks (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) sowie zu einer erhöhten Nachlast des rechten Ventrikels (RV) mit nachfolgender rechtsventrikulärer Hypertrophie (RVH). Bleibt dies unbehandelt, kommt es letztendlich zu einer Insuffizienz des RV, die mit einem Anstieg des rechtsatrialen Drucks, einer systemischen venösen Stauung, einer Aszites und einer renalen Dysfunktion einhergeht (**Guazzi** 2012; **Guazzi** 2012a).

### **2.1.5 Pulmonale Hypertonie und rechtsventrikuläre Hypertrophie**

Im Unterschied zum LV besitzt der RV ein weniger stark ausgebildetes Myokard mit einer Wanddicke von ca. 3 bis 4 mm. In der dünnwandigen und sichelförmigen Anatomie des RV liegt die bessere Anpassungsfähigkeit des RV auf Veränderungen der Volumenladung begründet (**Vonk Noordegraf** 2011). Aufgrund des physiologisch geringen Widerstands des Lungenkreislaufs beträgt der Arbeitsaufwand bei gleichem Schlagvolumen lediglich 25% des Arbeitsvolumens des LV (**Han** 2007).

Ein Anstieg der rechtsventrikulären Nachlast und des PVR führt zunächst zu einer gesteigerten systolischen Kontraktilität mit einem Anstieg des RVSP und konzentrischem Remodelling des RV bei unverändertem rechtsatrialen Druck. Bleiben die erhöhten Druckverhältnisse und die damit einhergehenden Dehnungskräfte bestehen, kommt es zu einer adaptiven Hypertrophie des RV. Dabei nimmt die Proteinsynthese in den Kardiomyozyten bei ausbleibender Replikation zu und die Anzahl der Sarkomere steigt. Neben dem Einfluss von Dehnungskräften führen auch Noradrenalin, ET-1, Angiotensin II und inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-1b zur Hypertrophie von Kardiomyozyten (**Haworth** 2007). Zudem zeigen sich

Veränderungen des Zytoskeletts, darunter Fibrosierung von oder Bildung abnormaler T-Tubuli (**Vonk Noordegraf** 2019).

Die mit der Hypertrophie einhergehende Ausdehnung des RV wird durch das Perikard begrenzt. Sie führt dazu, dass sich die Kontraktion des RV zeitlich verlängert und sich das Septum (S) in Richtung des LV verlagert. Diese Verlagerung wiederum bedingt eine Reduktion des linksventrikulären Volumens (**Haworth** 2007; **Vonk Noordegraf** 2011). Wird die Anpassungsfähigkeit des RV überschritten, resultiert dies in einer Dilatation mit abnehmender Kontraktilität und erhöhtem Füllvolumen. Dabei spielt die erhöhte Wandspannung, die zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf, zum anderen zu einer reduzierten Perfusion der rechtsventrikulären Koronargefäße und somit zu einer Dysbalance der Sauerstoffversorgung führt, eine wichtige Rolle. Übersteigt die Nachlast des RV die aufgebrachte Kraft des rechtsventrikulären Myokards kommt es zum sogenannten *right ventricular arterial uncoupling*. Dies gipfelt in einer Ischämie sowie einer systolischen und diastolischen Dysfunktion des RV (**Han** 2007; **Ryan** 2014; **van Wolferen** 2008; **Vonk Noordegraf** 2011).

Die Funktion des RV beeinflusst entscheidend die Überlebensdauer der an PH erkrankten Patienten. Von Interesse hierbei ist, dass Patienten mit einer Mutation im *BMPR2* Gen häufiger eine schwere Form des Rechtsherzversagens mit erhöhter Lipidtoxizität des RV aufweisen (**Brittain** 2016).

### 2.1.6 Klinik und Gruppeneinteilung

Die Symptome der PH sind weitestgehend unspezifisch, sodass die Zeit zwischen dem Auftreten erster Symptome und der Diagnosestellung im Durchschnitt 2 Jahre beträgt. Etwa 60% der PH Patienten weisen eine Belastungsdyspnoe auf, während 19% von Fatigue und 13% von Synkopen betroffen sind. Weitere Symptome können *Angina pectoris*, Tachykardien und das Auftreten von Ödemen sein (**Schannwell** 2007; **Shin** 2010). Im finalen Stadium der PH kommt es zu einer rechtsventrikulären Dysfunktion, gefolgt von Rechtsherzinsuffizienz und Tod der Patienten (**Galiè** 2015; **Stenmark** 2009).

Die WHO definiert vier Schweregrade (funktionelle Klassen) der PH (**Tabelle 2.1.2**). Patienten der funktionellen Klasse I zeigen keine Symptome unter physischer Belastung. Patienten der funktionellen Klasse II sind im Ruhezustand symptomfrei, entwickeln aber leichte Symptome

unter mittlerer physischer Belastung. Während Symptome bei Patienten der funktionellen Klasse III schon bei leichter physischer Belastung auftreten, zeigen Patienten der funktionellen Klasse IV Symptome im Ruhezustand, starke Beschwerden bei jeglicher physischen Aktivität und Anzeichen von rechtsventrikulärer Dysfunktion. Der Schweregrad der PH ist ein entscheidender Faktor für die Überlebensrate der Erkrankten (**Vachiéry 2010**).

**Tabelle 2.1.2: WHO Funktionelle Klassifikation der PH** Einteilung nach Schweregrad (**Vachiéry 2010**).

Funktionelle Klasse	Schweregrad
WHO Funktionelle Klasse 1	Keine Symptomatik bei physischer Belastung und im Ruhezustand Keine Belastungseinschränkung
WHO Funktionelle Klasse 2	Symptomatik bei normaler physischer Belastung, symptomfrei im Ruhezustand Geringe Belastungseinschränkung
WHO Funktionelle Klasse 3	Symptomatik bei leichter physischer Belastung, symptomfrei im Ruhezustand Deutliche Belastungseinschränkung
WHO Funktionelle Klasse 4	Symptomatik im Ruhezustand, Anzeichen von Rechtssherzinsuffizienz Vollständige Belastungseinschränkung

### 2.1.7 Therapie

Bei der Behandlung von PH finden insbesondere Vasodilatoren wie Prostacycline (z. B. Epoprostenol, Iloprost), Phosphodiesterase-5 (PDE-5)-Inhibitoren (z. B. Sildenafil), Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase (*soluble guanylate cyclase*, sGC) (z. B. Riociguat) und Endothelin-Rezeptor Antagonisten (z. B. Ambrisentan, Bosentan) Anwendung, wodurch eine Verbesserung der Überlebensrate, der Symptome und der Belastbarkeit in klinischen Studien erzielt wurde (**Fukumoto 2011; Galiè 2015**). Prostacycline werden physiologisch im Endothel produziert und wirken vasodilatativ, antithrombotisch, antiproliferativ und antiinflammatorisch (**Gomberg-Maitland 2008**). Die vasodilatatorischen Effekte von PDE-5-Inhibitoren begründen sich auf einer Hemmung des Abbaus von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Interessanterweise konnte für den PDE-5-Inhibitor Sildenafil zusätzlich eine antiproliferative Wirkung gezeigt werden (**Li 2007**). Ebenfalls

antiproliferativ wirkt das Medikament Riociguat - ein sGC-Stimulator - indem es die Bildung von cGMP in glatten Gefäßmuskelzellen erhöht. So zeigten PAH Patienten in einer klinischen Studie unter Riociguat-Gabe eine Verbesserung der Symptomatik und eine erhöhte Belastbarkeit (**Ghofrani** 2013).

Liegt eine PH der Gruppe 3 vor, wird - zusätzlich zur Therapie der zugrundeliegenden Lungenerkrankung - Sauerstoff (O<sub>2</sub>) verabreicht. Vasodilatoren sind zur Behandlung von Gruppe 3 PH Patienten weniger geeignet, da sie zu einer Verschlechterung des Gasaustausches führen (**Galiè** 2015; **Seeger** 2013).

## 2.2 Mausmodelle der pulmonalen Hypertonie

Zur Untersuchung der humanen PH wird in der Forschung auf Tiermodelle zurückgegriffen, die aufgrund des komplexen humanen Krankheitsbildes nur Aspekte der Erkrankung widerspiegeln können (**Lawrie** 2014).

### 2.2.1 Chronische Hypoxieexposition

Die chronische Hypoxieexposition ist eines der am häufigsten verwendeten Modelle der PH (**Lawrie** 2014) und wird seit vielen Jahren zur Erforschung dieser Erkrankung eingesetzt (**Naeye** 1967; **Hunter** 1974). Es handelt sich dabei um ein vorhersehbares und gut reproduzierbares Tiermodell, für das überwiegend Ratten und Mäuse verwendet werden (**Stenmark** 2009).

Die chronische Hypoxieexposition kann unter normobaren (760 mmHg) und hypobaren (380 bis 400 mmHg) Bedingungen erfolgen (**Pak** 2010; **Maarman** 2013). In beiden Fällen wird eine vergleichbare, milde Form der PH bei Mäusen induziert. Resultierende strukturelle pulmonale Veränderungen sind eine Muskularisierung von kleinen, zuvor nicht muskularisierten Pulmonalarterien und eine Zunahme der Wanddicke von muskularisierten präkapillären Pulmonalarterien (**Pak** 2010; **Stenmark** 2009). Neben dem Einfluss auf die *Tunica media* kann auch eine Veränderung der *Tunica adventita* beobachtet werden. Die Rekrutierung und Proliferation von Fibroblasten führt auch hier zu einer Zunahme der Wanddicke. Zudem kommt es zu einer Infiltration von Entzündungszellen (**Colvin** 2014; **Stenmark** 2009). Das vaskuläre Remodelling ist bei Mäusen nur gering ausgeprägt und unter normoxischen

Bedingungen vollständig reversibel. Zwar kommt es zu einem Anstieg des PAP und zur Entstehung einer RVH, allerdings tritt eine Rechtsherzinsuffizienz nur selten auf (**Stenmark 2009**).

Eine Schädigung des Endothels und die Bildung einer Neointima, die aus apoptoseresistenten Endothelzellen und plexiformen Läsionen besteht, werden durch die chronische Hypoxieexposition nicht verursacht (**Voelkel und Tudor 2000**). Chronische Hypoxieexposition imitiert den physiologischen Stimulus der klinischen Gruppe 3 der PH und ist mit den Symptomen der funktionellen Klasse I bis II nach WHO Klassifikation vergleichbar (**Pak 2010**).

### **2.2.2 Sugen5416 und chronische Hypoxie**

Die Gabe des VEGF Antagonisten Sugen5416 (Su5416) zusammen mit chronisch hypoxischer Exposition ist ein häufig genutztes Modell zum Imitieren von PH in der Grundlagen- und präklinischen Forschung (**Lawrie 2014**).

Der Endothelwachstumsfaktor nimmt über Bindung an den VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) Einfluss auf die Differenzierung und Funktion von Endothelzellen sowie die Angiogenese. Nach Gabe von Su5416 kommt es zur Apoptose von Endothelzellen, die durch apoptoseresistente Endothelzellen ersetzt werden und unter Einfluss von Hypoxie stark proliferieren. Die dadurch entstehenden plexiformen Läsionen des Endothels führen zu Lumenobliteration mittlerer und präkapillärer pulmonaler Arterien (**Pak 2010**).

Nach erfolgreicher Etablierung dieses Modells für die Tierart Ratte, gelang es Ciucan et al. (2011), dieses Modell auch auf Mäuse zu übertragen (**Ciucan 2011; Taraseviciene-Stewart 2001**). Mäuse und Ratten zeigen nach Gabe von Su5416 und chronischer Hypoxieexposition einen Anstieg der Muskularisierung kleiner pulmonaler Arterien sowie plexiforme Läsionen des Endothels, die zur Okklusion der Gefäße führen. Weiterhin kann ein Anstieg des RVSP und die Ausbildung einer RVH beobachtet werden. Echokardiografische Untersuchungen zeigen eine reduzierte Herzfunktion sowie Anzeichen eines Rechtsherzversagens. Die histologischen und pathophysiologischen Veränderungen sind nach anschließender Normoxieexposition reversibel (**Bikou 2020; Pak 2010; Taraseviciene-Stewart 2001; Vitali 2014**).

Die nach Gabe von Su5416 und chronischer Hypoxieexposition entstehenden plexiformen Läsionen entsprechen denen bei PAH Patienten (**Abe 2010; Bikou 2020; Taraseviciene-**

**Stewart** 2001). Bis heute ist allerdings nicht abschließend geklärt, welche klinische Gruppe der PH mit diesem Modell abgebildet wird. Jedoch wird die Imitation der klinischen Gruppe 1 und teilweise der klinischen Gruppe 3 mithilfe des Su5416/Hypoxie - Modells vermutet (**Bikou** 2020; **Pak** 2010).

### 2.2.3 Monocrotalin

Monocrotalin (MCT) ist ein toxisches Pyrrolizidinalkaloid, welches aus den Samen der Pflanze *Crotalaria spectabilis* gewonnen wird. Nach oraler oder subkutaner Applikation wird MCT in der Leber von Cytochrom P450 Enzymen zu Monocrotalinpyrrol (MCTP) verstoffwechselt. Neben diesem findet auch chemisch hergestelltes MCTP in der Forschung Anwendung. Während die Gabe von MCT/MCTP bei Ratten weit verbreitet ist, wird es in der Maus aufgrund der umstrittenen Wirksamkeit nur selten angewendet (**Dumitrascu** 2008; **Gomez-Arroyo** 2012; **Lawrie** 2014; **Raoul** 2007).

Im Rattenmodell bewirkt MCT zunächst eine pulmonale Arteritis mit perivaskulärer Infiltration mononukleärer Entzündungszellen (**Pak** 2010; **Dorfmueller** 2003). In manchen Fällen können darüber hinaus auch Leber- und Nierenschäden auftreten (**Pak** 2010; **Stenmark** 2009).

Da bei Mäusen eine reduzierte Verstoffwechslung von MCT vermutet wird, wurde hier die Anwendung von chemisch hergestelltem MCTP untersucht (**Gomez-Arroyo** 2012; **Raoul** 2007). Hierbei konnten Raoul et al. (2007) eine Zunahme der Muskularisierung kleiner pulmonaler Arterien, einen Anstieg des RVSP und die Bildung einer RVH nach MCTP Applikation zeigen (**Raoul** 2007). Diese Ergebnisse konnten von Dumitrascu et al. (2008) - auch bei Gabe der doppelten Dosis - nicht bestätigt werden (**Dumitrascu** 2008). Hier zeigte sich lediglich ein tendenzieller Anstieg der Parameter. Jedoch konnten bei Mäusen histopathologische Veränderungen, wie perivaskuläre und interstitielle Ödeme, diffuse Alveolarschäden und Infiltration mit inflammatorischen Zellen festgestellt werden. Das Auftreten dieser Veränderung lässt darauf schließen, dass das MCTP-Modell der Maus zur Untersuchung von akuten Lungenschädigungen geeignet ist (**Pak** 2010).

## 2.2.4 Wahl des Modells der chronischen Hypoxieexposition der Maus

Ziel des Dissertationsprojekts war es, den Einfluss der klassischen transienten Rezeptor Potential (*classical transient receptor potential*, TRPC) Proteine 1, 3 und 6 auf die Entstehung einer CHPH anhand von TRPC1, 3 und 6 defizienten Mäusen (TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse) zu untersuchen. Da transgene Tiere derzeit nur für die Tierart Maus zur Verfügung stehen, wurden die erforderlichen Untersuchungen mithilfe des Mausmodells der CHPH durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Pathogenese der CHPH untersucht. Chronische experimentelle Hypoxieexposition spiegelt den physiologischen Einfluss dieser Erkrankung wider und führt im Mausmodell zu strukturellen und pathophysiologischen Veränderungen, wie sie bei der humanen CHPH zu finden sind. Da Patienten mit CHPH keine plexiformen Läsionen des Endothels aufweisen und Symptome der WHO Klassen I und II zeigen, wurde die chronische Hypoxieexposition der Maus als geeignetes Modell gewählt.

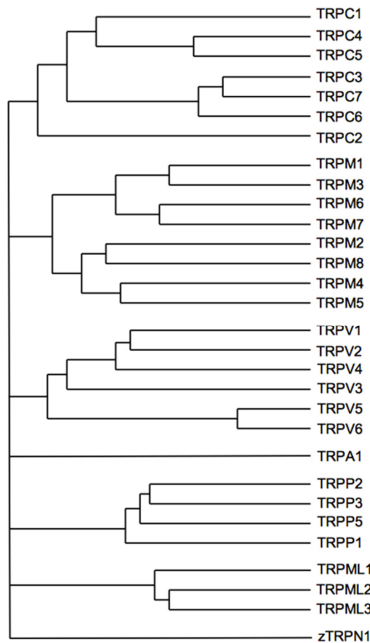
## 2.3 Transiente Rezeptor Potential Proteine

Transiente Rezeptor Potential (TRP) Proteine wurden erstmals 1969 von Cosens und Manning in der Taufliege *Drosophila melanogaster* beschrieben (Cosens 1969). In Taufliegen, die eine Mutation des *trp* Gens aufwiesen, führte eine anhaltende Lichtexposition zu einer transienten Depolarisation von Photorezeptoren, während diese Depolarisation in Wildtyp Taufliegen konstant blieb (Pan 2011; Xiao 2017). In Säugetieren werden TRP Proteine ubiquitär exprimiert und durch Einflüsse von Temperatur, Osmosedruck, olfaktorischen, gustatorischen oder physikalischen Stimuli aktiviert. Zudem können einige TRP Kanäle über intra- und extrazelluläre Botenstoffe sowie über Moleküle und Ionen, wie z. B. Ca<sup>2+</sup>, aktiviert werden (Pan 2011; Clapham 2003).

### 2.3.1 Die TRP Superfamilie

Die TRP Superfamilie umfasst 28 Proteine, die in sieben Subfamilien unterteilt werden. Von diesen Subfamilien kommen sechs Familien in Säugetieren vor, die nach Homologie ihrer Aminosäuresequenz in klassische oder *classical* TRP (TRPC), melastatin TRP (TRPM), vanilloid

TRP (TRPV), ankyrin TRP (TRPA), polycystin TRP (TRPP) und mucolipin TRP (TRPML) unterteilt sind. Mit Ausnahme der Familie der *no mechanoreceptor potential C* TRP (TRPN) Proteine, die u. a. in Zebrafischen exprimiert werden, sind alle TRP Proteine in Säugetieren vertreten (**Nilius 2011; Dietrich 2014**) (**Abbildung 2.3.1**).



**Abbildung 2.3.1: Dendrogramm der TRP Superfamilie**

Die transient Rezeptor Potential (TRP) Superfamilie wird anhand der Aminosäuresequenzen in die klassischen TRP (TRPC), melastatin TRP (TRPM), vanilloid TRP (TRPV), ankyrin TRP (TRPA), polycystin TRP (TRPP), mucolipin TRP (TRPML) und *no mechanoreceptor potential C* TRP (TRPN) Subfamilien gegliedert. z = Zebrafisch. Verändert nach **Pan 2011**.

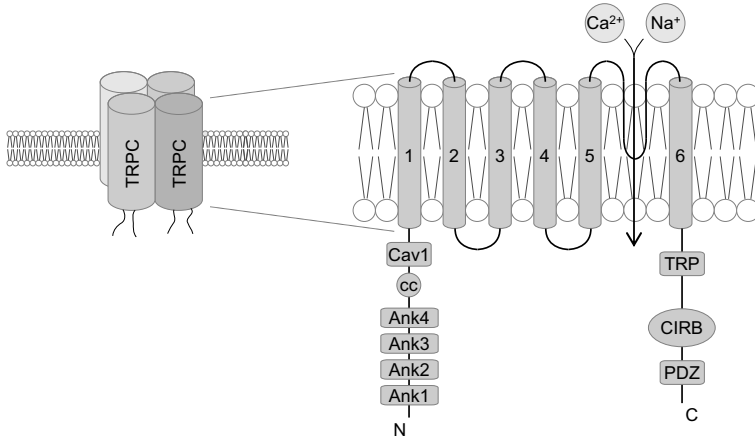
Bei den TRP Kanälen handelt es sich um nicht-selektive mono- und divalente Kationenkanäle mit einem  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Permeabilitätsverhältnis von  $< 10$ . Lediglich die für monovalente Kationen selektiven TRPM4, TRPM5 und  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven TRPV5 und TRPV6 Kanäle bilden hier eine Ausnahme (**Eder 2011**).

### 2.3.2 Die klassische TRP Subfamilie

Die Familie der TRPC Proteine umfasst die sieben Mitglieder TRPC1 bis 7, welche anhand ihrer strukturellen und funktionalen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt werden, Gruppe 1: TRPC1, 4 und 5, Gruppe 2: TRPC3, 6 und 7 und Gruppe 3: TRPC2. Während TRPC2 im Menschen nur als Pseudogen existiert, dient es in Ratten und Mäusen der Pheromonwahrnehmung im Vomeronasalorgan (**Eder** 2011; **Clapham** 2003).

TRPC Proteine formen tetramere TRPC Kanäle, die sowohl *homomer* als auch *heteromer* gebildet werden können. Lediglich das TRPC1 Protein kann keine funktionsfähigen *homomeren* Kanäle bilden. Hingegen formen TRPC1, TRPC4 und TRPC5 sowie TRPC3, TRPC6 und TRPC7 funktionelle Kanäle, an deren Bildung neben TRPC Proteinen auch TRP Proteine anderer Subfamilien beteiligt sein können (**Eder** 2011; **Hofmann** 2002).

Jedes TRP Protein besitzt sechs Transmembrandomänen und einen Poren-bildenden putativ selektiven Filter (SYGEE) zwischen Transmembrandomäne 5 und 6 (**Dietrich** 2014). Am intrazellulären N-Terminus befinden sich vier Ankyrin Wiederholungen und eine cc-Domäne (*coiled-coil domain*), die für die Zusammenlagerung der TRPC-Proteine zum *tetrameren* Kanal und für Protein-Protein Interaktionen von großer Bedeutung sind (**Engelke** 2002). TRPC Kanäle sind unter anderem in speziellen lipidmikrodomän-haltigen *Caveolae* zu finden, die von der Plasmamembran gebildet werden. Um an Caveolin 1 Proteinen (CAV-1) zu binden, die in den *Caveolae* exprimiert sind, besitzen TRPC Proteine eine CAV-1 Bindungsdomäne am N-terminalen Ende (**Brazer** 2003). Am C-terminalen Ende der TRPC Proteine sind eine prolinreiche TRP-Box, eine Calmodulin- und Inositoltriphosphat- (IP<sub>3</sub>) Rezeptorbindungsdomäne (CIRB) sowie eine PDZ Domäne lokalisiert (**Eder** 2011; **Pan** 2011) (**Abbildung 2.3.2**).



**Abbildung 2.3.2: Aufbau von TRPC Kanälen**

Klassische transiente Rezeptor Potential (*classical transient receptor potential*, TRPC) Proteine bilden homo- oder heterotetramere Kanäle. Jedes TRPC Protein besteht aus sechs Transmembrandomänen mit einer Pore bildenden Einheit zwischen Transmembrandomäne 5 und 6, die mono- und divalente Kationen leitet. Die intrazellulär gelegenen N- und C-Termini dienen der Zusammenlagerung der TRPC Proteine zum Tetramer und der Interaktion mit anderen Proteinen. Verändert nach **Malczyk** 2016.

Ank = Ankyrin Domäne, Cav-1 = Caveolin 1 Protein, cc = *coiled-coil* Domäne, CIRB = Calmodulin- und IP<sub>3</sub> Rezeptorbindungsdomäne, IP<sub>3</sub> = Inositoltriphosphat, N = N-Terminus, PDZ = PDZ Domäne, TRP = TRP-Domäne

TRPC Kanäle können die Funktion als rezeptoraktivierter Kanal (*receptor operated channel*, ROC) und/oder speicheraktivierter Kanal (*store operated channel*, SOC) übernehmen. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren nach Ligandenbindung das Enzym Phospholipase C (PLC). Die PLC-vermittelte Hydrolyse von membrangebundenem Phosphatidylinositol-bisphosphat führt zur Generierung von IP<sub>3</sub> und Diacylglycerol (DAG). Die Akkumulierung des DAG führt daraufhin zur Aktivierung von ROC (**Eder** 2011; **Wang** 2008). TRPC3, TRPC6 und TRPC7 sind als ROC beschrieben (**Dietrich** 2005). Nach Bindung von IP<sub>3</sub> an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor (IP<sub>3</sub>R) des Sarko- bzw. Endoplasmatischen Retikulums (SR bzw. ER) und der damit verbundenen Entleerung des intrazellulären Calciumspeichers erfolgt ein Calciumeinstrom über die SOC. Dabei dimerisiert das im ER lokalisierte stromale Interaktionsmolekül 1 (Stim1) und interagiert mit Proteinen in der Plasmamembran, die SOC bilden z. B. dem *calcium release-activated calcium channel protein 1* (Orai1) (**Ambudkar** 2017; **Chen** 2013; **Yuan** 2009). Neben Orai1 zählen auch TRPC1, TRPC4 und TRPC5 zu den Speicher-aktivierbaren Proteinen (**Ambudkar** 2017; **Eder** 2011; **Wang** 2008). Ob Stim1 und Orai1 direkt oder indirekt mit TRPC1,

TRPC4 und TRPC5 interagieren und diese aktivieren, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (DeHaven 2009; Jia 2017; Lopez 2020; Yuan 2007).

### 2.3.3 Rolle von TRPC Kanälen bei PH

Eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  beeinflusst das Proliferations-, Migrations- und Apoptoseverhalten von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cells*, PASMC) und übernimmt somit bei der Pathogenese des vaskulären Remodellings eine entscheidende Rolle (Malczyk 2017; Pietra 2004; Stenmark 2009). Dabei wird die  $[Ca^{2+}]_i$  sowohl durch den intrazellulären Calciumspeicher, das ER bzw. SR, als auch durch den Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum reguliert (Smith 2016). Da es sich bei TRPC Kanälen um nicht-selektive Kationenkanäle handelt, die vorwiegend  $Ca^{2+}$  und  $Na^+$  leiten, sind sie an der Calcium-Homöostase der PASMC maßgeblich beteiligt und nehmen folglich Einfluss auf die Pathogenese von CHPH (Malczyk 2013). So konnte für TRPC1 und TRPC3 defiziente Mäuse (TRPC1<sup>-/-</sup> Mäuse und TRPC3<sup>-/-</sup> Mäuse) ein partieller Schutz vor der Entstehung von CHPH gezeigt werden, während für TRPC6 defiziente Mäuse (TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse) eine reduzierte Reaktion auf akute Hypoxie festgestellt werden konnte (Malczyk 2013; Mayser 2020; Weissmann 2006).

## 2.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von TRPC1, 3 und 6 Proteinen für die Pathogenese der CHPH im Mausmodell zu untersuchen. Dabei wurden folgende zwei Hypothesen eruiert:

1. TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln keine PH unter chronischer Hypoxieexposition.
2. Die Interaktion zwischen verschiedenen TRPC Proteinen ist entscheidend für die Bildung funktionsfähiger Kanäle bei CHPH.

Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die typischen Veränderungen, die mit CHPH einhergehen, gelegt, wozu der Anstieg des RVSP, die RVH und das mit CHPH assoziierte vaskuläre Remodelling zählen. Zudem wurde der Einfluss der Deletion von TRPC1, 3 und 6

Proteinen auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in PASMC unter chronischer Hypoxieexposition erforscht. Die den Beobachtungen zugrundeliegenden Mechanismen wurden mit Hilfe von molekularen Methoden untersucht. Mithilfe der vorliegenden Erkenntnisse sollten die Grundlagen der Entstehung von CHPH weiter entschlüsselt und ein Beitrag zur Entwicklung neuer Therapien gegen CHPH geleistet werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte und Software

4-Kammern-Myographensystem	620M, Danish Myo Technology A/S, Hinnerup, Dänemark
Blasenfalle, Sonderanfertigung	Glasbläserei der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland
Blutanalysesystem, Rapidlab™ 348	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland
ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
CFX Manager™	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
<i>Controller Oxycycler Model A84XOV</i>	Biospherix Ltd., Lacona, New York, USA
Drucksensoren, Combitrans 1-fach Set Mod. II Uni Gießen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
EKG Tisch mit Wärmefunktion	VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Entwässerungsmaschine ASP300S	Leica, Wetzlar, Deutschland
Federschere <i>Vannas Spring Scissors</i> - 3 mm <i>Cutting Edge</i>	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Federschere <i>Spring Scissors</i> - 8 mm <i>Cutting Edge</i> , 0,2 mm <i>Tip Diameter</i>	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gefäßclip nach Biemer - Maulöffnung 5mm, Maullänge 9 mm, Schließkraft 20 G-25 G	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Leica DMI6000 CS	Leica, Wetzlar, Deutschland
Gasflussmesser, Einzelrohr-Rotameter P11A2-VA0	Aalborg Instruments & Controls, Inc., Orangeburg, New York, USA
GraphPad Prism Version 6.07	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
Homogenisator, Precellys® 24	PeqLab, Erlangen, Deutschland
i-control, Version 1.10	Tecan, Männedorf, Schweiz
ILU-System, <i>Basic Unit for isolated perfused Mouse Lung Size 1 Type 839</i> (IL-1)	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland

## Material und Methoden

Image Lab™, Version 6.0	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Isofluranverdampfer Vet Equip.	KF Technology, Rom, Italien
Kamera, Hamamatsu Camera Controller C10600, Orca-R2	Hamamatsu, Hamamatsu, Japan
Klemme <i>Student Halsted-Mosquito Hemostats</i> - 1,4 mm x 20 mm	F.S.T. Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
LabChart, Version 7 (Hämodynamik)	ADInstruments, Oxford, UK
LabChart, Version 8 (Myographie)	ADInstruments, Oxford, UK
LAS X, Software	Leica, Wetzlar, Deutschland
Leica Qwin V3	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lichtquelle X-Cite 200DC	Lumen Dynamics, Mississauga, Kanada
Lungenhalterungsbügel	Von Kreuzt - Labortechnik, Uckfield, England
Magnetischer Konzentrierer für Zellisolation, Dynal MPC-1	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph-Instruments, Schwalbach, Deutschland
Mehrweg-Transducer-Board, <i>Combitrans EasyClick Monitoring System</i>	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<i>Microplate Reader</i> Infinte M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
<i>Microplate Reader</i> Spark 10M	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikrozentrifuge Mikro 200R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Mikrozentrifuge <i>PlateFuge</i>	Benchmark Scientific, Sayreville, New Jersey, USA
Mikroskop DM6000 B (Histologie)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop DMIL (Zellkultur)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop SMZ-171	Motic, Hong Kong
Mikrotom RM2165	Leica, Wetzlar, Deutschland
Millar Katheter, Model SPR 671, 65cm	ADInstruments Ltd., Oxford, UK
Mini-Gelelektrophoreseeinrichtung	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Monitor-Pod	Biospherix Ltd., Lacona, New York, USA
Nadelelektroden <i>Needle Electrodes for Animal Bio Amp</i>	ADInstruments Ltd., Oxford, UK
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, Bad Homburg, Deutschland
Paraffinausgussstation, Leica EG 1140H	Leica, Wetzlar, Deutschland
Petrischale für Aortenpräparation	Danish Myo Technology A/S, Hinnerup, Dänemark
Pinzette <i>Greafe Forceps</i> - 0,8 mm <i>Tips</i> gerade, verzahnt	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

Material und Methoden

Pinzette <i>Moria Iris Forceps</i> - 0,5 mm <i>Tips</i> gebogen, verzahnt	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette <i>Moria Iris Forceps</i> - 0,5 mm <i>Tips</i> gerade, verzahnt	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Pipetboy</i>	Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Pipetten (1 ml, 100 µl, 10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pod	Biospherix Ltd., Lacona, New York, USA
Px1™ PCR <i>Plate Sealer</i>	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Qwin V3, Software	Leica, Wetzlar, Deutschland
Rektalsonde	Physitemp Instruments, Clifton, New Jersey, USA
Rektalthermometer	Indus Instruments, Houston, Texas, USA
Reservoir, Sonderanfertigung	Glasbläserei der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland
Respirator <i>Mouse Ventilator MiniVent Type 845</i>	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
Sauerstoffsensord E-445 <i>Oxygen Sensor</i>	Biospherix Ltd., Lacona, New York, USA
Sauerstoff Controller A-Series Dynamic O <sub>2</sub> Controller	Biospherix Ltd., Lacona, New York, USA
Schalldämpfer CUS-Muffler	Biospherix Ltd., Lacona, New York, USA
Spannungsgerät Electrophoresis Power Supply Consort E835 für Western Blot	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
SparkControl, Version 2.1	Tecan, Männedorf, Schweiz
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Schere <i>Surgical Scissors</i> - Blunt 41 mm <i>Cutting Edge</i>	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sterilbank <i>Cellgard Class II Biological Safety Cabinet</i>	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Temperaturregelgerät <i>tempcontrol 37-2 digital</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Thermoregulierte Unterlage Physitemp	Physitemp Instruments, Clifton, New Jersey, USA
<i>Thermocycler Tpersonal</i>	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tierhaltungsboxen A-66274-P <i>X-Large Animal Chamber</i>	Biospherix Ltd., Lacona, New York, USA
Transfersystem Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Ultraschallgerät Vevo 2100	VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Vakuumpumpe VACUSAFE	Integra, Biebertal, Deutschland

Vakuumpumpe VACUSIP	Integra, Biebertal, Deutschland
Verstärker <i>Animal Bio Amp</i>	AdInstruments Ltd., Oxford, UK
Wägezelle Research Isometric Transducer Model 1 (PY2 72-449)	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
Wärmeglocke, Sonderanfertigung	Glasbläserei der der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
WatView Version 2.6.0.4	Watlow Anafaze, Watsonville, Kalifornien, USA

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

100er Petrischale	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
24-Well, Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
3-Wege-Hahn Discifix® C-3SC	B. Braun, Melsungen, Deutschland
35er Zellkulturschale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Mikrottestplatte F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well <i>Clearview Plate</i> , Incucyte®	Sartorius, Göttingen, Deutschland
96-Well PCR Platte, Multiplate™ PCR Plates, klar	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Baumwollfaden	John Lewis, London, UK
Chirurgischer Faden, 5/0 Faden Polyester, <i>Silicone coated</i>	Ashaway Line & Twine Mfg. Co., Ashaway, Rhode Island, USA
<i>Cryo Freezing Tubes</i> 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Deckel für PCR	Nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
Faden, Mercifil Faden, No. 12	Amann & Söhne GmbH & Co. KG, Bönningheim, Deutschland
<i>Falcon Tube</i> (15 ml, 50 ml)	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
<i>Falcon Tube</i> (15 ml, 50 ml) dunkel	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Fließpapier, Zellulose Papier, <i>Gel Blotting Paper</i> Whatman™	GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK
Gefäß, DNase/Rnase frei (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Hämatokrit-Kapillaren, 75 mm/60 µl	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland

## Material und Methoden

Ibidi-Schalen für Ca <sup>2+</sup> -Messung, $\mu$ -Dish, 35 mm, <i>high</i> , Glass Bottom	Ibidi, Gräfelfing, Deutschland
Kanüle (15G x 1,8" x 40mm)	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland
BD Microlance™ <sup>3</sup> Kanüle (18 G x 1,2" x 40 mm; 24 G x 0,55" x 25 mm; 25 G x 0,55" x 25 mm; 26 G x 0,45" x 13 mm; 30 G x 0,3" x 13 mm)	Becton Dickinson GmbH, Drogheda, Irland
Keramikkügelchen 2 ml, PRECELLYS Ceramic, Zirconium(IV)-oxid, Beads	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Mikroröhre 2 ml mit Verschluss	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nitrocellulose-Membran BioTrace™ NT	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
<i>Optically Clear Heat Seal</i>	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Parafilm	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Pasteur-Pipetten 230 mm	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
PCR Tube 0,2 ml ohne Deckel	Nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l)	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Polyvinylidenfluorid-Membran, BioTrace™ PVDF Polyvinylidene	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremismünster, Österreich
Spritze 1 ml, 10 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Spritze 2 ml	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Spritze 50 ml, Original Perfusor® syringe Luer Lock	B. Braun, Melsungen, Deutschland

### 3.1.3 Chemikalien

1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) (495414-25MG)	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol (4227.3)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
4x Laemmli Sample Buffer (1610747)	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Aceton (32201-2.5L)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamidlösung 40% Rotiphorese® Gel A (3037.1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Albumin, from bovine serum (A4503-10G) (Zellkultur)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Albumin bovine Fraction V, Protease-Free (11926.03) (Histologie)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Material und Methoden

Albumin Fraktion V (8076.4) (Molekularbiologie)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS) (A3678-25G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<i>Antibody Diluent</i> (ZUC025-500)	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
<i>Aqua dest.</i> (82479E)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Bisacrylamidlösung 2% Rotiphorese® Gel B (3039.1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Braunoderm® (01867557)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat (5239.1)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Calciumchlorid, Standardlösung (21114-1L)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Zellyse-Puffer ( <i>Cell Lysis Buffer</i> ) (9803S)	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Cyklopiazonsäure ( <i>Cyclopiaconic Acid</i> , CPA) (C1530)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
D(+)-Glucose (G8270-1KG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
D(+)-Glucose-Monohydrat (8342)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (106580)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (D4540-100ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Eisen (II, III)-oxide, Eisenpartikel (31,006-9)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Elektrolytlösung (090717)	SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG, Naila, Deutschland
Essigsäure (100%) (3738.1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (70%) mit Ethylmethylketon vergällt (ETO-5000-70-1)	SAV Liquid Production GmbH, Flinsbach am Inn, Deutschland
Ethanol (96%, 99,6%) mit Ethylmethylketon vergällt (27685, 27694)	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol (100%) für molekularbiologische Untersuchung (64-17-5)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fura 2-AM (F1221)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glycin (3908.2)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin (3783.1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Heparin, Heparin-Natrium-5000- ratiopharm® (03170642)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Hepes (9105.3)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran (06497131)	Baxter, München, Deutschland
Isopropanol (99,8%) (33539-2.5L-M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
iTaq Universal SYBR® <i>Green Supermix</i> (1725124)	Bio-Rad, Hercules, USA Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Kaliumchlorid (KCl) (6781.1 ) (Histologie)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

Kaliumchlorid (P9541-500G) (Myograph)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kaliumchlorid (HN02.3) (Zellkultur)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (104873)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml, Ursotamin®, 10%ig (12727581)	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Low Melting Point Agarose (Typ VII) (A9045-25G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (230391- 500G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (HN03.2)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol (32213-2.5L-M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Methylgrün, <i>Methyl Green</i> (H-3402)	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Milchpulver, <i>Blotting grade</i> , fettarm (T145.3)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Mouse-on-Mouse HRP Polymer</i> (MM510L)	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Natriumazid (13412)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Natriumbicarbonat (31437-1KG-M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumchlorid 0,9% (357 0160)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) Injektionslösung (01957160)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumchlorid (3957.1) (Histologie, Zellkultur)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (S5886-500G) (Myograph)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumhydrogencarbonat 1molar 8,4% (04585782)	SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG, Naila, Deutschland
Natriumphosphat, monobasisch, Monohydrat (71504-250G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Nifedipin (ab120135)	Abcam, Cambridge, UK
Normocin™ (ant-nr-1)	Invivo-Gen, Toulouse, Frankreich
Paraplast Plus® (P3683-1KG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen Strep, P/S) (11548876)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Polysorbat (TWEEN 20®) (P1379-500ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Eindeckmedium Xylol-löslich, Pertex® (41- 4012-00)	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (P7626-5G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Reagent A, DC™ Protein Assay (5000113)	Bio-Rad, Hercules, USA Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA

## Material und Methoden

Reagent B, Protein Assay (5000114)	Bio-Rad, Hercules, USA Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Reagent S, DC™ Protein Assay (5000115)	Bio-Rad, Hercules, USA Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
<i>Rodent Block M</i> (RBM961L)	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Salzsäure 37% (4625.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SKF-96365 (ab120280)	Abcam, Cambridge, UK
<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> SDS 20% Solution (AM9820)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA Invitrogen, Carlsbad, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED) (2367.3)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris (4855.2)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl (9090.2)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizin (6977.4)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin / EDTA (10fach) (P10-024100)	Omega Scientific, Tarzana, Kanada
Wasser, doppelt destilliert (3478.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30% (107210)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylazinhydrochlorid (Xylazin), 20 mg/ml (25648)	WDT, Garbsen, Deutschland
Xylol (9713.2)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.4 Kits und Assays

<i>Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent</i> (RPN2236)	Cytiva, Marlborough, Massachusetts, USA
<i>Clarity Max Western ECL Substrate</i> (1705062)	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
<i>Clarity Western ECL Substrate</i> (1705061)	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
<i>Click-iT Edu Imaging Kit</i> (C10337)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
<i>Click-iT™ Plus TUNEL-Assay-Kit</i> für In Situ Apoptose-Detektion	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
<i>DAB Substrat Kit, Peroxidase</i> (SK-4100)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA
<i>iScript cDNA Synthesis Kit</i> (1708891)	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
<i>Mouse ACE ELISA Kit</i> (ab256400)	Abcam, Cambridge, UK
<i>Mouse ACE2 ELISA Kit</i> (ab213843)	Abcam, Cambridge, UK
<i>Mouse AGT ELISA Kit</i> (ab245718)	Abcam, Cambridge, UK
<i>Picro Sirius Red Stain Kit</i> (Connective Tissue Stain) (ab150681)	Abcam, Cambridge, UK

Polyacrylamid Gel, TGX Stain-Free™ Fast Cast™ Acrylamide Kit (7,5%, 10%, 12%) (1610181, 1610183, 1610185)	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
<i>Rneasy® Mini Kit</i> (74104)	Qiagen, Venlo, Niederlande
<i>Vector VIP Peroxidase Substrate Kit</i> (SK-4600)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

### 3.1.5 Antikörper für Western Blot

Anti-Goat IgG <i>HRP-conjugated Antibody</i> (HAF109)	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Anti-Mouse IgG (H+L), <i>HRP Conjugate</i> (W402B)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Anti-Rabbit IgG (H+L), <i>HRP Conjugate</i> (W401B)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Anti- $\alpha$ -SMA (SAB2500963)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Anti- $\beta$ -Actin (A5316-.2ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Anti-Calmodulin (4830S)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-CaMKII (pan) (D11A10) mAb (4436S)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-phospho-CaMKII (Tyr231) (3356S)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-phospho-IP <sub>3</sub> R (Ser1756) (D10E3) mAb (8548S)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-p38 MAPK (9212S)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) (4511S)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

### 3.1.6 Antikörper für Immunhistochemie

Anti- $\alpha$ -SMA, <i>Clone 1A4 monoklonal, mouse anti-human</i> (A2547)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-vWF, polyklonal, <i>rabbit anti-human</i> (A0082)	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland
ImmPRESS™ <i>Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Kit, Peroxidase</i> (MP-7401)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

### 3.1.7 Enzyme und Standards

Kollagenase H f. Clostridium hystolyticum (C5138-500MG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standard (1610374)	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Proteinase K (RE7160-K)	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Trypsin (10fach) (P10-024100)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

### 3.1.8 Primer

Der Großteil der Primersequenzen wurde aus der Literatur entnommen. Primersequenzen, die nicht aus der Literatur bekannt waren, wurden unter Zuhilfenahme des Programms BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) erstellt. Die Schmelztemperatur wurde für alle Primer zwischen 61°C und 63°C gewählt. Die Primer wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) bezogen (**Tabelle 3.1.1**).

**Tabelle 3.1.1: Primersequenzen für RTqPCR**

<u>Gen</u>	<u>Primersequenz</u>	<u>Quelle</u>
<i>Myh6</i>	F: 5'TATAAAGGGGCTGGAGCACTG-3'	<b>Veith 2020</b>
	R: 5'-CAGAGATCCTGGGTGGAGAA3'	
<i>Nppa</i>	F: 5'GCTTCCAGGCCATATTGGAG-3'	<b>Veith 2020</b>
	R: 5'-GTCTAGCAGGTTCTTGAAATCCA3'	
<i>Atp2a2</i>	F: 5'GCCTTTGTAGAGCCGTTTGT-3'	<b>Veith 2020</b>
	R: 5'-TTTCTTTCCTGCCACACACC3'	
<i>B2m</i>	F: 5'AGCCCAAGACCGTCTACTGG-3'	BLAST®
	R: 5'-TTCTTTCGCGTGCATAAATTG3'	
<i>Myh7</i>	F: 5'GCCGAGTCCCAGGTCAACAA-3'	<b>Veith 2020</b>
	R: 5'-GCTACTCCTCATTCAGGCCCTTG3'	
<i>Nppb</i>	F: 5'TATCTCAAGCTGCTTGGGC-3'	<b>Veith 2020</b>
	R: 5'-ACAACCTCAGTGC GTTACAGC3'	

Material und Methoden

<i>Hprt1</i>	F: 5'GCTGACCTGCTGGATTACAT-3'	<b>Kraut 2014</b>
	R: 5'-TTGGGGCTGTACTGCTTAAC3'	
<i>Itpr1</i>	F: 5'GCTTGAACCAAGTCCACCCC-3'	BLAST®
	R: 5'-GGCCATTGCCAAAGCTGGTA3'	
<i>Itpr2</i>	F: 5'GGACATCGTGTCCCTGTACG-3'	BLAST®
	R: 5'-AACTTCTTGGGTGGGTTGGC3'	
<i>Orai1</i>	F: 5'CTGTCTGCGCAAGCTCTA-3'	BLAST®
	R: 5'-AGCAACCCTGGTGGGTAGTC3'	
<i>Orai2</i>	F: 5'GGACCTCAGCCCTCTGT-3'	<b>Bendiks 2020</b>
	R: 5'-GGGACTGGTACTTGGTCTCC A3'	
<i>Orai3</i>	F: 5'CATCTGCTCTGCTGTCG-3'	<b>Bendiks 2020</b>
	R: 5'-GGTGGTATTCATGATCGTTCT3'	
<i>Pln</i>	F: 5'ATACAGCTTCATGCTCTGCAC-3'	<b>Veith 2020</b>
	R: 5'-TCTTCACCTGCTTCTGTCTTG3'	
<i>Ryr2</i>	F: 5'CGAGCGTGTCTGGGTATAG-3'	<b>Veith 2020</b>
	R: 5'-TTGAGGATGTTCCACCAGGC3'	
<i>Stim1</i>	F: 5'TCTTGCCCTGTGGCTTCTTG-3'	BLAST®
	R: 5'-CACAGGGGCTTGCAATTCGG3'	
<i>Stim2</i>	F: 5'GAGGGCGCAGAGTGTGAG-3'	<b>Bendiks 2020</b>
	R: 5'-TTTAGAGCCATGCGGACCT3'	
<i>Trpc4</i>	F: 5'GGGCGGCGTGTCTGAT-3'	<b>Malczyk 2013</b>
	R: 5'-CCGCGTTGGCTGACTGTATTGTAG3'	
<i>Trpc5</i>	F: 5'AGTCGCTCTTCTGGTCTGCTTT-3'	<b>Malczyk 2013</b>
	R: 5'-TTTGGGGCTGGGAATAATG3'	
<i>Trpc7</i>	F: 5'GTGGGCGTGTGACCTG-3'	<b>Malczyk 2013</b>
	R: 5'-AGACTGTTGCCGTAAGCCTGAGAG3'	

### 3.1.9 Puffer und Lösungen

<u>Puffer</u>	<u>Substanz</u>	<u>Menge/Konzentration</u>
0,1% BSA Lösung	DPBS	100 ml
	BSA	0,1 gr
0,5% Essigsäure	Essigsäure 100%	5 ml
	Aqua dest.	9995 ml
3% BSA Lösung	DPBS	100 ml
	BSA	3 gr
10% BSA Lösung	NaN <sub>3</sub>	0,026 gr
	BSA	20 gr
	PBS	200 ml
Agarose-Eisenpartikel-Suspension	Low melting point Agarose (Typ VII)	5 mg
	Eisen (II,III)-oxidem, Eisenpartikel	5 mg
	Medium I	1 ml
Agarose-Lösung	Low melting point Agarose (Typ VII)	10 mg
	Medium I	1 ml
Anoden-Puffer, pH 8,9	Tris-HCl	0,2 M
	Aqua dest.	1000 ml
Gel-Puffer, pH 8,45	Tris-HCl	3 M
	SDS	0,3%
	dH <sub>2</sub> O	100 ml
Hepes Ringer Lösung (10 mM) ohne Calcium (HR <sup>-</sup> ), pH 7,4	KCl	5,6 nM
	NaCl	136,4 nM
	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1 nM
	D(+)-Glucose-Monohydrat	11 nM
	Hepes	10 nM
	Aqua dest.	1000 ml
Hepes Ringer Lösung (10 mM) mit Calcium (2,2 nM) (HR <sup>+</sup> ), pH 7,4	KCl	5,6 nM
	NaCl	136,4 nM
	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1 nM
	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2,2 nM
	D(+)-Glucose-Monohydrat	11 nM
	Hepes	10 nM
	Aqua dest.	1000 ml

## Material und Methoden

Hepes Ringer Lösung (10mM) mit Calcium (20mM), pH 7,4	KCl	5,6 nM
	NaCl	136,4 nM
	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1 nM
	CaCl <sub>2</sub>	20 mM
	D(+)-Glucose-Monohydrat	11 nM
	Hepes	10 nM
	Aqua dest.	1000 ml
Elektrolytlösung	NaCl	120 mM
	KCl	4,3 mM
	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1,3 mM
	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2,4 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1 mM
	D(+)-Glucose-Monohydrat	13,32 mM
	Hydroxyethylstärke HES 200000/0,5	50 gr
	H <sub>2</sub> O für Injektionszwecke	975 ml
Kathoden-Puffer	Tris-HCl	0,1 M
	Trizin	0,1 M
	SDS	0,1%
	Aqua dest.	1000 ml
Laemmli-Puffer (10fach)	Tris	0,25 M
	Glycin	1,9 M
	SDS	1%
	Aqua dest.	1000 ml
Lysepuffer	Phenylmethylsulfonylfluorid	0,1 mM
	Zellyse-Puffer	100 µl
	Aqua dest.	900 µl
Natriumhydrogencarbonat -Lösung	Natriumhydrogencarbonat-Lösung 8,4%	2,2 ml
	Elektrolytlösung	100 ml
PBS (20fach)	NaCl	2,7 M
	KCl	0,05 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,13 M
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,03 M
	Aqua dest.	1000 ml

## Material und Methoden

Physiologische Salzlösung	NaCl	118,0 mM
	KCl	4,0 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
	MgSO <sub>4</sub>	1,0 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	24,0 mM
	Glucose	5,5 mM
Physiologische Salzlösung mit hohem Kaliumanteil	NaCl	38,0 mM
	KCl	80,0 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
	MgSO <sub>4</sub>	1,0 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	24,0 mM
	Glucose	5,5 mM
Stripping-Lösung	Glycin	1 M
	HCl	3,7%
	Aqua dest.	90 ml
Transfer-Puffer	Tris	0,5 M
	Glycin	0,4 M
	SDS	0,04%
	Methanol	400 ml
	Aqua dest.	1596,3 ml
Trypsin (1fach)	Trypsin (10fach)	12 ml
	Hepes Ringer Lösung (0,2 M)	12 ml
	0,9% NaCl	96 ml
Waschpuffer (10fach), pH 7,5	Tris	0,2 M
	NaCl	1,5 M
	TWEEN 20®	1 ml
	Aqua dest.	1000 ml

### 3.1.10 Medien

DPBS (P04-36500)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Fetales Kälberserum ( <i>Fetal Bovine Serum</i> , FBS) (F0804)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Medium 199 (31150-022)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

## Material und Methoden

<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i> (C-22062)	PromoCell, Madison, Wisconsin, USA
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 Supplement Mix</i> (C-39267)	PromoCell, Madison, Wisconsin, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , DMEM (1X) (41966-029)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
<i>Smooth Muscle Basal Medium 2</i> (C22262)	PromoCell, Madison, Wisconsin, USA

### 3.1.11 Medienzusammensetzung

<u>Name</u>	<u>Substanz</u>	<u>Menge</u>
Medium I	Medium 199	500 ml
	P/S	5 ml
Medium II	Medium 199	500 ml
	P/S	5 ml
	FBS	50 ml
SMC-Medium I	<i>Smooth Muscle Growth Medium 2</i>	500 ml
	<i>Smooth Muscle Growth Medium 2 Supplement Mix</i>	1 Mix
	Normocin	1 ml
	FBS	50 ml
Medium III	DMEM	500 ml
	P/S	5 ml
Medium IV	<i>Smooth Muscle Basal Medium 2</i>	500 ml
	Normocin	1 ml
Medium V	<i>Smooth Muscle Basal Medium 2</i>	500 ml
	Normocin	1 ml
	FBS	100 ml

### 3.1.12 Mauslinien

<u>Offizielle Nomenklatur</u>	<u>Vereinfachte Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
B6.Cg-Trpc1 <sup>+</sup> Trpc3 <sup>+</sup> TRPC6 <sup>+</sup> /	TRPC WT	Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Prof. Alexander Dietrich, München, Deutschland

<p>B6.Cg-Trpc1<sup>tm1Lbi</sup> Trpc3<sup>tm1.1Akon</sup> Trpc6<sup>tm1Lbi</sup>/</p>	<p>TRPC1/3/6<sup>-/-</sup></p>	<p>Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Prof. Alexander Dietrich, München, Deutschland</p>
---	--------------------------------	--

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten TRPC1/3/6 Wildtyp Mäuse (TRPC WT Mäuse) und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse wurden von Prof. Dr. Alexander Dietrich, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, aus den vorhandenen TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen generiert und im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

### 3.1.13 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse der Zuchtlinie TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> zu etwa gleichen Teilen untersucht. Der Hintergrund beider Mauslinien war der Stamm C57BL/6J von der Firma Charles-River Deutschland GmbH. Die Generierung der singulären TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse ist bereits in der Literatur beschrieben (Dietrich 2005a; Malczyk 2017; Mayser 2020). TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse wurden durch Verpaarung der singulären TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse generiert.

Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 12 bis 16 Wochen alt und wogen mindestens 22 gr. Während des Versuchs wurden die Mäuse im offenen Kammersystem in Typ II lang Käfigen in der zentralen Tierhaltung des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten und mit Wasser (Leitungswasser) und Futter (Standarddiätfutter, Altromin 1324) ad libitum versorgt. Die Umgebungstemperatur betrug 22°C ± 2°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% ± 10% und einer Beleuchtungsdauer von 14 h pro Tag. Als *Enrichement* wurde den Tieren ein Haus, Nistmaterial sowie ein Beißholz zur Verfügung gestellt.

### 3.1.14 Tierversuchsgenehmigungen

Alle durchgeführten Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt und erfolgten unter Berücksichtigung der EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für

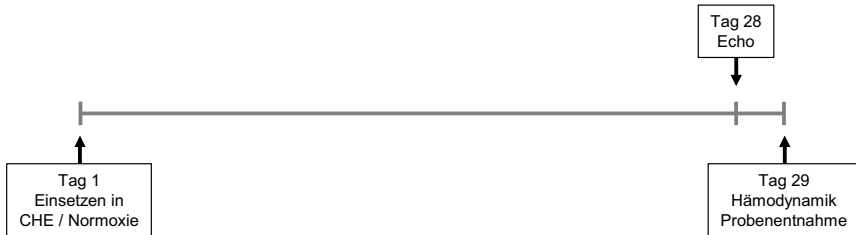
wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Die Tierversuchsanträge können unter folgenden Aktenzeichen des RP Gießen (GI 18/2) eingesehen werden:

- G10/2017: Die Rolle von TRP-Kanälen bei pulmonaler Hypertonie
  - G56/2019: Lungenerkrankungen und isolierte, perfundierte Lunge (ILU)
  - A115/2014: Isolation pulmonaler Zellen
- sowie
- G70/2019: Lungenerkrankungen - Isolation von Zellen

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Mausmodell: Chronische Hypoxieexposition

Die Dauer der Exposition betrug 28 Tage bei einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 10% in Hypoxie (chronische Hypoxieexposition, CHE) und einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 21% in Normoxie (Normoxieexposition, Nox). Um die Veränderungen des Herzens durch chronische Hypoxieexposition bewerten zu können, wurde nach 28-tägiger Normoxie- bzw. Hypoxieexposition eine echokardiografische Untersuchung durchgeführt. An Tag 29 wurden hämodynamische Messungen zur Ermittlung des RVSP, des systemischen arteriellen Drucks (*systemic arterial pressure*, SAP) und des linksventrikulären systolischen Drucks (*left ventricular systolic pressure*, LVSP) sowie eine finale Organentnahme durchgeführt. Die Herzen und Lungen wurden für immunhistochemische und molekularbiologische Analysen präpariert. Des Weiteren wurde die Entstehung einer RVH untersucht (**Abbildung 3.2.1**).



**Abbildung 3.2.1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs**

CHE = chronische Hypoxieexposition, Echo = Echokardiografie

### 3.2.2 Echokardiographie

Die echokardiographischen Messungen wurden mit Hilfestellung von Dr. med. vet. Simone Kraut durchgeführt. Zur Beurteilung der Herzfunktion wurde eine nicht invasive, transthorakale Doppler-/Echokardiographie durchgeführt.

Die Versuchsmäuse wurden in einer Narkosekammer mit einem 3 Vol.-%igem Isofluran-Sauerstoffgemisch anästhesiert und die Narkose im weiteren Verlauf mit einem Nasenkonus und einem 1,5 Vol.-%igen Isofluran-/Sauerstoffgemisch aufrechterhalten. Die Tiere wurden anschließend in Rückenlage auf einer Wärmeplatte mit integrierten Elektrokardiogramm (EKG)-Elektroden fixiert, was das simultane Aufzeichnen eines ein-Kanal-EKGs erlaubt. Eine Rektalsonde diente der Temperaturregulation der Wärmeplatte in Abhängigkeit der Körpertemperatur der Maus. Um eine ausreichende Bildqualität zu erhalten, wurden die Haare zunächst mittels Rasur und nachfolgend Enthaarungscreme am Thorax und kranialen Abdomen entfernt. Nach Auftragen eines Ultraschallgels wurde die Echokardiographie mit einem 30 MHz Doppler- und einem 30 MHz 2D- Linearschallkopf durchgeführt. Zur Analyse des rechtsventrikulären Remodellings wurde die Wandstärke (*right ventricular wall thickness*, RVWT) und der Innendurchmesser (*right ventricular internal diameter*, RVID) des RV erhoben, während die rechtsventrikuläre Funktion mithilfe des Herzminutenvolumens (*cardiac output*, CO), der *tricuspid annular plane systolic excursion* (TAPSE), des Verhältnisses von pulmonalarterieller Akzelerationszeit und rechtsventrikulärer Ejektionsdauer (*pulmonary artery acceleration time / right ventricular ejection time*, PAAT/RVET) und des echokardiografisch bestimmten PVR ( $PVR_{\text{echo}}$ ) untersucht wurde. Für die Untersuchung des linksventrikulären Remodellings wurden die Wandstärke (*left ventricular wall thickness*,

LVWT) und der Innendurchmesser (*left ventricular internal diameter*, LVID) des LV bestimmt. Die Messung der EF diente der Untersuchung der linksventrikulären Funktion. Eine ausführliche Beschreibung kann bei Hadzic et al. (2021), Pullamsetti et al. (2017) und Veith et al. (2020) nachgelesen werden (Hadzic 2021; Pullamsetti 2017; Veith 2020).

Die Versuchsmäuse wurden nach der Messung in ihre Käfige transferiert und für 5 bis 10 min, bis zum vollständigen Erlangen des Bewusstseins, beobachtet. Es folgte eine 1-stündige Erholungsphase in Normoxie bevor die Tiere wieder unter Experimentalbedingungen gehalten wurden.

### 3.2.3 Hämodynamische Messung

Die Versuchsmäuse wurden in einer Narkosekammer mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch (3 Vol%ige Anflutung) anästhesiert und die Narkose anschließend mithilfe eines Nasenkonus und einem 1,5 Vol.-%igen Isofluran-/Sauerstoffgemisch aufrechterhalten. Danach wurden die Tiere auf einer thermoregulierenden Unterlage in Rückenlage positioniert, die Vorderbeine mithilfe von Klebeband fixiert und Augensalbe aufgetragen. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch das Fehlen nozizeptiver Reflexe (Zwischenzehenreflex) überprüft und die Temperatur über eine Rektalsonde reguliert. Subkutan eingeführte EKG-Nadelelektroden auf Höhe des Thorax sowie die subkutan eingeführte Erdung im Bereich des Abdomens ermöglichten die Überwachung der Herzfrequenz. Nach Desinfektion der Haut im Halsbereich wurde diese medial eröffnet und die Trachea stumpf freipräpariert. Diese wurde kaudal des Kehlkopfes zwischen zwei Knorpelstangen durch einen kleinen Schnitt eröffnet. Über diesen wurde ein Tubus eingeführt und mithilfe eines Fadens fixiert. Nachfolgend konnte die Anästhesie über ein Beatmungssystem aufrechterhalten werden. Für die Messung wurde nun die rechte *Vena jugularis* freipräpariert, mit einem Faden möglichst kranial ligiert und über diesen gespannt. Mit einem weiteren umlegten Faden wurde ein Blutrückfluss von kardial verhindert. Anschließend wurde die *Vena jugularis* inzidiert, ein Millar Katheter eingeführt, vorgeschoben und so der RVSP gemessen. Auf gleiche Weise schloss sich die Messung des SAP sowie des LVSP über die rechte *Arteria carotis* an. Um einen Blutrückfluss von kardial zu verhindern, wurde an dieser Stelle ein Gefäßclip eingesetzt. RVSP, SAP und LVSP wurden digital erfasst und mit der Software LabChart aufgezeichnet. Nach intraperitonealer

Applikation von 500 I. E. Heparin pro 10 gr Körpergewicht (KGW) wurde die *Arteria carotis* durchtrennt. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Blutentzug. Für weitere Untersuchungen wurden Herz und Lunge präpariert, Blutplasma gewonnen sowie der Hämatokrit bestimmt.

### **3.2.4 Messung des Hämatokriten**

Für die Hämatokrit-Bestimmung wurden zwei Hämatokrit-Kapillaren mit dem zuvor entnommenen Blut gefüllt. Diese wurden mit Versiegelungswachs verschlossen und mit 15570 g (12800 rpm) für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Hämatokrit wurde anhand einer Hämatokrit-Skala abgelesen.

### **3.2.5 Präparation der Lunge**

Die Lungen wurden für immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen präpariert. Nach Eintritt des Todes wurde die Ventilation der Lunge über einen Tubus aufrechterhalten, um ein Kollabieren der Lungengefäße zu verhindern. Die Pleura wurde vom Thorax gelöst und die Rippenbögen zur Seite mittels Stecknadeln fixiert. Nach dem Entfernen des Thymus und Perikards wurde eine lockere Ligatur um Pulmonalarterie (PA) und Aorta gelegt. Es erfolgte ein transversaler Einschnitt in den RV, über welchen ein Katheter in die PA eingeführt und fixiert wurde. Die Lungengefäße wurden mit 0,9% Natriumchloridlösung und einem Druck von 22 cm Wassersäule perfundiert. Ein longitudinaler Einschnitt in den LV ermöglichte das Abfließen der isotonischen Natriumchloridlösung. Nach abgeschlossener Perfusion wurde diese zusammen mit der Ventilation beendet und der Katheter entfernt. Die rechte Lunge wurde mit einem Faden ligiert, abgetrennt und für molekularbiologische Untersuchungen in einem Reaktionsgefäß in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die linke Lunge wurde abermals mit einem reduzierten Atemvolumen ventiliert (100 µl). Nach erneutem Einführen und Fixieren des Katheters in die PA erfolgte eine weitere Perfusion der Gefäße der linken Lunge mit isotonischer Natriumchloridlösung. Die Ventilation der linken Lunge wurde beendet und die Alveolen mit isotonischer Natriumchloridlösung und einem Druck von 12 cm Wassersäule perfundiert. Nach Abbinden der Lunge wurden Spülkatheter und Tubus entfernt, die linke Lunge aus dem Thorax präpariert und für 24 h in einem Falcon Tube in 3,5%

Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur gelagert. Es folgte die Lagerung der Lungen in 4°C kalter DPBS für mindestens 24 h, bevor diese für 2 h in 50% Ethanol entwässert wurden. Die Dehydratation erfolgte in einem geschlossenen Vakuumgewebe-Infiltrationsautomaten über Nacht. Mithilfe einer Paraffinausgussstation wurden die Lungen eingebettet.

### 3.2.6 Ermittlung der Herzgewichte

Zur Bestimmung der RVH wurden die entnommenen Herzen von beiden Herzohren (*Auriculae atrii*) und dem Aortenbogen befreit. Die Herzen wurden in RV, LV und S aufgetrennt und die Segmente einzeln gewogen. Um das Maß der RVH zu bestimmen, wurde die Relation des Gewichts des RV zum Gewicht des LV und S berechnet. Außerdem wurde die Relation des Gewichts des RV zur Tibialänge ermittelt. Um das Maß der linksventrikulären Hypertrophie (LVH) zu beurteilen, wurde die Relation des Gewichts des LV plus S zur Tibialänge berechnet.

### 3.2.7 Immunhistochemische Färbung

Zur Beurteilung des Muskularisierungsgrades der Gefäße wurde von den in Paraffin eingebetteten Lungen der TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse 3 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Antikörpern gegen glattmuskuläres α-Aktin (*α-smooth muscle actin*, α-SMA) und von-Willebrand-Faktor (vWF) gefärbt. Diese Doppelfärbung wurde unter Verwendung des folgenden Protokolls durchgeführt (**Tabelle 3.2.1**).

**Tabelle 3.2.1: Protokoll der immunhistochemischen Färbung zur Bestimmung der Muskularisierung**

Schritt	Zeit	Reagenz	Anmerkung
1	60 min	Wärmeschrank	Deparaffinieren bei 60°C
2	3 x 10 min	Xylol	Lösen des Paraffins
3	2 x 5 min	Ethanol 99,6%	Rehydrierung
4	5 min	Ethanol 96%	Rehydrierung
5	5 min	Ethanol 70%	Rehydrierung
6	20 min	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Methanol Gemisch 3%	Inaktivierung endogener Peroxidasen

Material und Methoden

7	2 x 5 min	Aqua dest.	Waschschritt
8	5 min	Proteinase K	Proteolytische Demaskierung
9	1 min	Aqua dest.	Waschschritt
10	4 x 5 min	PBS	Waschschritt
11	20 min	BSA 10%	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
12	4 x 5 min	PBS	Waschschritt
13	30 min	Rodent Block M (MM HRP Polymer Kit)	Blockierung endogener Maus IgG
14	4 x 5 min	PBS	Waschschritt
15	30 min	Primärantikörper $\alpha$ -SMA	1:700 in <i>Antibody Diluent</i>
16	4 x 5 min	PBS	Waschschritt
17	20 min	MM HRP Polymer	Blockierung endogener Maus IgG
18	4 x 5 min	PBS	Waschschritt
19	30 s - 4 min	Vector VIP Substrat Kit	Violette Färbung der glatten Muskulatur
20	5 min	H <sub>2</sub> O	Waschschritt
21	5 min	PBS	Waschschritt
22	15 min	BSA 10%	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
23	2 x 5 min	PBS	Waschschritt
24	20 min	2,5% Normal Horse Serum (ImmPRESS Kit Anti Rabbit Ig)	Serumblock
25	30 min	Primärantikörper vWF	37°C, 1:2000 in <i>Antibody Diluent</i>
26	4 x 5 min	PBS	Waschschritt
27	30 min	ImmPress REAGENT Anti Rabbit Ig Peroxidase	Sundärantikörper
28	4 x 5 min	PBS	Waschschritt
29	4 s - 5 min	DAB Substrat Kit	Braune Färbung des Endothels
30	5 min	H <sub>2</sub> O	Waschschritt

## Material und Methoden

31	3 min	Methylgrün	60°C, grüne Färbung der Zellkerne
32	1 min	Aqua dest.	Waschschritt
33	2 x 10 s	Ethanol 96%	Dehydrierung
34	2 x 10 s	Isopropylalkohol	Dehydrierung
35	3 x 10 s	Xylol	
36		Eindecken mit Pertex	

Dazu wurde die 20fach konzentrierte PBS zu einfach konzentrierter PBS verdünnt und der pH mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Die nach diesem Protokoll gefärbten Lungenschnitte wurden mithilfe eines Lichtmikroskops und der Leica Computersoftware Qwin V3 ausgewertet. Da sich glatte Muskelzellen in dieser Doppelfärbung violett und Endothelzellen braun darstellen, erlaubt die Software eine kolorimetrische Detektion.

Die Schnitte wurden bei 400facher Vergrößerung mäanderförmig ausgezählt, wobei nur jede zweite Reihe analysiert wurde. Somit wurde ungefähr die Hälfte des Gewebeschnittes für die Auswertung herangezogen.

Je nach Anteil der violetten Färbung am Gesamtbereich der Gefäßmedia wurden die Gefäße in nicht-muskularisierte Gefäße (Muskularisierung  $\leq 5\%$ ), teil-muskularisierte Gefäße (Muskularisierung  $> 5\% - \leq 70\%$ ) und voll-muskularisierte Gefäße (Muskularisierung  $> 70\%$ ) kategorisiert. Eine zweite Einteilung erfolgte in Abhängigkeit des Gefäßdurchmessers in kleine Gefäße (20 - 70  $\mu\text{m}$ ), mittlere Gefäße (71 - 150  $\mu\text{m}$ ) und große Gefäße ( $> 150 \mu\text{m}$ ). Ausgewerteter Parameter in der vorliegenden Arbeit ist der Anteil der  $\alpha$ -SMA positiven Areale der *Tunica media* aller kleinen Lungengefäße, welcher fortlaufend als mittlerer Muskularisierungsgrad bezeichnet wird.

### 3.2.8 Picro-Sirius Red Färbung

Zur Bestimmung des Kollagengehalts wurden 3 µm dicke Schnitte der in Paraffin eingebetteten RV und LV sowie Lungen angefertigt. Anschließend erfolgte die *Picro-Sirius Red* Färbung nach folgendem Protokoll (**Tabelle 3.2.2**).

**Tabelle 3.2.2: Protokoll der Picro-Sirius Red Färbung**

Schritt	Zeit	Reagenz	Anmerkung
1	60 min	Wärmeschrank	Deparaffinieren bei 60°C
2	3 x 10 min	Xylol	Lösen des Paraffins
3	2 x 5 min	Ethanol 99,6%	Rehydrierung
4	5 min	Ethanol 96%	Rehydrierung
5	5 min	Ethanol 70%	Rehydrierung
6	wenige s	Aqua dest.	Waschschritt
7	60 min	<i>Picro-Sirius Red</i>	
8	2 x 10 s	Essigsäure 0,5%	Waschschritt
9	3 x 10 s	Ethanol 99,6%	Dehydrierung
10	2 x 10 s	Xylol	
11		Eindecken mit Pertex	

Die Auswertung der nach diesem Protokoll gefärbten Gewebeschnitte erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops und der Leica Computersoftware Qwin V3.

Durch Bindung des *Picro-Sirius Red* Farbstoffs an kollagenhaltiges Bindegewebe wird dieses rot angefärbt, während das umliegende Gewebe, das kein Kollagen enthält, gelb dargestellt wird.

Die Schnitte wurden bei 400facher Vergrößerung mäanderförmig ausgewertet. Dabei wurde nur jede zweite Reihe analysiert, sodass ungefähr die Hälfte des Gewebeschnittes für die Auswertung herangezogen wurde. Somit ergab sich die Auswertung von 40 bis 70 Bildern pro RV und LV sowie 70 bis 150 Bildern pro Lunge.

Die Herz und Lunge umgebende, kollagenhaltige Bindegewebshülle (Epikard bzw. Pleura) wurde nicht in die Auswertung miteinbezogen. Der Gesamtkollagengehalt des RV und LV sowie der Lunge errechnet sich aus dem Mittelwert aller erhobenen Einzelbilder.

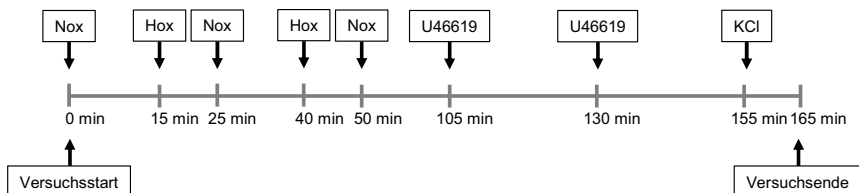
### **3.2.9 Isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Lunge**

TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mithilfe einer intraperitonealen Injektion, bestehend aus Ketaminhydrochlorid (1 mg/10 gr KGW) und Xylazin (0,2 mg/10 gr KGW), unter Zugabe von Heparin (500 I. E./10 gr KGW) zur Antikoagulation, anästhesiert. Um eine ausreichende Narkosetiefe zu gewährleisten, wurde das Fehlen nozizeptiver Reflexe (Zwischenzehenreflex) überprüft und das Tier anschließend in senkrechter Position an einer Korkunterlage fixiert. Nach Entfernung der Haut von der Bauchmitte bis zum Unterkiefer erfolgte die Freilegung der Trachea durch die Entfernung von Speicheldrüsen und ventraler Halsmuskulatur. Es wurde eine lockere Ligatur um die Trachea gelegt und diese kranial des Fadens inzisiert. Nach erfolgter Intubation wurde der Tubus mithilfe der Ligatur fixiert und die Lunge mit normoxischem Gas (21% O<sub>2</sub>) ventiliert. Dabei verhinderte ein positiv endexpiratorischer Druck von 3 cm Wassersäule ein Kollabieren der Alveolen. Die Inzision der Bauchdecke entlang des Rippenbogens ermöglichte die Eröffnung des Diaphragmas entlang dessen kostaler Verbindung. Anschließend wurde das Sternum durchtrennt und die Rippenbögen zur Seite fixiert. Thymus und Fettgewebe sowie Perikard wurden entfernt, eine lockere Ligatur um PA und Aorta gelegt und ein kleiner Einschnitt in den LV gesetzt. Nach Inzisieren des RV erfolgte die Einführung eines Katheters in die PA und dessen Fixierung mithilfe der Ligatur. Über diesen Katheter erfolgte die Perfusion der Lunge mit einer 4°C kalten Elektrolytlösung und einer geringen Durchflussrate. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Perfusat über den LV abfließt und kein Rückstau über das linke Herzohr und die Lungengefäße entsteht.

Schließlich wurden Herz und Lunge aus dem Thorax präpariert und ein Katheter zum Abfließen des Perfusats in den LV eingeführt. Um ein Auskühlen und Austrocknen der Lunge zu verhindern, wurde ein doppelwandiges Gefäß um die Lunge aufgebaut. Dieses wurde mit feuchten Tüchern präpariert und mittels Wasser beheizt. Nachdem die Lunge vollständig blutfrei perfundiert war, wurde der Kreislauf geschlossen, die Durchflussrate auf eine

Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min langsam erhöht und die Temperatur auf 40°C eingestellt. Gleichzeitig erfolgte die Erhöhung des Atemzugvolumens auf 10 µl/gr KGW.

Während der Messung wurden Änderungen des PAP, des Beatmungsdrucks sowie des linksventrikulären Drucks über Drucksensoren erfasst. Diese wurden über einen Transducer digitalisiert und mithilfe der Software LabChart aufgezeichnet. Im ersten Schritt der Messung erfolgte eine 15-minütige Ventilation mit normoxischem Gas gefolgt von einer 10-minütigen Ventilation mit hypoxischem Gas (10% O<sub>2</sub>) nach etabliertem Protokoll (**Weißmann** 2006). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, bevor sich eine erneute, 15-minütige Ventilation mit normoxischem Gas anschloss. Danach erfolgte die Gabe des synthetischen Thromboxan A2 Analogons U46619 (9,11-Dideoxy-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -methanoepoxyprostaglandin F $2\alpha$ ) mit einer Endkonzentration von 0,57 nmol/l in das Perfusionsmedium. Die oben genannten erhobenen Parameter wurden über 25 min aufgezeichnet und die Gabe von U46619 anschließend wiederholt. Zuletzt wurde KCl mit einer Endkonzentration von 11,25 mmol/l in das Perfusat appliziert und über 10 min ausgewaschen (**Abbildung 3.2.2**). Die Zeitintervalle nach Gabe von U46619 sowie KCl wurden so gewählt, dass der aufgezeichnete PAP seinen Ausgangswert vor der jeweils folgenden Intervention wieder erreicht hatte. Die Messungen der isolierten, ventilerten und blutfrei perfundierten Lungen wurden unter Hilfestellung von Lisa Schaffelhofer durchgeführt.



**Abbildung 3.2.2:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der isolierten, ventilerten und blutfrei perfundierten Lunge

Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, U46619 = 9,11-Dideoxy-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -methanoepoxyprostaglandin F $2\alpha$ , KCl = Kaliumchlorid

### 3.2.10 Myographie von isolierten Blutgefäßen

Für die isometrische Messung der kontraktilen Aktivität systemischer Blutgefäße wurde ein 4-Kammern-Myographensystem verwendet. Dafür wurden Aorten aus TRPC WT und

TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert, von Fettgewebe befreit und bis zu 3 Tage in Medium III inkubiert. Die Messung erfolgte, wie von Strielkov et al. (2020) beschrieben, nach Herstellerangaben unter Verwendung von physiologischer Salzlösung und physiologischer Salzlösung mit hohem Kaliumanteil (Strielkov 2020). Die Myographie-Versuche wurden von Frau Dr. rer. nat. Fenja Knöpp durchgeführt.

### **3.2.11 Isolierung und Kultivierung muriner pulmonalarterieller glatter Muskelzellen**

Die Versuchsmäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion, bestehend aus Ketaminhydrochlorid (1 mg/10 gr KGW) und Xylazin (0,2 mg/10 gr KGW), anästhesiert, dem Heparin (500 I. E./10 gr KGW) zur Antikoagulation zugegeben wurde. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch das Fehlen nozizeptiver Reflexe (Zwischenzehenreflex) überprüft. Nach Fixation der Tiere in Rückenlage erfolgte die Desinfektion von Brust- und Bauchwand. Das Abdomen wurde in der Medianen von kaudal nach kranial eröffnet und die Tiere durch Einschneiden der *Vena cava caudalis* und *Aorta abdominalis* durch Blutentzug getötet.

Beginnend kaudal des *Sternums* wurde die Haut nach kranial bis zur *Mandibula* in der Medianen eröffnet und Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens gesetzt. Das Diaphragma wurde im Verlauf des Rippenbogens eingeschnitten, der Thorax im *Sternum* eröffnet und seitlich fixiert. Nach Entfernen von Fettgewebe und Thymus, wurden PA und Aorta mit einem Faden unterlegt. Anschließend wurde sowohl der RV als auch der LV inzisiert. Ein Katheter wurde in die PA eingeführt, fixiert und über diesen die Lungengefäße mit DPBS gespült. Der Einschnitt im LV gewährleistete den Abfluss von DPBS und verhinderte damit die Entstehung eines Ödems. Es schloss sich die Applikation eines 37°C warmen Agarose-Eisen-Gemischs über den Katheter in die Lungengefäße an. Anschließend wurde die Trachea freipräpariert, über einen kleinen Schnitt eröffnet und mittels eines Katheters intubiert. Über diesen Katheter erfolgte die Instillation eines 37°C warmen Agarose-Gemischs. Nach Freipräparation der Lunge aus dem Thorax wurde diese zur Verfestigung der Agarose in 4°C kalte DPBS transferiert.

Zur weiteren Isolation der PASMC wurden die Lungenlappen unter einer Sterilbank vom restlichen Gewebe getrennt und mithilfe von drei Scheren mechanisch zerkleinert. Im Anschluss wurden die mit Eisenpartikeln behafteten Gewebestücke unter Zuhilfenahme eines

magnetischen Konzentrierers mit DPBS gewaschen. Das Hinzufügen einer Kollagenaselösung (80 U/ml) und die anschließende Inkubation der Zellen für 55 bis 60 min bei 37°C führte zum enzymatischen Verdau, bevor dieser durch Zugabe von Medium II gestoppt wurde. Eine weitere mechanische Zerkleinerung der Gewebestücke erfolgte mit Kanülen der Größen 15 G und 18 G. Die mit Eisen behafteten Gewebestücke wurden nun mehrfach mit Medium II gewaschen und mithilfe des magnetischen Konzentrierers vom übrigen Gewebe getrennt. Die weitere Kultivierung erfolgte in SMC-Medium I für 5 bis 7 Tage (Aussaat 1, Passage 0) bei 37°C. Für die Überführung in eine neue Aussaat wurden die Gefäßstücke abgenommen, mit DPBS gewaschen und auf eine neue Kulturschale in SMC-Medium I ausgesät (Aussaat 2, Passage 0). Dabei wurde die Aussaat 1 mit frischem SMC-Medium I versehen. Nach 3 bis 5 Tagen erfolgte eine weitere Aussaat (Aussaat 3, Passage 0). Spätestens 15 Tage nach Isolation wurden die Aussaaten 1 bis 3 mithilfe von 1-fach Trypsin von der Kulturschale gelöst und bei 338 g (1200 rpm) für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und eine definierte Anzahl von Zellen pro cm<sup>2</sup> auf eine Kulturschale ausgesät. Die normoxische Exposition der PASMC erfolgte bei 21% O<sub>2</sub>, die hypoxische Exposition bei 1% O<sub>2</sub>. Bei beiden Konditionen lag eine CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% vor.

### 3.2.12 Proliferationsassay

Für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens von PASMC, deren Zellzahl zu Beginn des Versuchs nicht bekannt ist, wurde das Click-iT Edu Alexa Fluor 488 *Imaging Kit* verwendet und der Versuch nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Der Einbau von 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) führt dazu, dass bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm Licht mit der Wellenlänge 519 nm (grün) emittiert wird. Die Fluoreszenzemission kann anschließend mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden.

Ein Hypoxie-induzierter Anstieg der Proliferationsrate ist bereits bekannt (**Malczyk** 2017). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Deletion von TRPC1, 3 und 6 lediglich unter chronischer Hypoxie untersucht.

Die frisch isolierten PASMC wurden in Aussaat 1 auf 24-Well Platten ausgesät und für 120 h in Hypoxie kultiviert. 24 h vor Versuchsende erfolgte die Zugabe von 10 µM EdU. Nach Versuchsablauf wurden die Zellen nach Protokoll in **Tabelle 3.2.3** gefärbt.

Tabelle 3.2.3: Protokoll der EdU Färbung

Schritt	Zeit	Reagenz	Anmerkung
1	1 min	DPBS	Waschschritt
2	5 min	Aceton/Methanol (1:1)	Fixierung und Permeabilisierung
3	1 min	DPBS	Waschschritt
4	5 min	BSA 3%	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
5	20 min	Click-iT Färbelösung	Färbung
6	1 min	BSA 0,1%	Waschschritt
7	1 min	Hoechst (5 $\mu$ M)	Zellkernfärbung

Die Fluoreszenzemission wurde von Frau Dr. rer. nat. Monika Brosien mittels des Fluoreszenzmikroskops DMI6000 CS detektiert.

Die Auszählung der EdU-positiven (EdU<sup>+</sup>) und Hoechst-positiven (Hoechst<sup>+</sup>) Zellen erfolgte mithilfe der Leica Las X Software. Die DNA-Syntheserate oder Proliferationsrate wurde durch Relation der EdU<sup>+</sup>- zu Hoechst<sup>+</sup>-Zellen in Prozent berechnet (**Abbildung 3.2.3**).

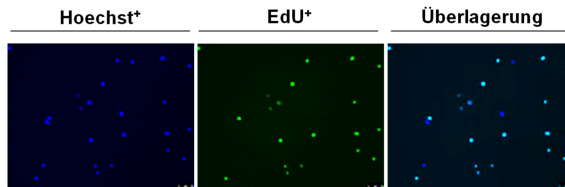


Abbildung 3.2.3: Repräsentative Bilder der mit Hoechst und EdU angefärbten PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen bei 100facher Vergrößerung.

### 3.2.13 Migrationsassay

Die Migration von PASMC wurde mithilfe des Incucyte® *Chemotaxis Analysis Software* Moduls untersucht. Da ein Hypoxie-induzierter Anstieg der Migrationsrate bereits bekannt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Deletion von TRPC1, 3 und 6 lediglich unter chronischer Hypoxie analysiert (**Malczyk 2017**).

Dazu wurden PASMIC unter Hypoxie für 72 h kultiviert. Anschließend wurden 20000 Zellen pro cm<sup>2</sup> der Passage 1 im Doppelsatz in die obere Kammer auf eine Membran einer Incucyte® *Clearview 96-Well Plate* für Chemotaxis in Medium IV ausgesät. In das untere Reservoir wurde Medium V pipettiert. Anschließend wurden die Zellen unter hypoxischen Bedingungen im Incucyte® *ZOOM* kultiviert und die obere Seite und untere Seite der Membran stündlich über eine Dauer von 48 h fotografiert. Die Auswertung des Migrationsverhaltens erfolgte mithilfe der Software Incucyte® *ZOOM*. Die Versuche zum Migrationsverhalten von PASMIC wurden unter Hilfestellung von Frau Dr. rer. nat. Monika Brosien durchgeführt.

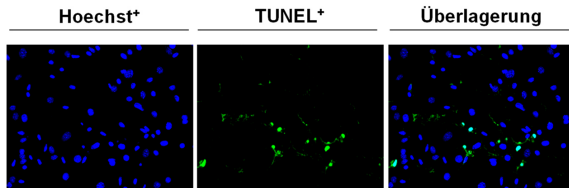
### 3.2.14 Apoptoseassay

Um die Apoptose von PASMIC zu untersuchen, wurde das *Click-iT™ Plus TUNEL-Assay-Kit* für In Situ Apoptose-Detektion verwendet. Hierzu wurden 10000 Zellen pro cm<sup>2</sup> der Passage 1 in SMC-Medium I ausgesät und für 72 h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen nach Protokoll in **Tabelle 3.2.4** gefärbt.

**Tabelle 3.2.4: Protokoll der Apoptose Färbung**

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Reagenz</u>	<u>Anmerkung</u>
1	1 min	DPBS	Waschschritt
2	5 min	Aceton/Methanol (1:1)	Fixierung und Permeabilisierung
3	1 min	DPBS	Waschschritt
4	60 min	TdT Reaktionslösung	37°C, Markierung
5	2 x 5 min	BSA 3%	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
6	30 min	Click-iT Färbelösung	37°C, Färbung
7	5 min	BSA 3%	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
8	1 min	Hoechst (5 µM)	Zellkernfärbung

Die Detektion der Fluoreszenzemission wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops DMI6000 CS von Frau Dr. rer. nat. Monika Brosien durchgeführt und mittels einer Kamera fotografiert. Die Anzahl der apoptotischen Zellen wurde mithilfe der LAS X Software ausgezählt. Dabei wurde die Apoptoserate durch Relation der apoptotischen Zellen (TUNEL positive Zellen, TUNEL<sup>+</sup>) zur Gesamtzahl aller Zellen (Hoechst<sup>+</sup>) in Prozent berechnet (**Abbildung 3.2.4**).



**Abbildung 3.2.4:** Repräsentative Bilder der apoptotischen und mit Hoechst angefärbten PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen bei 100facher Vergrößerung.

### 3.2.15 Calciummessungen

Die Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$  in PASMC erfolgte mit Fura-2-Acetoxy-methylester (Fura 2-AM). Fura 2-AM ist ein ratiometrischer  $Ca^{2+}$ -Indikator, der aufgrund seiner lipophilen Estergruppe membrangängig ist. Esterasen im Zytosol entfernen die Estergruppe und verhindern so ein Entweichen zurück in den Extrazellulärraum. Die Bindung von freiem cytosolischem  $Ca^{2+}$  an Fura 2-AM verursacht bei einer Fluoreszenzemission von 510 nm eine Signalzunahme bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und eine Signalabnahme bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm. Die Fluoreszenzemission bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm ist konstant und somit unabhängig von der  $[Ca^{2+}]_i$  (isobestischer Punkt). Über die Änderung der Relation zwischen 340 nm und 380 nm können Rückschlüsse auf die Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgen. Je größer der Quotient ist, desto größer ist die  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Zelle. Dieser ist unabhängig vom Beladungszustand der Zelle mit Fura 2-AM.

Die PASMC wurden direkt im Anschluss an die Isolation auf 35 mm  $\mu$ -Ibidi Kulturschalen mit Glasboden ausgesät und für 120 h in Hypoxie inkubiert. Versuche erfolgten mit den Substanzen Cyclopiazonsäure (*cyclopiazonic acid*, CPA) und 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG). Dabei wurde die Dosierung der Substanzen nach einem etablierten Protokoll gewählt (**Malczyk**

2017). In Experimenten mit der Substanz CPA wurden die PASMIC zunächst mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Hepes-Ringer-Lösung ( $\text{HR}^-$ ) gewaschen und eine Stunde in  $\text{HR}^-$  in der Hypoxie-Kammer bei  $37^\circ\text{C}$  präinkubiert. Danach schloss sich die Beladung der Zellen mit  $5\ \mu\text{M}$  Fura 2-AM für 30 min an. In Versuchen mit der Substanz OAG wurden die PASMIC direkt im Anschluss an das Waschen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Hepes-Ringer-Lösung ( $\text{HR}^+$ ) mit Fura 2-AM beladen. Für die Messungen wurden vor Versuchsstart  $500\ \mu\text{l}$   $\text{HR}^-$  bzw.  $\text{HR}^+$  auf die Zellen vorgelegt und die Kulturschalen mit dreilagigem Parafilm verschlossen, um eine Reoxygenierung während des Versuchs zu verhindern. Um eine Messtemperatur von  $37^\circ\text{C}$  zu erhalten, wurden die Ibidi Kulturschalen in einen erwärmten Mikroskop-Objekttisch eingesetzt. Die Calciummessungen erfolgten unter der Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops und der Software LAS X.

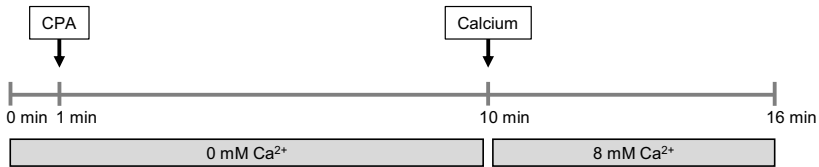
Bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm wurde bei 200facher Vergrößerung ein Messbereich ausgewählt und die Zellen bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm markiert. Während der Messung erfolgte die Aufzeichnung der Emissionswerte bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm mit einer Aufnahme Frequenz von 5 s.

Die Substanz CPA wurde 1 min nach Messbeginn (Endkonzentration  $100\ \mu\text{M}$ ) appliziert und die extrazelluläre Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) nach 10 min erhöht (Endkonzentration 8 mM). Die Emissionswerte wurden für weitere 6 min aufgezeichnet (**Abbildung 3.2.6**). In Untersuchungen mit der Substanz OAG lag bei Messbeginn eine  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von 2,2 mM vor. OAG (Endkonzentration  $100\ \mu\text{M}$ ) wurde 2 min nach Messbeginn appliziert und die Reaktion der Zellen für weitere 8 min aufgezeichnet (**Abbildung 3.2.7**).

Bei hypoxisch inkubierten Zellen erfolgte die Applikation der Substanzen mithilfe eines von Ibidi angefertigten Metallrings, der passgenau auf die verwendeten Ibidi Schalen aufgesetzt werden konnte. Dieser ermöglichte die Applikation von Substanzen über vier Zläufe unter hypoxischen Bedingungen (**Abbildung 3.2.5**).

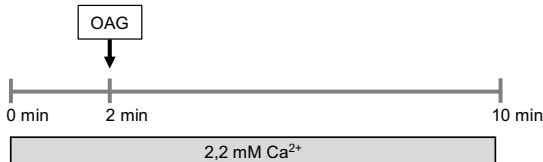


**Abbildung 3.2.5:** Für Calciummessungen verwendeter Metallring zur Applikation von Substanzen unter hypoxischen Bedingungen



**Abbildung 3.2.6:** Schematische Darstellung der Calciummessungen mit der Substanz Cyclopiazonsäure

Zu Beginn der Messung wurden die basalen Fluoreszenzemissionswerte aufgezeichnet. 1 Minute (min) nach Messbeginn wurde die Substanz Cyclopiazonsäure (*cyclopiacetic acid*, CPA) (Endkonzentration 100  $\mu\text{M}$ ) appliziert und die extrazelluläre Calciumkonzentration nach 10 min erhöht (Endkonzentration 8 mM). Die Aufzeichnung der Fluoreszenzemissionswerte erfolgte für weitere 6 min.

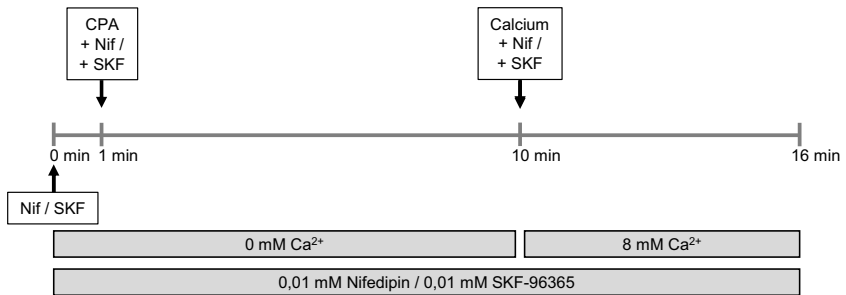


**Abbildung 3.2.7:** Schematische Darstellung der Calciummessungen mit der Substanz 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol

In den Versuchen mit der Substanz 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) lag bei Messbeginn eine  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von 2,2 mM vor. Zunächst wurden die basalen Fluoreszenzemissionswerte aufgezeichnet. OAG (Endkonzentration 100  $\mu\text{M}$ ) wurde 2 Minuten (min) nach Messbeginn appliziert und die Reaktion der Zellen für weitere 8 min aufgezeichnet.

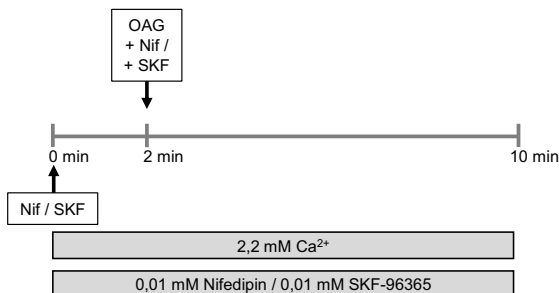
Um den Einfluss der Deletion von TRPC1, 3 und 6 Proteinen auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von PASMC unter hypoxischen Bedingungen genauer zu untersuchen, schlossen sich weitere Calciummessungen an. Dazu wurden erneut Versuche hypoxisch inkubierter Zellen mit den Substanzen CPA und OAG nach beschriebenem Protokoll durchgeführt. Hierbei erfolgte die Zugabe von Nifedipin (Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$ ) bzw. SKF-96365 (Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$ ) (**Abbildung 3.2.8** und **Abbildung 3.2.9**). Die verwendeten Konzentrationen von Nifedipin und

SKF-96365 wurden dabei mithilfe von Vorversuchen überprüft. Nifedipin ist ein spezifischer Inhibitor spannungsabhängiger L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle während es sich bei SKF-96365 um einen unspezifischen TRPC-Inhibitor handelt. Mit Pyr3 bzw. 8009-5364 stehen zwar bereits spezifische Inhibitoren für TRPC3 bzw. TRPC6 zur Verfügung, jedoch ist für TRPC1 derzeit kein spezifischer Inhibitor vorhanden (Kiyonaka 2009; Urban 2012). Daher wurde für die Messungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf den unspezifischen TRPC-Inhibitor SKF-96365 zurückgegriffen.



**Abbildung 3.2.8:** Schematische Darstellung der Calciummessungen mit den Substanzen Cyclopiazonsäure und Nifedipin bzw. SKF-96365

Zu Beginn der Messung wurden die basalen Fluoreszenzemissionswerte aufgezeichnet. Cyclopiazonsäure (*cyclopiacnic acid*, CPA) (Endkonzentration  $100 \mu\text{M}$ ) wurde 1 Minute (min) nach Messbeginn wurde die Substanz appliziert und die extrazelluläre Calciumkonzentration nach 10 min erhöht (Endkonzentration 8 mM). Die Aufzeichnung der Fluoreszenzemissionswerte erfolgte für weitere 6 min. Während der gesamten Messung lag eine Nifedipin (Nif)- oder SKF-96365-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  vor.

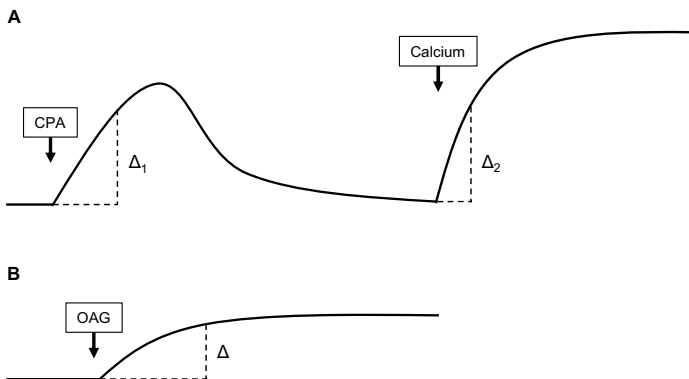


**Abbildung 3.2.9:** Schematische Darstellung der Calciummessungen mit der Substanz 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol und Nifedipin bzw. SKF-96365

In den Versuchen mit der Substanz 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) lag bei Messbeginn eine  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von 2,2 mM vor. Zunächst wurden die basale Fluoreszenzemissionswerte aufgezeichnet. OAG (Endkonzentration  $100 \mu\text{M}$ )

wurde 2 Minuten (min) nach Messbeginn appliziert und die Reaktion der Zellen für weitere 8 min aufgezeichnet. Während der gesamten Messung lag eine Nifedipin (Nif)- oder SKF-96365-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  vor.

Für die Auswertung der Versuche wurde die Relation der Messwerte bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm abzüglich des Hintergrunds kalkuliert. Dabei wurden sowohl die basale Relation der Fluoreszenzsignale als auch die maximale Relation der Fluoreszenzsignale nach Gabe von CPA, OAG und extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  verglichen, die Aufschlüsse über die basale bzw. maximale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  geben. Zudem wurden die Steigungen  $\Delta$ ,  $\Delta_1$  und  $\Delta_2$  als Maß für den Anstieg der Signalratio pro Sekunde ermittelt, mit deren Hilfe sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromgeschwindigkeit beurteilen lässt (**Abbildung 3.2.10**).



**Abbildung 3.2.10: Schematische Darstellung der Auswertung der Calciummessungen** mit A) Cyclopiazonsäure (*cyclopiaconic acid*, CPA) und B) 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)

### 3.2.16 RNA Isolation

Die Isolierung der RNA erfolgte aus murinen RV und LV sowie aus isolierten PSMC mithilfe des *Rneasy® Mini Kits*.

Für die RNA Isolation aus Gewebe wurden Mikroschraubröhrchen mit ca. 20 Keramikkügelchen, 350  $\mu\text{l}$  RLT Puffer und 3,5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol bei 4°C vorbereitet. Das Herzgewebe wurde mithilfe eines Mörsers zerkleinert und ca. 30 mg in ein Mikroschraubröhrchen transferiert. Anschließend wurde das Gewebe bei 4°C und 6800 g homogenisiert (2 x 30 s) und in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 18620 g (14000 rpm)

für 10 min zentrifugiert. Für die RNA Gewinnung aus PASCs wurden Zellen der Passage 0 verwendet und mit 100 µl RLT Puffer und 1 µl β-Mercaptoethanol bei 4°C lysiert. Die Isolation der RNA erfolgte nach Herstellerprotokoll ohne DNase Verdau.

Die gewonnene RNA wurde in RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>) und 280 nm (OD<sub>280</sub>) am NanoDrop gemessen. Mithilfe des Quotienten beider Wellenlängen konnte die Reinheit der isolierten RNA evaluiert werden.

### 3.2.17 Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion

Das Umschreiben der gewonnenen RNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) erfolgte mithilfe von reverser Transkriptase und einer Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (*iScript™ cDNA Synthesis Kit*) nach Herstellerprotokoll. Pro Probe wurden 400 ng bis 800 ng RNA umgeschrieben und 1 µl *iScript Reverse Transcriptase* und 4 µl *iScript Reaction Mix* verwendet. Das Endvolumen betrug 20 µl. Folgendes Protokoll wurde angewendet (**Tabelle 3.2.5**).

**Tabelle 3.2.5: Protokoll der RT-PCR**

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Anmerkung</u>
1	5 min	25°C	Vorbereitung
2	20 min	46°C	Reverse Transkription
3	1 min	95°C	Inaktivierung der reversen Transkriptase
4	∞	4°C	

### 3.2.18 Relative Quantifizierung mittels Echtzeit PCR

Die Untersuchung der Genexpression erfolgte mithilfe relativer Quantifizierung mittels Echtzeit PCR (*real-time semi-quantitative PCR*, RTqPCR). Der Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green* in doppelsträngige DNA ermöglicht die Quantifizierung der DNA mittels Fluoreszenzmessungen. Pro Ansatz wurden 200 ng cDNA, 5,5 µl *SYBR Green Supermix*, 3,5 µl DNase freies Wasser, 0,25 µl *forward* und 0,25 µl *reverse* Primer verwendet.

**Tabelle 3.2.6: Protokoll der semi-quantitativen Echtzeit PCR**

<u>Schritt</u>	<u>Phase</u>	<u>Zyklen</u>	<u>Anmerkung</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>
1	Enzymaktivierung und Denaturierung	1	Denaturierung	3 min	95°C
2	Amplifikation	42	Denaturierung Hybridisierung Polymerisation	5 s 10 s 10 s	95°C 59°C 72°C
3	Schmelzkurve	1	Denaturierung Hybridisierung	30 s 30 s	95°C 65°C

Da der Einbau von *SYBR Green* in DNA unspezifisch erfolgt, wurde nach jeder RTqPCR eine Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung auf Kontamination und Primer-Dimere durchgeführt. Ein Temperaturanstieg von 65°C auf 95°C führt zur Auftrennung der doppelsträngigen DNA und zur Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs. Die Schmelztemperatur ist dabei abhängig von der Produktgröße. Somit weisen die größeren Fragmente des Zielgens eine höhere Schmelztemperatur auf als die kleineren Fragmente, die durch Verunreinigungen oder Primer-Dimere entstehen.

Der *cycle threshold* Wert (Ct-Wert) gibt den Amplifikationszyklus der RTqPCR an, an dem die Fluoreszenzemission erstmalig exponentiell ansteigt und sich signifikant vom Hintergrund unterscheidet. Zur Berechnung des  $\Delta$ Ct-Wertes wird der Ct-Wert des Zielgens vom Ct-Wert des Referenzgens subtrahiert. Als Referenzgen zur Untersuchung der PASMCM wurde  $\beta$ -Mikroglobulin (*B<sub>2m</sub>*) und zur Untersuchung des LV und RV Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (*Hprt1*) verwendet.

### 3.2.19 Proteinextraktion

Für die Proteinisolation wurden PASMCM der Passage 0 verwendet und mit 100  $\mu$ l Lysepuffer bei 4°C lysiert. Anschließend wurden die Proben in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 18620 g (14000 rpm) für 10 min zentrifugiert und die mit Eisenpartikeln behafteten Gewebestücke unter Zuhilfenahme eines magnetischen Konzentrierers entfernt.

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des *DC Protein Assay* bestimmt. Dazu wurde eine Standardreihe (0,2 mg/ml bis 1,6 mg/ml) aus BSA-Lösung als Referenz und Lysepuffer als

Leerwert verwendet. Es wurde je 5 µl Lysepuffer, Standard und Probe im Doppelansatz auf eine 96-Well Mikroplatte pipettiert. Die Zugabe weiterer Substanzen erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die Messung der Absorption erfolgte mithilfe eines *Microplate Readers* und der Software iControl bei einer Wellenlänge von 750 nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Standardreihe bestimmt.

### 3.2.20 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße wurde die Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) verwendet. Die Konzentration des Gels wurde nach der Größe des Zielproteins gewählt und das Gel unter Verwendung von *TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit* nach Herstellerprotokoll gefertigt. Für die Herstellung des Trenngels wurden 3 ml Resolver A, 3 ml Resolver B, 30 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS) in dH<sub>2</sub>O und 3 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) verwendet. Dieses wurde anschließend mit einem Sammelgel folgender Zusammensetzung überschichtet: 1 ml Stacker A, 1 ml Stacker B, 10 µl 10% APS in dH<sub>2</sub>O und 2 µl TEMED.

Während der 1-stündigen Polymerisation des zweiphasigen Gels bei Raumtemperatur erfolgte die Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese. Um die Proteinkonzentration aller Proben anzugleichen, wurden diese mit Lysepuffer verdünnt und so eine Proteinmenge von 20 µg eingesetzt. Anschließend wurde β-Mercaptoethanol und 4fach konzentrierter NuPage LDS Ladepuffer hinzugefügt. Danach wurden die Proben in einem Heizblock für 10 min bei 95°C aufgekocht und anschließend bei 19 g (450 rpm) für 5 s zentrifugiert. Ein Proteinstandard, der auf das Gel aufgetragen wurde, diente als Skala für die Molekülmasse. Schließlich wurde die Gelelektrophorese (120 V, 400 mA, 150 W) in Laufpuffer (Lämmli-Puffer) für ca. 2 h unter Verlaufskontrolle durchgeführt.

### 3.2.21 Trizin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Detektion von Zielproteinen mit einer Größe <20 kDa wurde eine Trizin-SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurde ein 16,5% Gel angefertigt (**Tabelle 3.2.7**). Das Trenngel wurde

zunächst für 5 bis 10 min mit Ethanol überdeckt, bevor dieses abgegossen und das Sammelgel aufgetragen wurde.

**Tabelle 3.2.7: Protokoll zur Herstellung eines 16,5% SDS-Polyacrylamid-Gels**

	<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
Glycerin	0,8 g	
Acrylamid 40%	2,5 ml	0,194 ml
Bisacrylamid 2%	1,56 ml	0,12 ml
Gel-Puffer	2,06 ml	0,47 ml
H <sub>2</sub> O		1,06 ml
TEMED	9,4 µl	3,2 µl
APS 10%	94 µl	32 µl

Nach Polymerisation des Gels und Vorbereitung der Proben wurde die Gelelektrophorese (1.: 80 V für 15 min und 2.: 110 V für 1 h und 45 min) unter Verwendung eines Anoden- und Kathodenpuffers für ca. 2 h unter Verlaufskontrolle durchgeführt.

### 3.2.22 Western Blot

Das Western- bzw. Immunoblotverfahren diente der quantitativen Bestimmung der Proteine mithilfe spezifischer Antikörper und erfolgte im *Semidry-Blot*-Verfahren. Nach Verwendung der SDS-PAGE wurde eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran zunächst in Methanol für 1 s aktiviert und danach in Transferpuffer gelegt. Bei Anwendung der Trizin-SDS-PAGE erfolgte das Western Blot Verfahren unter Zuhilfenahme einer Nitrocellulose-Membran, die ohne Aktivierung in Transferpuffer gelegt wurde. Zudem wurden vier Whatman-Filter ebenfalls in Transferpuffer getränkt und Fließpapier, PVDF- oder Nitrocellulose-Membran und Gel in folgender Reihenfolge (von unten nach oben) aufeinandergelegt: 2x Fließpapier, PVDF- oder Nitrocellulose-Membran, Gel, 2x Fließpapier.

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine erfolgte elektrophoretisch im *Trans-Blot Turbo Transfer System* bei 0,1 mA und 100 V für 35 min. Danach wurde die Membran in 6% Milchpuffer (Milchpulver gelöst in Waschpuffer) für 1 h bei Raumtemperatur geblockt, um die Anlagerung der Antikörper an unspezifische Bindungsstellen zu verhindern.

Die Membran wurde bei 4°C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Dabei wurde der Primärantikörper Anti- $\beta$ -Actin in einem Verhältnis von 1:50000, alle anderen Primärantikörper in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt. Um Proteine unterschiedlicher Größe auf derselben Membran darstellen zu können, wurde die Membran in zwei bis drei Teile geschnitten. Der Schnitt wurde dabei unter Zuhilfenahme des Proteinstandards gesetzt.

Am Folgetag wurde die Membran fünf bis sieben Mal für jeweils 5 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit den Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Dazu wurden die Sekundärantikörper Anti-*Mouse* IgG und Anti-*Rabbit* IgG in einem Verhältnis von 1:5000 und der Sekundärantikörper Anti-*Goat* IgG in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt. Nach erneutem fünfmaligem Waschen erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden. Dazu wurde die Membran in Abhängigkeit vom Zielprotein mit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detecion Reagent*, *Clarity Western ECL Substrate* oder *Clarity Max Western ECL Substrate* benetzt. Das Substrat reagiert mit der Peroxidase der Sekundärantikörper unter Erzeugung einer Chemilumineszenz, deren Signal mit dem *ChemiDoc MP Imaging System* detektiert wurde. Die Auswertung erfolgte mittels der Computersoftware *Image Lab™*.

Um die Membran anschließend mit neuen Antikörpern inkubieren zu können, wurden die entstandenen Bindungen mithilfe eines *Stripping*-Puffers gelöst. Dazu wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in *Stripping*-Puffer gelegt, zwei Mal für 5 min gewaschen, erneut geblockt und mit dem neuen Primärantikörper inkubiert.

### **3.2.23 Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

Für die Untersuchung der Konzentrationen des Angiotensin-konvertierenden Enzyms 2 (*angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2), des Angiotensinogens (*angiotensinogen*, AGT) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (*angiotensin-converting enzyme*, ACE) wurden Plasmaproben von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Normoxie- bzw. Hypoxieexposition verwendet und *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) durchgeführt. Dazu wurden das *Mouse ACE2 ELISA Kit*, das *Mouse AGT SimpleStep ELISA Kit* und das *Mouse ACE SimpleStep ELISA Kit* verwendet und nach jeweiligem Herstellerprotokoll durchgeführt. In jedem Kit war ein spezifischer Standard für die Standardreihe enthalten.

Diese diente zudem als positive Kontrolle. Als negative Kontrolle diente die im jeweiligen *Kit* enthaltene Pufferlösung.

Zur Bestimmung der ACE2-Konzentration wurden die Plasmaproben im Verhältnis 1:2 verdünnt. Nach 90-minütiger Inkubation von Standardprotein, Negativkontrolle und Plasmaproben bei 37°C, wurde die Mikroplatte mit *Biotinylated anti-Mouse ACE2 Antibody* für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach mehrfachem Waschen erfolgte eine weitere Inkubation mit *Avidin-Biotin-Peroxidase Complex* für 30 min bei 37°C für die nachfolgende Farbreaktion. Hierfür wurde nach erneutem Waschen das *TMB Color Developing Agent* hinzugefügt und die Mikroplatte für 20 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von *TMB Stop Solution* gestoppt und die Platte innerhalb von 30 min bei 450 nm im *Microplate Reader* mittels der Software SparkControl™ ausgelesen.

Für die Untersuchung der AGT-Konzentration wurden die Plasmaproben im Verhältnis 1:2000 verdünnt und anschließend zusammen mit der Standardreihe und der Negativkontrolle auf die im *Kit* enthaltene Mikroplatte aufgetragen. Die Platte wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen. Danach erfolgte die Farbreaktion mit *TMB Development Solution* für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Farbreaktion wurde bei 600 nm mithilfe des *Microplate Readers* und der Software SparkControl™ visualisiert.

Zur Bestimmung der ACE-Plasmakonzentration wurden die Plasmaproben im Verhältnis 1:400 verdünnt. Nach einstündiger Inkubation der Platte mit Standardprotein, Negativkontrolle und Plasmaproben bei Raumtemperatur wurde die Platte gewaschen und anschließend die Farbreaktion mit *TMB Development Solution* induziert. Diese wurde minütlich über eine Dauer von 10 min mithilfe des *Microplate Readers* und der Software SparkControl™ bei 600 nm ausgelesen und der 7. Messzyklus für die Analyse verwendet.

Die Auswertung der Plasmakonzentrationen erfolgte mithilfe einer in Excel generierten Standardkurve, die anhand der jeweiligen Standardreihe erstellt wurde. Die Detektionslimits betragen laut Herstellerangaben 10 pg/ml für das *Mouse ACE2 ELISA Kit*, 49,9 pg/ml für das *Mouse AGT SimpleStep ELISA Kit* und 24 pg/ml für das *Mouse ACE SimpleStep ELISA Kit*.

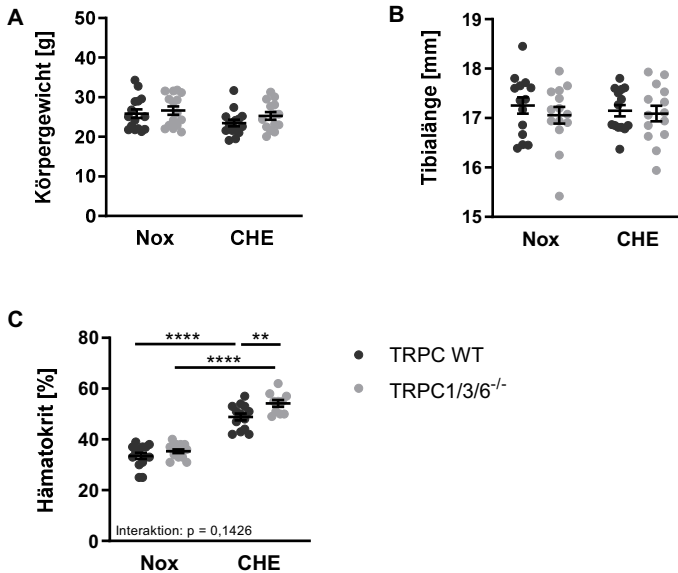
### 3.2.24 Statistik

Die Erstellung der Graphen sowie die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 6.07. Alle Daten wurden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) angegeben. Beim Vergleich zweier Stichproben miteinander wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Wurden mehrere Stichproben verschiedener Gruppen miteinander verglichen, erfolgte die statistische Auswertung mithilfe einer *two-way* Anova und eines *post-hoc* Tests nach Sidak. Die n-Zahl (entspricht der Anzahl der Tiere) wurde in der jeweiligen Abbildungsbeschreibung angegeben. Als signifikantes Ergebnis wurden p-Werte  $< 0,05$  definiert und mit „\*“ gekennzeichnet. Des Weiteren wurden p-Werte  $< 0,01$  mit „\*\*“, p-Werte  $< 0,001$  mit „\*\*\*“ und p-Werte  $< 0,0001$  mit „\*\*\*\*“ angegeben. Signifikante Ergebnisse, die sich bei der Auswertung mithilfe des *post-hoc* Tests nach Sidak ergaben, wurden in den Abbildungen über den dargestellten Werten angegeben. Hingegen wurden signifikante Ergebnisse der Auswertung mittels *two-way* Anova neben der Legende (Genotypeneffekt) bzw. unter der Achsenbeschriftung (Konditionseffekt) gekennzeichnet. Ergaben sich bei der Analyse signifikante Ergebnisse, wurde zudem die Interaktion in der jeweiligen Abbildung angegeben. Erfolgte die Auswertung der Ergebnisse anders als hier beschrieben, wurde diese in der jeweiligen Abbildungsbeschriftung näher erläutert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung der Linien TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup>

Um mögliche Auswirkungen der globalen Deletion der *Trpc1*, *3* und *6* Gene auf den Phänotypen zu erkennen, wurden Körpergewicht, Tibiallänge und Hämatokrit der TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach Normoxie- bzw. Hypoxieexposition ermittelt. Für das Körpergewicht konnten keine Unterschiede zwischen TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden (**Abbildung 4.1.1 A**). Es betrug nach normoxischer Exposition für TRPC WT Mäuse  $25,8 \pm 1,1$  gr und für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse  $26,6 \pm 1,0$  gr, während sich nach hypoxischer Exposition ein Körpergewicht von  $23,5 \pm 0,8$  gr für TRPC WT Mäuse und  $25,3 \pm 1,0$  gr für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse ergab. Auch die Tibiallänge zeigte zwischen den Genotypen keine Unterschiede nach Normoxieexposition (TRPC WT Mäuse:  $17,3 \pm 0,2$  mm und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse:  $17,1 \pm 0,2$  mm) und CHE (TRPC WT Mäuse:  $17,1 \pm 0,1$  mm und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse:  $17,1 \pm 0,2$  mm) (**Abbildung 4.1.1 B**). Eine CHPH geht in den meisten Fällen mit einer Erhöhung des Hämatokriten einher. Somit ist dieser Parameter ein guter Indikator für das Funktionieren des chronisch hypoxischen Modells. Für beide Genotypen ergab sich ein signifikanter Anstieg des Hämatokriten nach CHE (TRPC WT Mäuse:  $49 \pm 1\%$  und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse:  $54 \pm 1\%$ ) im Vergleich zu den Normoxie-exponierten Tieren (TRPC WT Mäuse:  $34 \pm 1\%$  und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse:  $35 \pm 1\%$ ) (**Abbildung 4.1.1 C**). Auffällig war hier, dass mittels *post-hoc* Test ein signifikant höherer Hämatokrit bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach CHE im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden konnte. Die Interaktion war jedoch nicht signifikant.



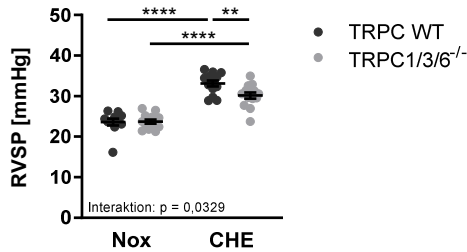
**Abbildung 4.1.1:** Einfluss der chronischen Hypoxie auf physiologische Parameter

A) Körpergewicht, B) Tibialänge und C) Hämatokrit von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 11 - 15). Signifikanter Unterschied, wenn \*\* (p<0,01); \*\*\*\* (p<0,0001).

## 4.2 Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Entstehung einer chronischen Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie

### 4.2.1 Hämodynamische Messungen

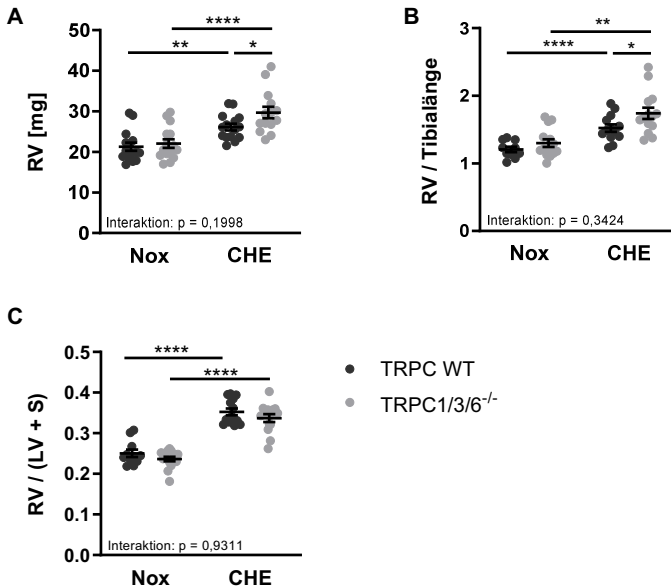
Um die Auswirkung des Dreifachknockouts auf die Entstehung einer PH im Mausmodell zu untersuchen, wurden hämodynamische Messungen an TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Normoxie- bzw. Hypoxieexposition durchgeführt. Dabei zeigten TRPC WT Mäuse nach CHE einen signifikant erhöhten RVSP ( $33,1 \pm 0,7$  mmHg) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $24,2 \pm 0,7$  mmHg). Ein signifikanter Anstieg des RVSP ergab sich auch für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse mit  $30,2 \pm 0,7$  mmHg (CHE) und  $23,8 \pm 0,5$  mmHg (Nox), allerdings war dieser Anstieg signifikant geringer gegenüber TRPC WT Mäusen nach CHE (**Abbildung 4.2.1**).



**Abbildung 4.2.1: Einfluss der chronischen Hypoxie auf den RVSP**

Rechtsventrikulärer systolischer Druck (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 11 - 14). Signifikanter Unterschied, wenn \*\* (p<0,01); \*\*\*\* (p<0,0001).

Weiterhin wurde der Einfluss des Dreifachknockouts auf die RVH analysiert. Dazu wurde das Gewicht des RV bestimmt und in Relation zum Gewicht des LV plus S (Fulton Index) sowie zur Tibiallänge gesetzt. Letzteres diente dazu, Abweichungen aufgrund unterschiedlicher Körpergrößen zu vermeiden. Beide Genotypen wiesen einen signifikanten Anstieg des rechtsventrikulären Gewichts zwischen normoxischer (TRPC WT Mäuse: 21,3 ± 1,0 mg und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse: 22,1 ± 1,1 mg) und hypoxischer (TRPC WT Mäuse: 26,1 ± 0,8 mg und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse: 29,7 ± 1,4 mg) Exposition auf. Zudem ergab sich für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse ein signifikant höheres rechtsventrikuläres Gewicht nach CHE im Vergleich zu TRPC WT, jedoch ergab die Interaktion keinen signifikanten Unterschied (**Abbildung 4.2.2 A**). Die gleichen Veränderungen konnten für das Verhältnis aus Gewicht des RV und der Tibiallänge festgestellt werden (TRPC WT Mäuse Nox: 1,2 ± 0,1 und CHE: 1,5 ± 0,1; TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse Nox: 1,3 ± 0,1 und CHE: 1,7 ± 0,1) (**Abbildung 4.2.2 B**). Auch der Fulton Index zeigte für TRPC WT Mäuse nach CHE (0,4 ± 0,01) einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,3 ± 0,01). Dieser ergab sich auch für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse mit 0,3 ± 0,01 (CHE) und 0,2 ± 0,01 (Nox). Jedoch ergab sich sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen kein Unterschied des Fulton Index zwischen TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 4.2.2 C**).



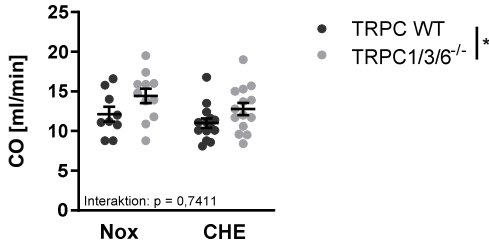
**Abbildung 4.2.2: Auswirkung von chronischer Hypoxie auf die RVH**

A) Gewicht des rechten Ventrikels (RV), B) Verhältnis aus Gewicht des RV und der Tibialänge und C) Verhältnis aus Gewicht des RV und Gewicht des linken Ventrikels (LV) plus Septum (S) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 10 - 15). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05); \*\* (p<0,01); \*\*\*\* (p<0,0001).

#### 4.2.2 Echokardiografische Messungen

Um den Einfluss von TRPC1, 3 und 6 Proteinen auf die kardiale Funktion bei Entstehung der CHPH zu eruieren, wurden echokardiografische Messungen durchgeführt. Gezeigt werden die echokardiografischen Parameter, die nach 28-tägiger Normoxie- bzw. Hypoxieexposition erhoben wurden.

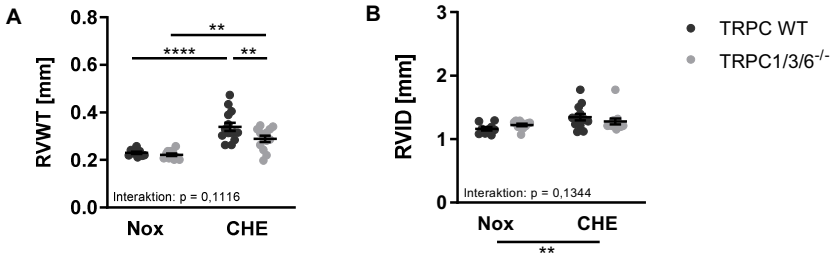
Um einen möglichen Einfluss der CHPH auf die Herzleistung zu bestimmen, wurde der CO ermittelt. Dabei zeigten TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse einen signifikant höheren CO sowohl nach Normoxieexposition (14,4 ± 0,9 ml/min) als auch nach CHE (12,8 ± 0,8 ml/min) im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe (TRPC WT Mäuse Nox: 12,1 ± 0,9 ml/min und CHE: 11,0 ± 0,6 ml/min). Es war kein signifikanter Unterschied zwischen Normoxie- und Hypoxieexposition bei beiden Genotypen zu sehen (**Abbildung 4.2.3**).



**Abbildung 4.2.3: Echokardiografische Messung des CO nach CHE**

Herzminutenvolumen (*cardiac output*, CO) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 9 - 14). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05).

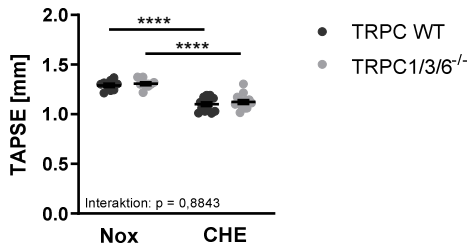
Neben dem Verhältnis aus Gewicht des RV zu Gewicht des LV plus S, diente die RVWT als Maß für die - mit der CHPH einhergehenden - RVH. Für TRPC WT Mäuse ergab sich ein signifikanter Anstieg der RVWT nach Hypoxieexposition ( $0,34 \pm 0,02$  mm) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,23 \pm 0,01$  mm). Ein signifikanter Anstieg der RVWT zeigte sich ebenfalls für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse mit  $0,29 \pm 0,01$  mm (CHE) und  $0,22 \pm 0,01$  mm (Nox). Jedoch war die RVWT der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach CHE signifikant geringer im Vergleich zu TRPC WT Mäusen nach CHE. Allerdings zeigte die Interaktion keinen signifikanten Unterschied (**Abbildung 4.2.4 A**). Weiterhin wurde der RVID erhoben, um den Dilatationsgrad des RV zu ermitteln. Dieser zeigte einen signifikanten CHE-induzierten Anstieg für TRPC WT (CHE:  $1,34 \pm 0,05$  mm und Nox:  $1,16 \pm 0,03$  mm) und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse (CHE:  $1,28 \pm 0,05$  mm und Nox:  $1,22 \pm 0,02$  mm) (**Abbildung 4.2.4 B**).



**Abbildung 4.2.4: Echokardiografische Messung der RVWT und des RVID nach CHE**

A) Rechtsventrikuläre Wandstärke (*right ventricular wall thickness*, RVWT) und B) rechtsventrikulärer Innendurchmesser (*right ventricular internal diameter*, RVID) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 9 - 14). Signifikanter Unterschied, wenn \*\* (p<0,01); \*\*\*\* (p<0,0001).

Die TAPSE diente als Maß für die systolische Funktion des RV. Beide Mauslinien zeigten einen signifikanten Unterschied der TAPSE zwischen Normoxieexposition (TRPC WT Mäuse: 1,29 ± 0,02 mm und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse: 1,31 ± 0,01 mm) und CHE (TRPC WT Mäuse: 1,10 ± 0,02 mm und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse: 1,12 ± 0,02). Hingegen konnte zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied festgestellt werden (**Abbildung 4.2.5**).

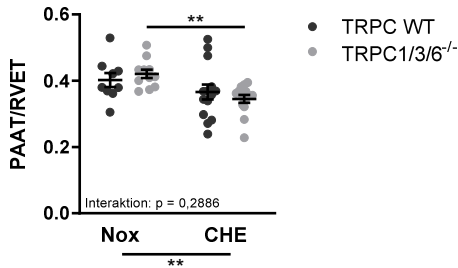


**Abbildung 4.2.5: Echokardiografische Messung der TAPSE nach CHE**

*Tricuspid annular plane systolic excursion* (TAPSE) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 9 - 14). Signifikanter Unterschied, wenn \*\*\*\* (p<0,0001).

Das Verhältnis der PAAT zur RVET (PAAT/RVET-Quotient) dient als Maß für die Nachlast des RV sowie der Schwere der PH. Zudem korreliert der PAAT/RVET-Quotient negativ mit dem RVSP. Der PAAT/RVET-Quotient zeigte für TRPC WT Mäuse mit 0,37 ± 0,02 (CHE) und 0,40 ±

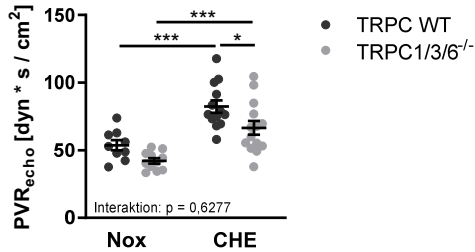
0,02 (Nox) und für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse mit  $0,35 \pm 0,01$  (CHE) und  $0,42 \pm 0,01$  (Nox) einen signifikanten Hypoxie-Effekt. Zudem war der PAAT/RVET-Quotient der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach CHE signifikant reduziert (**Abbildung 4.2.6**).



**Abbildung 4.2.6: Echokardiografische Messung des Quotienten aus PAAT und RVET nach CHE**

Quotient aus pulmonalarterieller Akzelerationszeit (*pulmonary artery acceleration time*, PAAT) und rechtsventrikulärer Ejektionsdauer (*right ventricular ejection time*, RVET) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 9 - 14). Signifikanter Unterschied, wenn \*\* (p<0,01).

Der PVR<sub>echo</sub> dient dazu, die vorliegende, durch Rechtsherzkatheterisierung zu ermittelnde, PVR und damit auch die Nachlast des RV abzuschätzen. TRPC WT Mäuse zeigten nach CHE ( $82,4 \pm 4,6$  dyn \* s / cm<sup>2</sup>) einen signifikanten Anstieg des PVR<sub>echo</sub> gegenüber TRPC WT Mäusen nach Normoxieexposition ( $53,8 \pm 3,7$  dyn \* s / cm<sup>2</sup>). Ein signifikant erhöhter PVR<sub>echo</sub> ergab sich auch für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse mit  $66,6 \pm 5,1$  dyn \* s / cm<sup>2</sup> (CHE) und  $41,4 \pm 2,4$  dyn \* s / cm<sup>2</sup> (Nox), welcher jedoch signifikant geringer im Vergleich zu TRPC WT Mäusen nach CHE war. Hingegen war die Interaktion nicht signifikant (**Abbildung 4.2.7**).

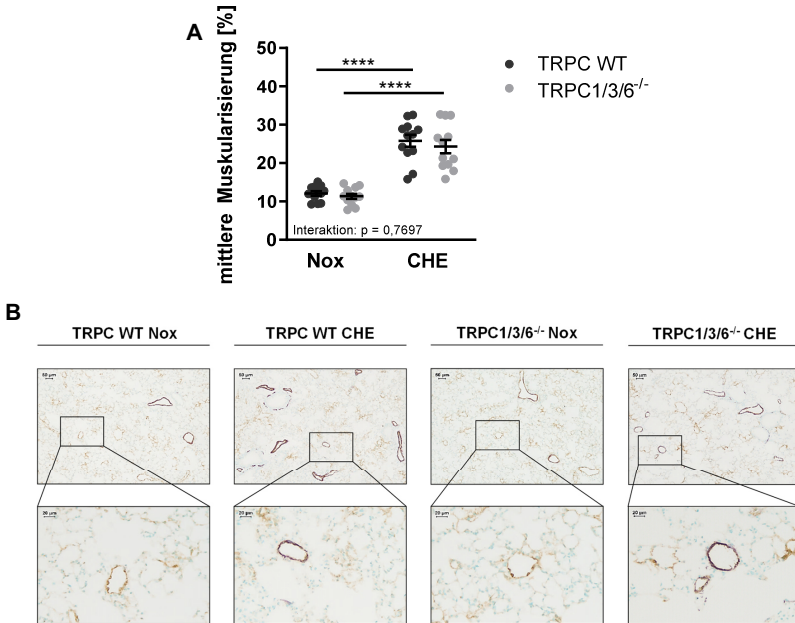


**Abbildung 4.2.7: Berechnung des PVR<sub>echo</sub> mithilfe echokardiografischer Messungen nach CHE**

Echokardiografisch bestimmter pulmonaler vaskulärer Widerstand (*pulmonary vascular resistance*, PVR<sub>echo</sub>) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 9 - 14). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05); \*\*\* (p<0,001).

#### 4.2.3 Histologische Bestimmung des Muskularisierungsgrades der Lungengefäße

Der signifikante Anstieg des RVSP und das Vorliegen einer RVH zeigt an, dass sowohl TRPC WT Mäuse als auch TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach 28-tägiger Hypoxieexposition eine CHPH entwickeln. Dieses Ergebnis sollte durch die Analyse des vaskulären Remodellings, ein weiterer Pathomechanismus der CHPH, mithilfe einer histologischen Analyse des Muskularisierungsgrades der peripheren Lungengefäße bestätigt werden. Nach CHE waren 25,8 ± 1,6% (TRPC WT Mäuse) und 25,1 ± 2,0% (TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse) der *Tunica media* aller kleinen Lungengefäße (20 - 70 µm) α-SMA-positiv und somit muskularisiert. Damit weisen beide Gruppen einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu ihrer Normoxie-exponierten Kontrollgruppe auf (TRPC WT Mäuse: 12,1 ± 0,6% und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse: 11,3 ± 0,6%) (**Abbildung 4.2.8 A**).



**Abbildung 4.2.8: Einfluss der chronischen Hypoxie auf den Muskularisierungsgrad kleiner Lungengefäße**

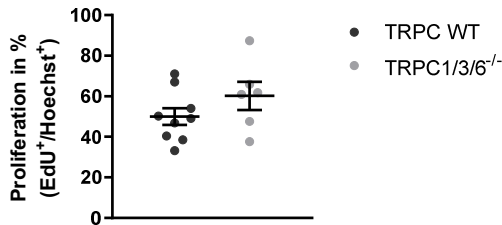
A) Mittlerer Muskularisierungsgrad von Lungengefäßen mit einem Durchmesser von 20 - 70 µm von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 12); B) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung für den von-Willebrand Faktor (braun) und glattmuskuläres α-Aktin (violett) der Übersicht (100fache Vergrößerung) und Nahansicht (400fache Vergrößerung) von Lungenschnitten von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen. Signifikanter Unterschied, wenn \*\*\*\* (p<0,0001).

### 4.3 Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf PASMC nach chronischer Hypoxieexposition

#### 4.3.1 Proliferation

Wie in der Literatur beschrieben, kommt es durch chronische Hypoxieexposition zu einem gesteigerten Proliferationsverhalten von PASMC (Malczyk 2017). Um den Einfluss der Deletion der *Trpc1*, *3* und *6* Gene auf die Proliferation von PASMC unter chronischer Hypoxie zu analysieren, wurden PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und nach 120 h

Hypoxieexposition mithilfe des Click-iT Edu Alexa Fluor 488 *Imaging Kits* untersucht. Die Proliferationsrate betrug für PASMNC aus TRPC WT Mäusen  $50,0 \pm 4,2\%$  und für PASMNC aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen  $60,2 \pm 6,9\%$ . Folglich konnte kein signifikanter Unterschied der Proliferationsrate zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden (**Abbildung 4.3.1**).

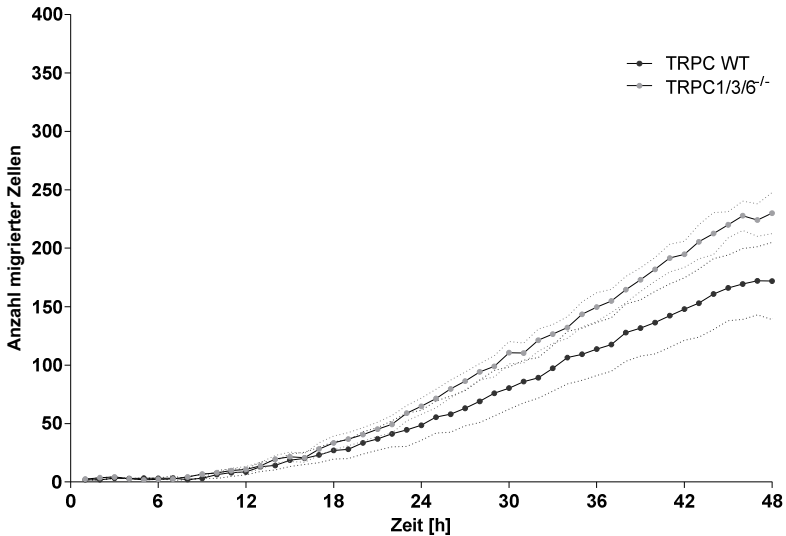


**Abbildung 4.3.1: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Proliferationsrate von PASMNC**

Proliferationsrate von PASMNC isoliert aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 120 Stunden Hypoxieexposition (Hox; 1% O<sub>2</sub>) (n = 6 - 9). Es wurde die Relation der 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) positiven (EdU<sup>+</sup>) zu Hoechst positiven (Hoechst<sup>+</sup>) PASMNC ermittelt.

#### 4.3.2 Migration

Bei CHPH kommt es neben einem Anstieg der Proliferationsrate zu einer gesteigerten Migration der PASMNC (**Malczyk 2017**). Um den Einfluss des Dreifachknockouts auf die Migration von PASMNC unter chronischer Hypoxie zu untersuchen, wurde diese mittels Chemotaxis analysiert. Die PASMNC beider Genotypen waren charakterisiert durch eine positive Chemotaxis in Richtung FBS-haltiges Medium. Für PASMNC isoliert aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen konnte dabei kein Unterschied festgestellt werden (**Abbildung 4.3.2**).

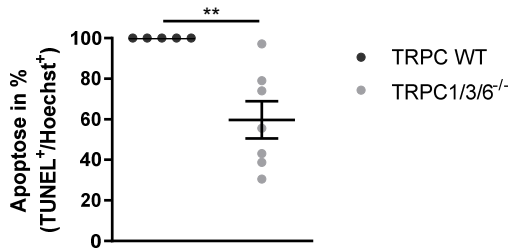


**Abbildung 4.3.2: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Migrationsrate von PASC**

Chemotaxis von PASC isoliert aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach Hypoxieexposition (1% O<sub>2</sub>). Nach 72 Stunden Hypoxieexposition wurde die Chemotaxis der PASC über einen Zeitraum von 48 Stunden aufgezeichnet. Die fotografische Dokumentation erfolgte stündlich (n = 5). Zur statistischen Analyse wurde die Steigung der jeweiligen linearen Regressionsgerade bestimmt.

### 4.3.3 Apoptose

Im Rahmen des Remodellings der Tunica media kommt es zu einer Abnahme der Apoptose von PASC (Schermuly 2011; Stenmark 2018). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob das Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine die Apoptose von PASC beeinflusst. Dabei konnte nach 72-stündiger Hypoxieexposition eine signifikant reduzierte Apoptoserate für PASC aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu TRPC WT Mäusen festgestellt werden (Abbildung 4.3.3).



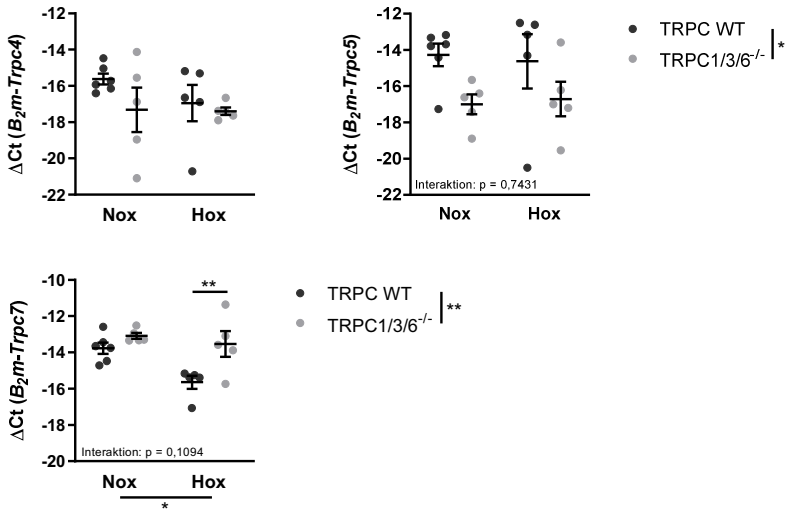
**Abbildung 4.3.3: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Apoptoserate von PASC**

Apoptoserate von PASC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 72 Stunden Hypoxieexposition (n = 5 - 7). Dazu wurde die Relation der apoptotischen PASC (TUNEL<sup>+</sup>) zu Hoechst positiven (Hoechst<sup>+</sup>) PASC ermittelt.

#### 4.3.4 Genexpression

Die Bedeutung der TRPC1, 3 und 6 Proteine für die Entstehung von CHPH konnte bislang auf molekularer Ebene nicht geklärt werden. Um die veränderte funktionelle Reaktion von PASC isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach Hypoxieexposition weiter zu analysieren, wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Genexpression von *Trpc4*, 5 und 7 sowie auf den Speicher-vermittelten Calcium-Signalweg gelegt.

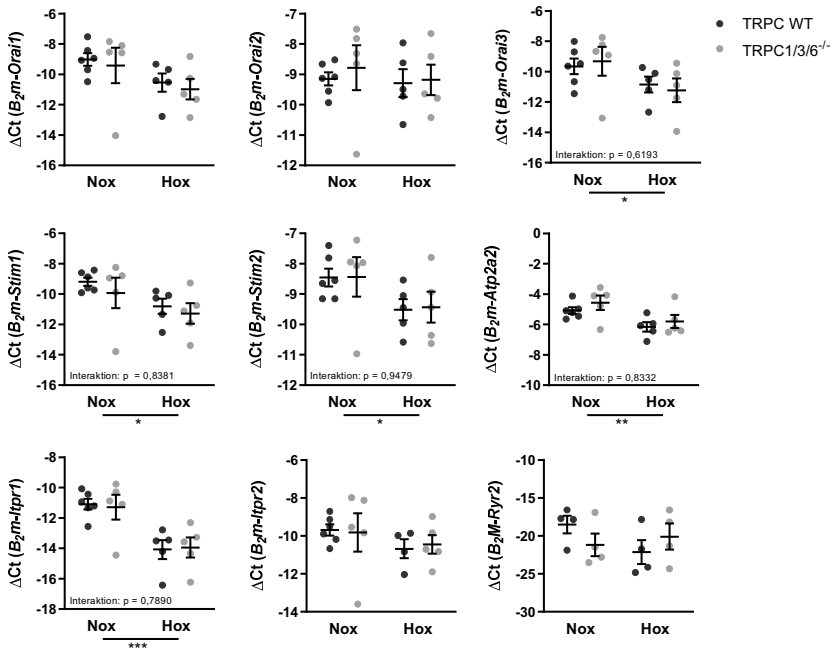
Für *Trpc5* konnte eine signifikant reduzierte Genexpression in PASC der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu TRPC WT Mäusen festgestellt werden (**Abbildung 4.3.4**). Im Gegensatz dazu zeigten PASC der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant höhere Expression von *Trpc7* verglichen mit TRPC WT Mäusen. Zudem war die Expression von *Trpc7* nach Hypoxieexposition sowohl für PASC aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> als auch für PASC aus TRPC WT Mäusen signifikant reduziert. Dabei ergab sich nach Hypoxieexposition für PASC aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen, im Unterschied zu TRPC WT Mäusen, eine signifikant höhere Expression von *Trpc7*. Die Interaktion war jedoch nicht signifikant (**Abbildung 4.3.4**). Für die Expression von *Trpc4* in PASC konnten keine Unterschiede zwischen TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden (**Abbildung 4.3.4**).



**Abbildung 4.3.4: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die TRPC mRNA-Expression in PASC**

Genexpression von *Trpc4*, *5* und *7* in PASCs isoliert aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 120-stündiger Hypoxie- (Hox; 1% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (21% O<sub>2</sub>, Nox) (n = 5 - 6). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p < 0,05); \*\* (p < 0,01).

Für die weitere Analyse des Speicher-vermittelten Calcium-Signalwegs erfolgte die Untersuchung der Genexpression der Orai1, 2 und 3 Proteine, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Weiterhin wurde die Genexpression der im ER bzw. SR lokalisierten Stim1 und 2, der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren 1 und 2 (IP<sub>3</sub>R1 und IP<sub>3</sub>R2 bzw. *Itpr1* und *Itpr2*), der Calcium-ATPase des SR Isoform 2 (*SR/ER calcium ATPase isoform 2*, SERCA2 bzw. *Atp2a2*) und des Ryanodin-Rezeptors 2 (*ryanodine receptor*, Ryr2) untersucht. Während für die Genexpression von *Orai1* und *Orai2* keine Unterschiede zwischen den PASCs isoliert aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden konnten, zeigte sich eine signifikant reduzierte Expression des *Orai3* Gens nach Hypoxieexposition in PASCs aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 4.3.5**). Sowohl für *Stim1* und *Stim2* als auch für *Itpr1* und *Atp2a2* ergab sich eine signifikant reduzierte Genexpression nach Hypoxieexposition gegenüber den Normoxie-exponierten PASCs von TRPCWT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 4.3.5**). Im Gegensatz dazu konnte für den *Itpr2* und *Ryr2* kein Unterschied nach Hypoxieexposition im Vergleich zur Normoxieexposition festgestellt werden (**Abbildung 4.3.5**).



**Abbildung 4.3.5: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Expression der am Speicher-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom beteiligten Gene in PASMC**

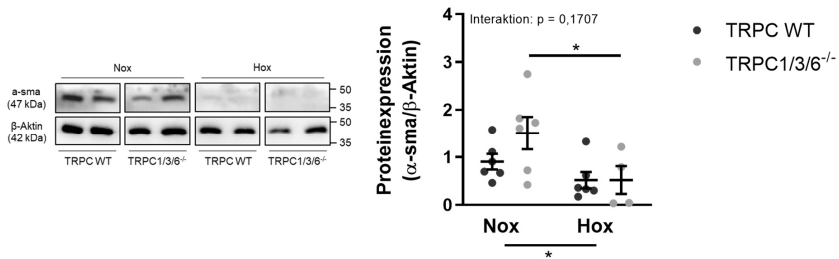
Genexpression von *calcium release-activated calcium channel proteins 1, 2 und 3 (Orai1, Orai2 und Orai3)*, der stromalen Interaktionsmoleküle 1 und 2 (*Stim1 und 2*), der Calcium-ATPase des SR Isoform 2 (*SR/ER calcium ATPase isoform 2, Atp2a2*), der Inositoltriphosphat-Rezeptoren 1 und 2 (*Itpr1 und Itpr2*) und des Ryanodin-Rezeptors 2 (*ryanodine receptor, Ryr2*) in PASMC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 120-stündiger Hypoxie- (Hox; 1% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 5 - 6). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05); \*\* (p<0,01); \*\*\* (p<0,001).

### 4.3.5 Proteinexpression

Für die Untersuchung des veränderten Verhaltens sowie der Abweichungen im Ca<sup>2+</sup>-Haushalt der PASMC auf Proteinebene wurden Western Blot-Versuche durchgeführt. Zur Normalisierung der gemessenen Proteinmengen diente β-Aktin.

Um den Einfluss des Dreifachknockouts auf Strukturproteine der PASMC zu analysieren, wurde die Proteinexpression von α-SMA bestimmt. Nach Hypoxieexposition zeigten die PASMC, welche aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert wurden, eine signifikant

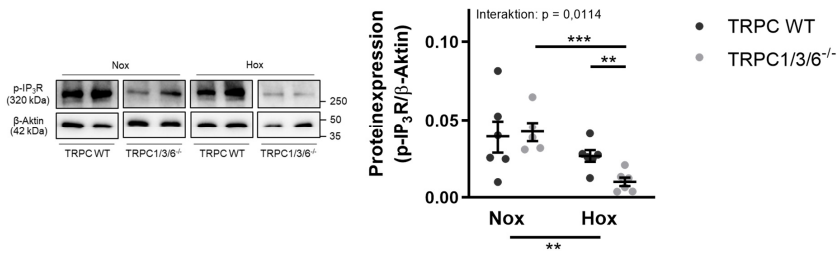
geringere Expression von  $\alpha$ -SMA verglichen mit den Normoxie-exponierten Tieren. Zudem ergab sich mittels *post-hoc* Test ein signifikanter Unterschied zwischen Hypoxie- und Normoxie-exponierten PASMCM der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse während die Interaktion nicht signifikant war. Hingegen konnte zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied festgestellt werden (**Abbildung 4.3.6**).



**Abbildung 4.3.6: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Expression von  $\alpha$ -SMA in PASMCM**

Proteinexpression von glattmuskulärem  $\alpha$ -Aktin ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA) in PASMCM aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 120-stündiger Hypoxie- (Hox; 1% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 4 - 6). Für die statistische Auswertung wurden die Logarithmen der Messwerte verwendet. Signifikanter Unterschied, wenn \* (p < 0,05).

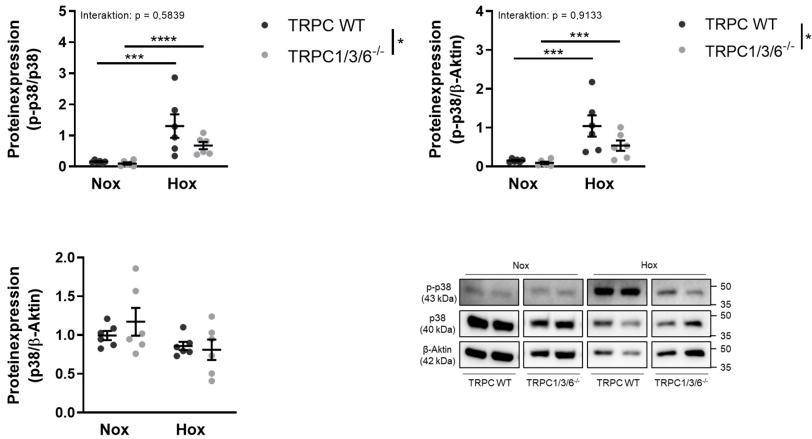
Da bei der Untersuchung des Speicher-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (*store operated calcium entry*, SOCE) auf RNA-Ebene eine verminderte Expression des *Itpr1* in PASMCM beobachtet werden konnte, erfolgte die Untersuchung des phosphorylierten IP<sub>3</sub>R (p-IP<sub>3</sub>R) auf Proteinebene. Nach Hypoxieexposition zeigten sowohl PASMCM aus TRPC WT als auch aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen einen signifikant geringeren Proteingehalt des p-IP<sub>3</sub>R. Dabei ergab sich für PASMCM isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikant stärkere Reduktion der Expression von p-IP<sub>3</sub>R verglichen mit PASMCM isoliert aus TRPC WT Mäusen nach Hypoxieexposition. Auch der Vergleich mittels *post-hoc* Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Hypoxie-exponierten Gruppen (**Abbildung 4.3.7**).



**Abbildung 4.3.7: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Expression des p-IP<sub>3</sub>R in PASMC**

Proteinexpression des phosphorylierten Inositoltriphosphat-Rezeptors (p-IP<sub>3</sub>R) in PASMC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 120-stündiger Hypoxie- (Hox; 1% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 6). Für die statistische Auswertung wurden die Logarithmen der Messwerte verwendet. Signifikanter Unterschied, wenn \*\* (p<0,01).

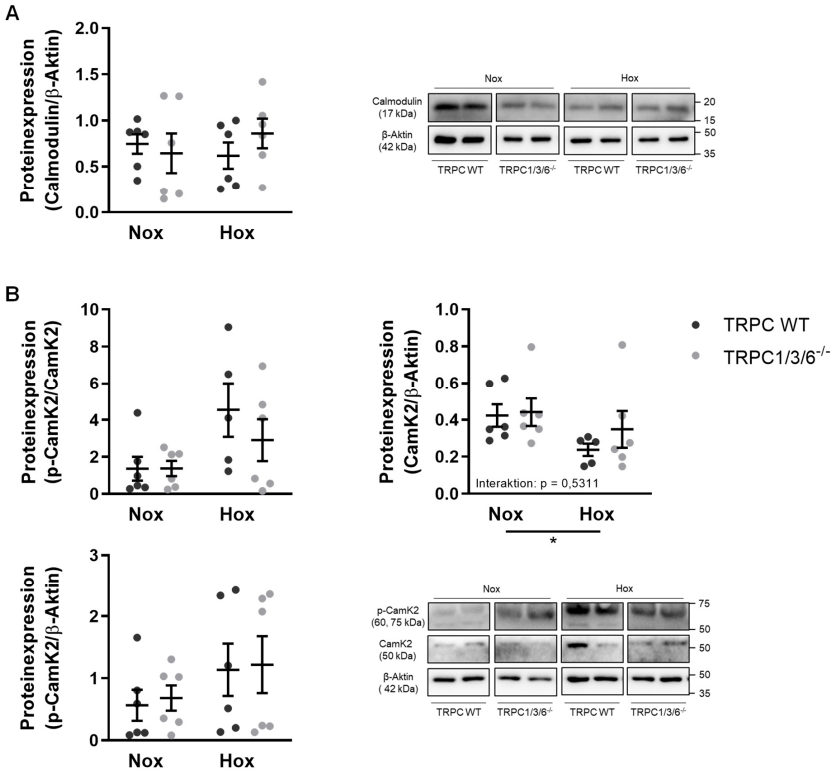
Um die Veränderungen der Migration und Proliferation der PASMC isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen auf molekularer Ebene weitergehend zu untersuchen, wurde die Proteinexpression von phosphoryliertem p38 (p-p38) und p38 bestimmt. PASMC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten nach Hypoxieexposition eine signifikant erhöhte Expression von p-p38 sowohl in Relation zu p38 als auch zu β-Aktin verglichen mit Normoxie-exponierten PASMC. Des Weiteren ergab sich für PASMC isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikant geringere Expression von p-p38 in Relation zu p38 und β-Aktin verglichen mit TRPC WT Mäusen (**Abbildung 4.3.8**).



**Abbildung 4.3.8: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Phosphorylierung des pro-proliferativen Proteins p38 in PASC**

Proteinexpression von phosphoryliertem p38 (p-p38) und p38 in PASC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 120-stündiger Hypoxie- (Hox; 1% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 6). Für die statistische Auswertung wurden die Logarithmen der Messwerte verwendet. Signifikanter Unterschied, wenn \*\* (p<0,01).

Des Weiteren wurde der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin abhängige Signalweg untersucht. Kommt es zur Bindung von freien Ca<sup>2+</sup> an ein Calmodulin-Molekül kann der entstandene Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Komplex andere Proteine aktivieren. Zu diesen zählt die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CamKII). Die Calmodulin-Expression zeigte keine Unterschiede zwischen PASC isoliert aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 4.3.9 A**). Zudem wurden keine signifikanten Unterschiede der Expression der phosphorylierten CamKII (p-CamKII), normalisiert zur Proteinmenge von CamKII (p = 0,0643) sowie zur Proteinmenge von β-Aktin, nach Hypoxieexposition festgestellt. Hingegen ergab sich eine signifikant reduzierte Proteinexpression von CamKII nach Hypoxieexposition für PASC isoliert aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 4.3.9 B**).



**Abbildung 4.3.9:** Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Expression von Calmodulin und die Phosphorylierung der CamKII in PAMC

Proteinexpression von A) Calmodulin und B) der phosphorylierten  $\text{Ca}^{+2}$ /Calmodulin abhängigen Proteinkinase II (p-CamKII) und CamKII in PAMC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 120-stündiger Hypoxie- (Hox; 1%  $\text{O}_2$ ) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21%  $\text{O}_2$ ) (n = 6). Für die statistische Auswertung wurden die Logarithmen der Messwerte verwendet. Signifikanter Unterschied, wenn \* ( $p < 0,05$ ).

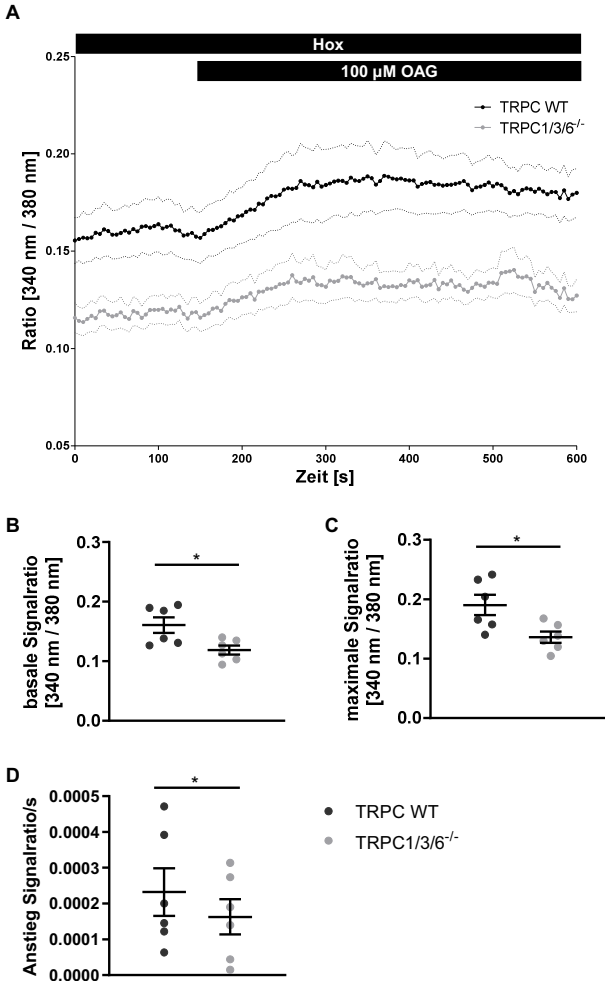
#### 4.4 Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den $\text{Ca}^{+2}$ -Haushalt von PAMC nach chronischer Hypoxieexposition

Bislang konnte die Bedeutung von TRPC1, 3 und 6 Proteinen für die Entstehung der CHPH nicht vollständig geklärt werden. Bei TRPC1, 3 und 6 handelt es sich um Proteine, die an der Bildung unspezifischer Kationenkanäle, die vorwiegend  $\text{Ca}^{+2}$ - und  $\text{Na}^{+}$ -Ionen leiten, beteiligt sind. Wie in der Literatur beschrieben, spielt die  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  eine wichtige Rolle für das Verhalten von PAMC

(Malczyk 2017; Pietra 2004; Stenmark 2009). Daher kann vermutet werden, dass TRPC1, 3 und 6 Proteine eine wichtige Rolle bei der Entstehung von CHPH übernehmen. Um die *in vivo* Ergebnisse von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen auf molekularer Ebene weiter aufzuklären, wurden Untersuchungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mithilfe von Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Dazu wurden PASMC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und der Rezeptor-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom (*receptor operated calcium entry*, ROCE) sowie der SOCE unter hypoxischen Bedingungen untersucht.

#### 4.4.1 Untersuchung des Rezeptor-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms

Um die Bedeutung von TRPC1, 3 und 6 Proteinen für den ROCE zu untersuchen, wurden PASMC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und nach 120-stündiger Hypoxieexposition mit OAG stimuliert. Dabei handelt es sich - laut Herstellerangaben - um ein DAG Analogon, das dessen Wirkung an der Zellmembran imitiert. DAG akkumuliert nach Aktivierung von PLC an der Zellmembran und aktiviert vermutlich verschiedene TRPC-Kanäle (Eder 2011; Wang 2008). Dadurch kommt es zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulärraum in das Zytoplasma. Neben der basalen Signalratio vor OAG Gabe wurde die maximale Signalratio sowie die Änderung der Signalratio pro Sekunde (Ca<sup>2+</sup>-Einstromgeschwindigkeit) nach OAG Applikation erhoben. Dabei zeigten PASMC isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen ein signifikant niedrigeres basales sowie maximales Signal im Vergleich zu PASMC aus TRPC WT Mäusen (**Abbildung 4.4.1 B und C**). Zudem konnte eine signifikant geringere Ca<sup>2+</sup>-Einstromgeschwindigkeit aus dem Extrazellulärraum in PASMC isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen mit TRPC WT Mäusen festgestellt werden (**Abbildung 4.4.1 D**).

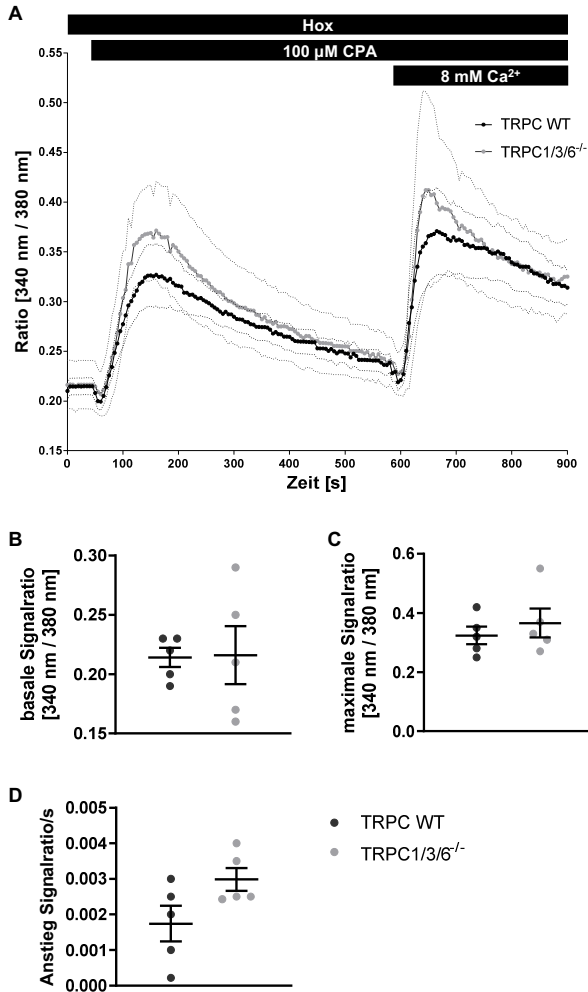


**Abbildung 4.4.1: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den ROCE in PASMIC unter chronischer Hypoxie**

Fluoreszenzbasierte Messung des Rezeptor-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms (*receptor operated calcium entry*, ROCE) mithilfe von Fura 2-AM nach Aktivierung von Rezeptor-aktivierten Kanälen (*receptor operated channels*, ROC) durch 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer unter hypoxischen Bedingungen (Hox; 1%  $\text{O}_2$ ) (n = 6). Dargestellt sind A) die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler über den Zeitverlauf, B) die basale Signalratio, C) die maximale Signalratio und D) die Änderung der Signalratio pro Sekunde (s) nach Applikation von OAG. Für die statistische Analyse der Änderung der Signalratio pro s wurde die Steigung der jeweiligen linearen Regressionsgerade bestimmt. Signifikanter Unterschied, wenn \* ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2 Untersuchung des Speicher-vermittelten $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms

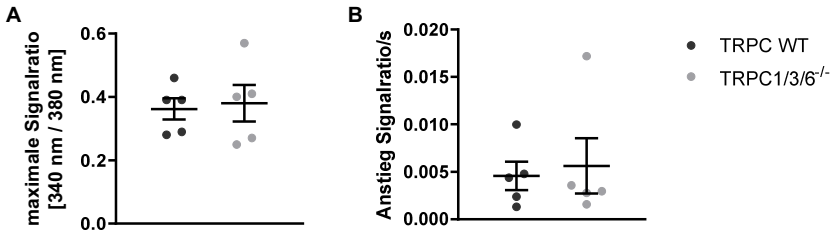
Um die Rolle von TRPC1, 3 und 6 Proteinen für den SOCE zu analysieren, wurden PASMC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach Isolation und 120-stündiger Hypoxieexposition mithilfe der Fura 2-AM basierten Fluoreszenzmessung untersucht. Dazu wurde die Substanz CPA appliziert, die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen des SR bzw. ER blockiert, sodass die Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR bzw. ER verhindert wird. Die daraus resultierende Entleerung der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher führt über eine Aktivierung von SOC zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol der PASMC. Sowohl die Messung der basalen Signalratio als auch die Messung der maximalen Signalratio ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den PASMC der TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse (**Abbildung 4.4.2 B und C**). Auch der Anstieg der Signalratio pro Sekunde zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen ( $p = 0,053$ ) (**Abbildung 4.4.2 D**).



**Abbildung 4.4.2: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Entleerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher in PASMZ unter chronischer Hypoxie**

Fluoreszenzbasierte Messung des Speicher-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Einstroms (*store operated calcium entry*, SOCE) mithilfe von Fura 2-AM nach Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher durch Cyclopianzonsäure (CPA) in  $Ca^{2+}$ -freiem Puffer unter hypoxischen Bedingungen (1%  $O_2$ ) (n = 5). Angegeben sind A) die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler über den Zeitverlauf, B) die basale Signalratio, C) die maximale Signalratio und D) die Änderung der Signalratio pro Sekunde (s) nach Applikation von CPA. Für die statistische Analyse der Änderung der Signalratio pro s wurde die Steigung der jeweiligen linearen Regressionsgerade bestimmt.

Anschließend erfolgte die Applikation von  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer, die zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den Intrazellulärraum und einem erneuten Anstieg des aufgezeichneten Fluoreszenzsignals führte. Sowohl die maximal erreichte Signalhöhe als auch die Einstromgeschwindigkeit unterschied sich nicht zwischen den beiden Genotypen (**Abbildung 4.4.3 A und B**).



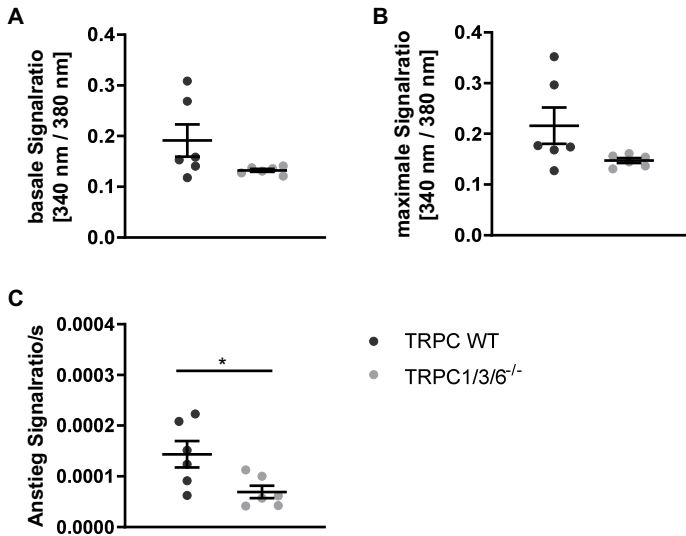
**Abbildung 4.4.3: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den SOCE in PASMIC unter chronischer Hypoxie**

Fluoreszenzbasierte Messung des Speicher-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms (*store operated calcium entry*, SOCE) mithilfe von Fura 2-AM nach Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch Cyclopiazonsäure (CPA) und Applikation von  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer unter hypoxischen Bedingungen (1%  $\text{O}_2$ ) ( $n = 5$ ). Dargestellte Parameter sind A) die maximale Signalratio und B) die Änderung der Signalratio pro Sekunde (s) nach Applikation von  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer. Für die statistische Analyse der Änderung der Signalratio pro s wurde die Steigung der jeweiligen linearen Regressionsgerade bestimmt.

#### 4.4.3 Untersuchung regulatorischer Kompensationen des Rezeptor- und Speicher-vermittelten $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms

Die zugrundeliegenden Mechanismen der sich unterscheidenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationen der PASMIC von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen wurden bislang nicht untersucht. Daher wurden mögliche regulatorische Kompensationen des ROCE und SOCE, ausgelöst durch das Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine weitergehend analysiert. Hierzu wurden die beschriebenen Messungen zur Untersuchung des ROCE und SOCE unter Zugabe von Nifedipin oder SKF-96365 unter hypoxischen Bedingungen erneut durchgeführt. Da es sich bei Nifedipin um einen Inhibitor spannungsabhängiger L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle handelt, konnten damit mögliche gegenregulatorische Expressionen dieser Kanäle analysiert werden. Hingegen wurde der nicht-spezifische Inhibitor von TRPC-Kanälen SKF-96365 eingesetzt, um eine mögliche regulatorische Kompensation anderer ROC oder spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu detektieren.

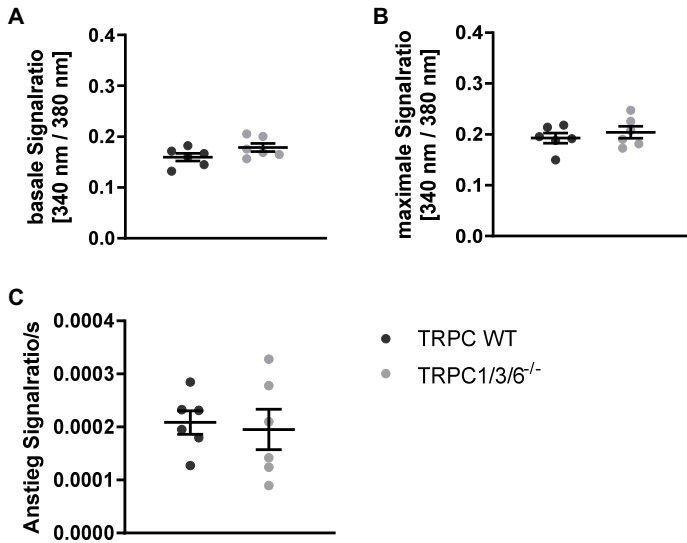
In den Versuchen von OAG zusammen mit Nifedipin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die basale Signalratio und maximale Signalratio ( $p = 0,094$  und  $p = 0,087$ ) (**Abbildung 4.4.4 A und B**). Lediglich der Anstieg der Signalratio pro Sekunde unterschied sich weiterhin signifikant zwischen PASMC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 4.4.4 C**).



**Abbildung 4.4.4: Einfluss von Nifedipin auf den ROCE der PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen**

Fluoreszenzbasierte Messung des Rezeptor-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (*receptor operated calcium entry*, ROCE) mithilfe von Fura 2-AM nach Aktivierung von Rezeptor-aktivierten Kanälen (*receptor operated channels*, ROC) durch 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) unter Zugabe von Nifedipin, ein Inhibitor von spannungsabhängigen L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen, in Ca<sup>2+</sup>-haltigem Puffer unter hypoxischen Bedingungen (1% O<sub>2</sub>) (n = 6). Dargestellte Parameter sind A) die basale Signalratio, B) die maximale Signalratio und C) die Änderung der Signalratio pro Sekunde (s) nach Applikation von OAG. Für die statistische Analyse der Änderung der Signalratio pro s wurde die Steigung der jeweiligen linearen Regressionsgerade bestimmt. Signifikanter Unterschied, wenn \* ( $p < 0,05$ ).

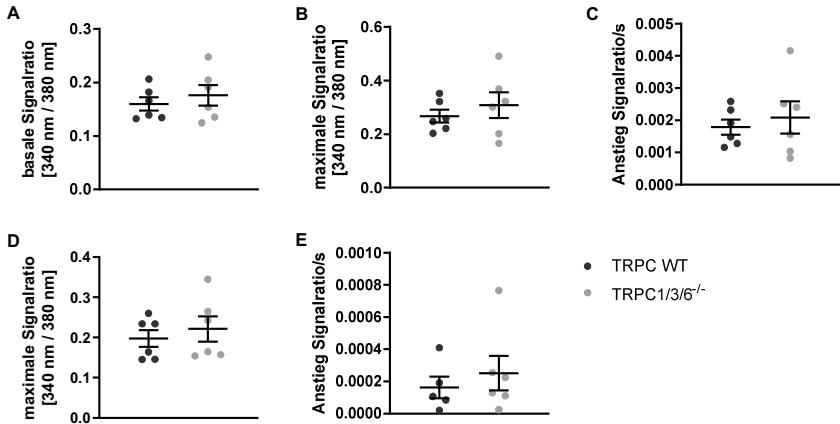
Der Zusatz von SKF-96365 führte in Versuchen mit OAG dazu, dass sich bei den Messparametern kein Unterschied mehr zwischen PASMC isoliert aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen erkennen ließ. Sowohl die basale Signalratio als auch die maximale Signalratio sowie die Änderung der Signalratio pro Sekunde erreichten das gleiche Niveau (**Abbildung 4.4.5 A bis C**).



**Abbildung 4.4.5: Einfluss von SKF-96365 auf den ROCE der PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen**

Fluoreszenzbasierte Messung des Rezeptor-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (*receptor operated calcium entry*, ROCE) mithilfe von Fura 2-AM nach Aktivierung von Rezeptor-aktivierten Kanälen (*receptor operated channels*, ROC) durch 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) unter Zugabe des nicht-selektiven TRPC-Inhibitors SKF-96365 in Ca<sup>2+</sup>-haltigem Puffer unter hypoxischen Bedingungen (1% O<sub>2</sub>) (n = 6). Dargestellte Parameter sind A) die basale Signalratio, B) die maximale Signalratio und C) die Änderung der Signalratio pro Sekunde (s) nach Applikation von OAG. Für die statistische Analyse der Änderung der Signalratio pro s wurde die Steigung der jeweiligen linearen Regressionsgerade bestimmt.

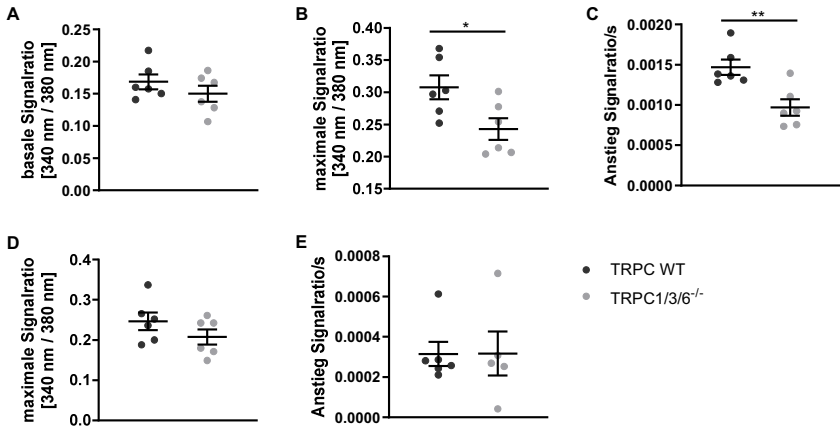
Die Applikation von CPA zusammen mit Nifedipin resultierte darin, dass sich die Einstromgeschwindigkeit der Ca<sup>2+</sup>-Ionen zwischen PASMC der TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse angleich. Auch die maximale Signalratio sowie die Änderung der Signalratio pro Sekunde nach Applikation von mit Nifedipin versetztem Ca<sup>2+</sup>-haltigen Puffer unterschied sich weiterhin nicht zwischen PASMC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 4.4.6 A bis E**).



**Abbildung 4.4.6: Einfluss von Nifedipin auf den SOCE der PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen**

Fluoreszenzbasierte Messung des Speicher-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (*store operated calcium entry*, SOCE) mithilfe von Fura 2-AM unter Zugabe von Nifedipin, ein Inhibitor von spannungsabhängigen L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen, unter hypoxischen Bedingungen (n = 5 - 6). Dargestellte Parameter sind A) die basale Signalratio, B) die maximale Signalratio und C) die Änderung der Signalratio pro Sekunde (s) nach Entleerung der Ca<sup>2+</sup>-Speicher durch Cyclopiazonsäure (CPA) in Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer sowie D) die maximale Signalratio und E) die Änderung der Signalratio pro s nach Applikation von Ca<sup>2+</sup>-haltigem Puffer. Für die statistische Analyse der Änderung der Signalratio pro s wurde die Steigung der jeweiligen linearen Regressionsgerade bestimmt.

In Versuchen von CPA zusammen mit SKF-96365 konnte kein Unterschied der basalen Signalratio festgestellt werden (**Abbildung 4.4.7 A**). Interessanterweise zeigten PASMC aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen allerdings nach Zusatz von SKF-96365 eine signifikant niedrigere maximale Signalratio sowie einen signifikant geringeren Anstieg dieser pro s nach CPA Applikation im Vergleich zu PASMC aus TRPC WT Mäusen (**Abbildung 4.4.7 B und C**). Die Änderung der Signalratio pro Sekunde nach Applikation von Ca<sup>2+</sup>-haltigem Puffer und die maximale Signalratio unterschieden sich zwischen PASMC aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nicht (**Abbildung 4.4.7 D und E**).



**Abbildung 4.4.7: Einfluss von SKF-96365 auf den SOCE der PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen**  
 Fluoreszenzbasierte Messung des Speicher-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (*store operated calcium entry*, SOCE) mithilfe von Fura 2-AM unter Zugabe von SKF-96365, ein nicht-selektiver Inhibitor von TRPC-Kanälen, unter hypoxischen Bedingungen (n = 5 - 6). Dargestellte Parameter sind A) die basale Signalratio, B) die maximale Signalratio und C) die Änderung der Signalratio pro Sekunde (s) nach Entleerung der Ca<sup>2+</sup>-Speicher durch Cyclopianzsäure (CPA) in Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer sowie D) die maximale Signalratio und E) die Änderung der Signalratio pro s nach Applikation von Ca<sup>2+</sup>-haltigem Puffer. Für die statistische Analyse der Änderung der Signalratio pro s wurde die Steigung der jeweiligen linearen Regressionsgerade bestimmt. Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05); \*\* (p<0,01).

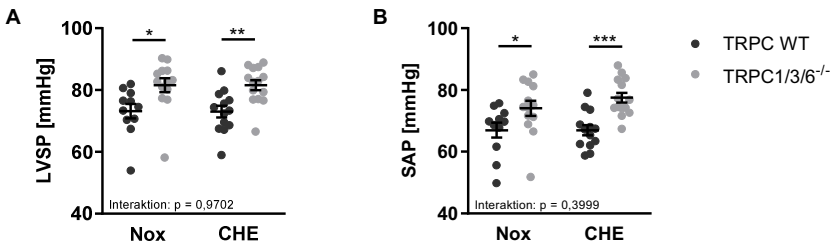
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine den Ca<sup>2+</sup>-Haushalt von PASMC beeinflusst. So konnte ein reduzierter ROCE für PASMC der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse verglichen mit PASMC der TRPC WT Mäuse festgestellt werden, während für den SOCE keine Unterschiede beobachtet werden konnten. Dabei scheinen regulatorische Kompensationen, insbesondere von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen sowie anderer ROC bzw. SOC, beteiligt zu sein.

## 4.5 Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf physiologische Eigenschaften (Phänotyp)

### 4.5.1 Hämodynamische Messungen

Neben der hämodynamischen Messung des RVSP, erfolgte auch die Messung des LVSP sowie des SAP. Der LVSP zeigte einen signifikanten Anstieg für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse sowohl nach

Normoxieexposition ( $81,6 \pm 2,3$  mmHg) als auch nach CHE ( $81,6 \pm 1,6$  mmHg) im Vergleich zu TRPC WT Mäusen (Nox:  $72,4 \pm 1,9$  mmHg und CHE:  $72,7 \pm 1,8$  mmHg) (**Abbildung 4.5.1 A**). Gleiches wurde für den SAP der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse mit  $74,1 \pm 2,4$  mmHg (Nox) und  $77,5 \pm 1,6$  mmHg (CHE) gegenüber TRPC WT Mäusen mit  $67,1 \pm 2,3$  mmHg (Nox) und  $67,1 \pm 1,6$  mmHg (CHE) festgestellt (**Abbildung 4.5.1 B**). Für beide Messwerte ergab sich also, unabhängig von der Kondition, ein signifikant höherer Druck für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu TRPC WT Mäusen.



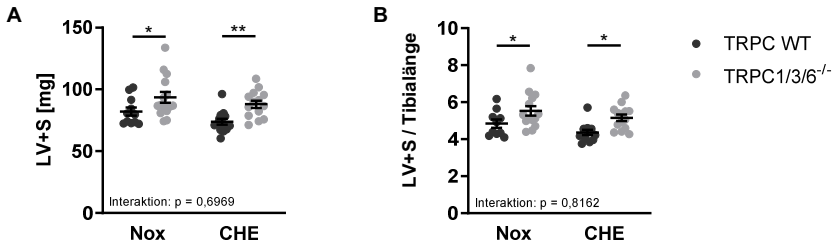
**Abbildung 4.5.1: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den LVSP und den SAP**

A) Linksventrikulärer systolischer Druck (*left ventricular systolic pressure*, LVSP) und B) systolischer arterieller Druck (*systolic arterial pressure*, SAP) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 11 - 14). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05); \*\* (p<0,01); \*\*\* (p<0,001).

Da das Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine einen Einfluss auf die kardiale Funktion zu haben scheint und Erkrankungen des linken Herzens zu einer PH (PH der Gruppe 2) führen können, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

Um die Entstehung einer LVH zu analysieren, wurde das Gewicht des LV plus S bestimmt und in Relation zur Tibiallänge gesetzt. Dies diente dazu, Abweichungen aufgrund unterschiedlicher Körpergrößen auszuschließen. Dabei zeigte bereits das Gewicht des LV plus S einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Mauslinien nach normoxischer (TRPC WT Mäuse:  $85,7 \pm 4,2$  mg und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse:  $93,6 \pm 4,3$  mg) und hypoxischer (TRPC WT Mäuse:  $74,3 \pm 2,2$  mg und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse:  $88,1 \pm 2,9$  mg) Exposition (**Abbildung 4.5.2 A**). Gleiches ergab sich für das Verhältnis aus Gewicht des LV plus S und der Tibiallänge nach

Normoxieexposition (TRPC WT Mäuse:  $4,4 \pm 0,1$  und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse:  $5,2 \pm 0,2$ ) und CHE (TRPC WT Mäuse:  $5,0 \pm 0,2$  und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse:  $5,5 \pm 0,3$ ) (**Abbildung 4.5.2 B**).



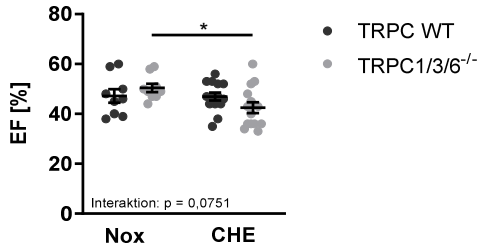
**Abbildung 4.5.2: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die LVH**

A) Gewicht des linken Ventrikels (LV) plus Septum (S) und B) Verhältnis aus Gewicht des LV plus S zur Tibiallänge von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 14 - 15). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05); \*\* (p<0,01).

#### 4.5.2 Echokardiografische Messungen

Zur weiteren Analyse der linksventrikulären Funktion erfolgten zusätzliche echokardiografische Messungen. Es wurden die echokardiografischen Parameter nach 28-tägiger Normoxie- bzw. Hypoxieexposition bestimmt.

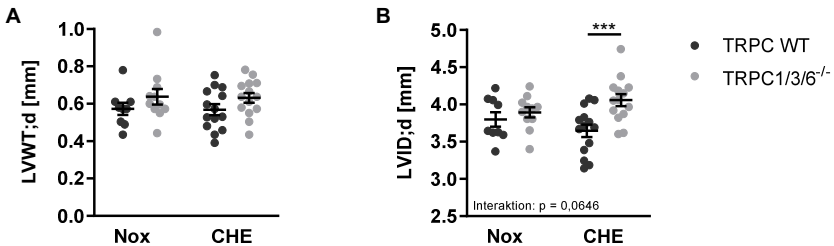
Die Auswurfraction dient der Beurteilung der Pumpleistung des LV. Während sich für TRPC WT Mäuse kein Unterschied zwischen den Konditionen zeigte (Nox:  $47 \pm 3\%$  und CHE:  $47 \pm 2\%$ ), war bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikante Reduktion der EF nach CHE ( $43 \pm 2\%$ ) verglichen mit den Normoxie-exponierten Tieren ( $50 \pm 2\%$ ) zu sehen (**Abbildung 4.5.3**).



**Abbildung 4.5.3: Echokardiografische Messung der EF nach CHE**

Auswurfraction (*ejection fraction*, EF) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 9 - 14). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05).

Um den Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf eine LVH zu untersuchen, wurde die LVWT gemessen. TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse verzeichneten sowohl nach Normoxieexposition (0,64 ± 0,04 mm) als auch nach CHE (0,63 ± 0,03 mm) keinen Unterschied der LVWT im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe (Nox: 0,57 ± 0,03 mm und CHE: 0,57 ± 0,03 mm) (p = 0,056) (**Abbildung 4.5.4 A**). Des Weiteren wurde der LVID als Maß für den Dilatationsgrad des LV bestimmt. Während nach Normoxieexposition kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden konnte (TRPC WT Mäuse: 3,80 ± 0,10 mm und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse: 3,89 ± 0,07 mm), zeigte sich ein signifikant größerer LVID nach CHE für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse (TRPC WT Mäuse: 3,64 ± 0,08 mm und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse: 4,06 ± 0,08 mm) (**Abbildung 4.5.4 B**).



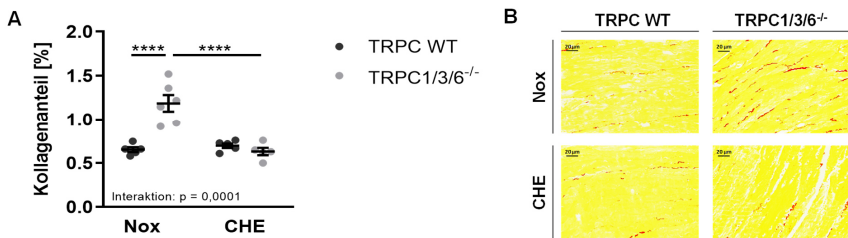
**Abbildung 4.5.4: Echokardiografische Messung der LVWT und des LVID nach CHE**

A) Linksventrikuläre Wandstärke (*left ventricular wall thickness*, LVWT) und B) linksventrikulärer Innendurchmesser (*left ventricular internal diameter*, LVID) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxie- (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 9 - 14). Signifikanter Unterschied, wenn \*\*\* (p<0,001).

#### 4.5.3 Histologische Bestimmung des Kollagengehalts des rechten und linken Ventrikels sowie der Lunge

Aufgrund der Phänotyp-spezifischen, kardialen Veränderungen wurden histologische Analysen des Kollagengehalts des RV und LV durchgeführt. Ziel war es, eine häufig mit ventrikulärer Hypertrophie einhergehende Fibrosierung des RV und LV zu untersuchen. Dazu erfolgte eine chemische Färbung (*Picro-Sirius Red*), die es ermöglichte den Kollagengehalt der Gewebeschnitte zu bestimmen.

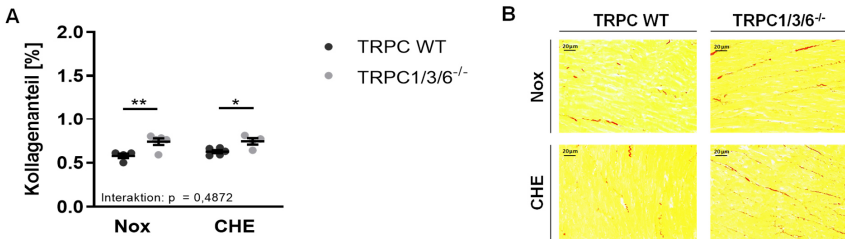
Bei der Analyse zeigten die RV der Normoxie-exponierten TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse einen signifikant höheren Kollagenanteil ( $1,2 \pm 0,1\%$ ) im Vergleich zu den RV der TRPC WT Mäusen ( $0,7 \pm 0,03\%$ ). Hingegen konnte für die TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach CHE ( $0,6 \pm 0,04\%$ ) kein Unterschied zur Kontrollgruppe (TRPC WT Mäuse:  $0,7 \pm 0,03\%$ ) festgestellt werden (**Abbildung 4.5.5 A**).



**Abbildung 4.5.5: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den Kollagengehalt des RV**

A) Kollagengehalt des rechten Ventrikels (RV) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxie- (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 5 - 6) und B) repräsentative Bilder der *Picro-Sirius Red* Färbung (400fache Vergrößerung) von Gewebeschnitten des RV von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen. Signifikanter Unterschied, wenn \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

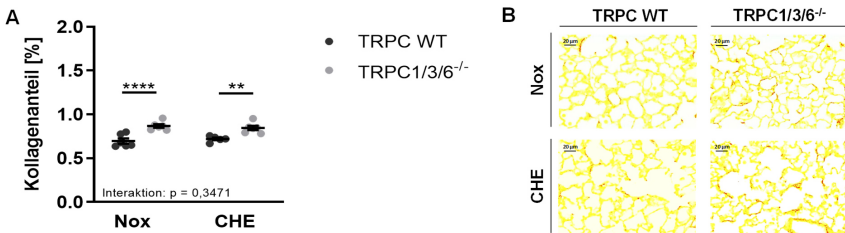
In der histologischen Untersuchung der Gewebeschnitte des LV ergab sich ein signifikant höherer Kollagenanteil in den LV der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse sowohl nach Normoxieexposition ( $0,7 \pm 0,04\%$ ) als auch nach CHE ( $0,7 \pm 0,04\%$ ) gegenüber TRPC WT Mäusen (Nox:  $0,6 \pm 0,03\%$  und CHE:  $0,6 \pm 0,02\%$ ) (**Abbildung 4.5.6 A**).



**Abbildung 4.5.6: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den Kollagengehalt des LV**

A) Kollagengehalt des linken Ventrikels (LV) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 5 - 6) und B) repräsentative Bilder der *Picro-Sirius Red* Färbung (400fache Vergrößerung) von Gewebeschnitten des LV von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen. Signifikanter Unterschied, wenn \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ).

Liegt eine Fibrosierung von Lungengewebe vor, kann dies die physiologischen Eigenschaften der Lunge beeinflussen und sich auf die Entstehung einer PH auswirken. Nachdem ein veränderter Kollagengehalt im RV und LV der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse festgestellt werden konnte, erfolgte daher im Anschluss die *Picro-Sirius Red* Färbung und die histologische Bestimmung des Kollagengehalts von Lungenschnitten der TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse. Dabei zeigten die Lungen der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse einen signifikant höheren Kollagenanteil nach Normoxieexposition mit  $0,9 \pm 0,03\%$  und CHE mit  $0,9 \pm 0,04\%$  im Vergleich zu den Lungen der TRPC WT Mäuse (Nox:  $0,7 \pm 0,03\%$  und CHE:  $0,8 \pm 0,06\%$ ) (**Abbildung 4.5.7 A**).



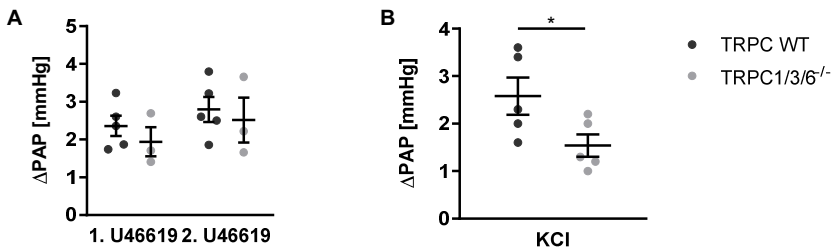
**Abbildung 4.5.7: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den Kollagengehalt der Lunge**

A) Kollagengehalt der Lunge von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxie- (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 4 - 5) und B) repräsentative Bilder der *Picro-Sirius Red* Färbung (400fache Vergrößerung) von Gewebeschnitten der Lunge von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen. Signifikanter Unterschied, wenn \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.5.4 Untersuchungen der Kontraktilität von Pulmonalarterie und Aorta

Tritt ein veränderter Kollagenanteil in der Gefäßwand auf, kann dies die Kontraktilität von Blutgefäßen beeinflussen. Aufgrund der Phänotyp-spezifischen Veränderungen des Kollagengehalts von Herz- und Lungengewebe wurde daher die Kontraktilität der PA im Modell der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Lunge sowie die Kontraktilität der Aorta mithilfe eines Drahtmyographen untersucht.

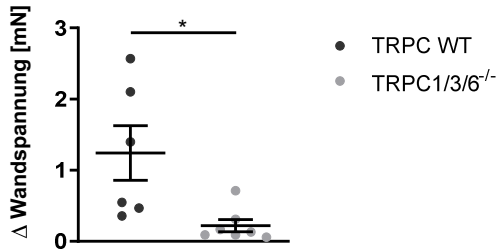
In den Versuchen der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Lunge zeigte sich sowohl nach erster als auch nach zweiter Gabe des Thromboxan A2 Analogons U46619 kein Unterschied im Anstieg des PAP zwischen TRPC WT (1. Gabe:  $2,4 \pm 0,3$  mmHg und 2. Gabe:  $2,8 \pm 0,4$  mmHg) und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen (1. Gabe:  $1,9 \pm 0,3$  mmHg und 2. Gabe:  $2,5 \pm 0,5$  mmHg) (**Abbildung 4.5.8 A**). Allerdings konnte für den Anstieg des PAP nach KCl Applikation ein signifikanter Unterschied für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse ( $1,5 \pm 0,3$  mmHg) im Vergleich zu TRPC WT Mäusen ( $2,6 \pm 0,4$  mmHg) festgestellt werden (**Abbildung 4.5.8 B**).



**Abbildung 4.5.8:** Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den PAP in isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Mauslungen

Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (*pulmonal arterial pressure*, PAP) nach A) 1. und 2. Gabe von U46619 und B) Gabe von KCl von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen im Modell der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Lunge (n = 5). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05).

Um die Wandspannung von systemischen Blutgefäßen zu untersuchen wurden Myographie-Experimente durchgeführt. Dazu wurden Aorten aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und deren kontraktile Aktivität im Myographensystem gemessen. Dabei ergab sich ein signifikant geringerer Anstieg der aortalen Wandspannung für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse um  $0,2 \pm 0,1$  mN gegenüber TRPC WT Mäusen um  $1,2 \pm 0,4$  mN (**Abbildung 4.5.9**).



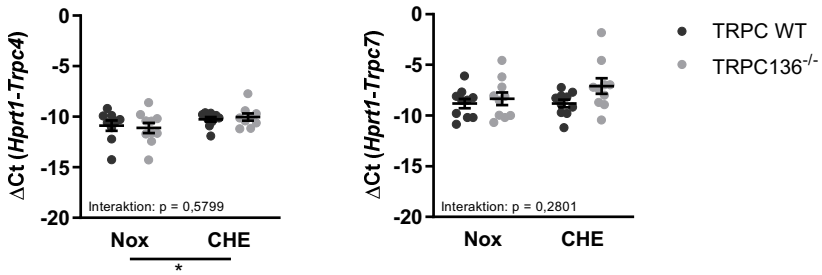
**Abbildung 4.5.9: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die aortale Wandspannung**

Veränderung der aortalen Wandspannung nach Applikation von physiologischer Salzlösung mit hohem Kaliumanteil von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen (n = 6 - 7). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p < 0,05).

#### 4.5.5 Genexpression

Um die Unterschiede zwischen TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen auf molekularer Ebene in den Ventrikeln zu analysieren, wurden Untersuchungen zur Genexpression des RV und LV durchgeführt. Dazu wurde die Expression des *Trpc4*, 5 und 7 Gens bestimmt sowie die Expression von Markern überprüft, die für die Morphologie und Funktionalität des RV und LV von Bedeutung sind (**Cambroner** 2009; **Lowes** 1997; **Nielsen** 2017).

In Untersuchungen des RV konnte für *Trpc4* eine signifikant erhöhte Expression nach CHE für TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse festgestellt werden, während die Expression des *Trpc7* Gens keinen Unterschied zeigte (p = 0,064) (**Abbildung 4.5.10**). Im Gegensatz dazu war die Expression des *Trpc5* Gens größtenteils nicht detektierbar, weshalb auf eine grafische Darstellung in der vorliegenden Arbeit verzichtet wird.



**Abbildung 4.5.10: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die TRPC mRNA-Expression in RV**

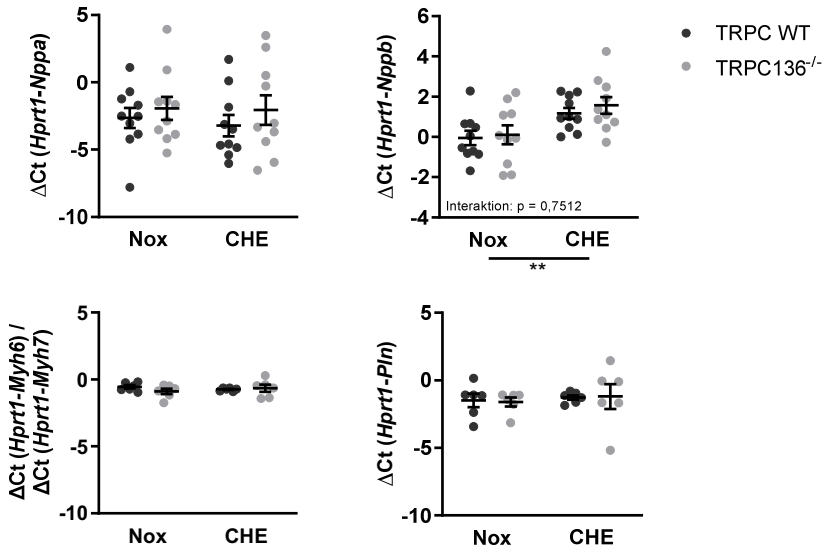
Genexpression von *Trpc4* und *Trpc7* in rechten Ventrikeln (RV) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxie- (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 9 - 10). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05).

Bei der weiteren Analyse der Genexpression in RV von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen konnte eine signifikant höhere Expression von B-Typ natriuretischem Peptid (BNP bzw. *Nppb*) nach CHE im Vergleich zur Normoxieexposition festgestellt werden. Bei BNP handelt es sich um ein kardiales Protein mit einer antifibrotischer Wirkung (**Tamura 2000**). Im Gegensatz dazu besitzt die Produktion von atrialem natriuretischem Peptid (ANP bzw. *Nppa*) eine Bedeutung bei Entstehung einer Rechtsherzhypertrophie (**Kuhn 2004**). In der vorliegenden Arbeit konnte für *Nppa* und *Nppb* kein Unterschied zwischen TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> und TRPC WT Mäusen festgestellt werden (**Abbildung 4.5.11**).

Für die Funktion des Herzmuskels spielen die beiden Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  der Myosin schweren Ketten (*myosin heavy chain isoform  $\alpha$  and  $\beta$* ,  $\alpha$ - und  $\beta$ -MHC bzw. *Myh6* und *Myh7*) eine wichtige Rolle. Bei Vorliegen einer Herzmuskelhypertrophie oder Herzinsuffizienz kommt es zum Anstieg der Expression von  $\beta$ -MHC sowie zu einem Abfall der Expression von  $\alpha$ -MHC. Daher kann das Verhältnis von  $\alpha$ - und  $\beta$ -MHC als Marker für diese Pathologien verwendet werden (**Lowes 1997; Nielsen 2017**). Die Untersuchung des RV von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen ergab keinen Unterschied für das Verhältnis von *Myh6* und *Myh7* nach Normoxieexposition bzw. CHE (**Abbildung 4.5.11**).

Das Verhalten von Kardiomyozyten wird, ebenso wie das Verhalten der PSMC, vom Ca<sup>2+</sup>-Haushalt der Zellen beeinflusst. Die Ca<sup>2+</sup>-Pumpe SERCA dient der Wiederaufnahme von Ca<sup>2+</sup> aus dem Zytosol in das SR bzw. ER. Ihre Regulation erfolgt über die Phosphorylierung von

Phospholamban (PLN). Liegt PLN im dephosphorylierten Zustand vor, wird die SERCA gehemmt und dadurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins SR bzw. ER blockiert. Kommt es zur Phosphorylierung der PLN, wird dessen inhibierende Wirkung aufgehoben und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können ins SR bzw. ER aufgenommen werden. TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten keinen signifikanten Unterschied für die Genexpression von *Pln* nach Normoxieexposition und CHE (**Abbildung 4.5.11**).

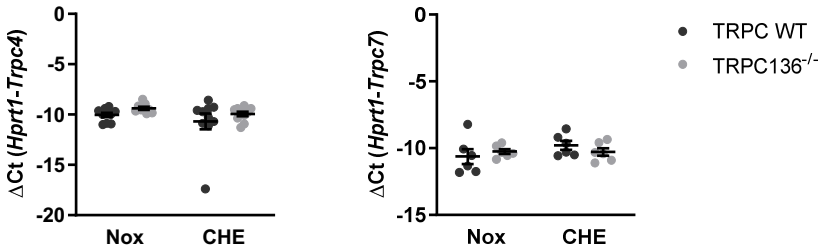


**Abbildung 4.5.11:** Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Genexpression von *Nppa*, *Nppb*, *Pln*, *Myh6* und *Myh7* im RV

Genexpression von atrialem natriuretischem Peptid (*Nppa*), B-Typ natriuretischem Peptid (*Nppb*) sowie Phospholamban (*Pln*) und das Verhältnis der Genexpression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen der Myosin schweren Ketten (*myosin heavy chain isoform  $\alpha$  and  $\beta$* , *Myh6* und *Myh7*) in rechten Ventrikeln (RV) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxieexposition (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 6 - 10). Signifikanter Unterschied, wenn \*\* (p<0,01).

Die gleichen Untersuchungen zur Genexpression wurden auch in LV von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Normoxieexposition bzw. CHE durchgeführt. Dabei konnte für die Expression des *Trpc4* und *Trpc7* Gens kein Unterschied zwischen TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden (**Abbildung 4.5.12**). Wie auch im RV war die

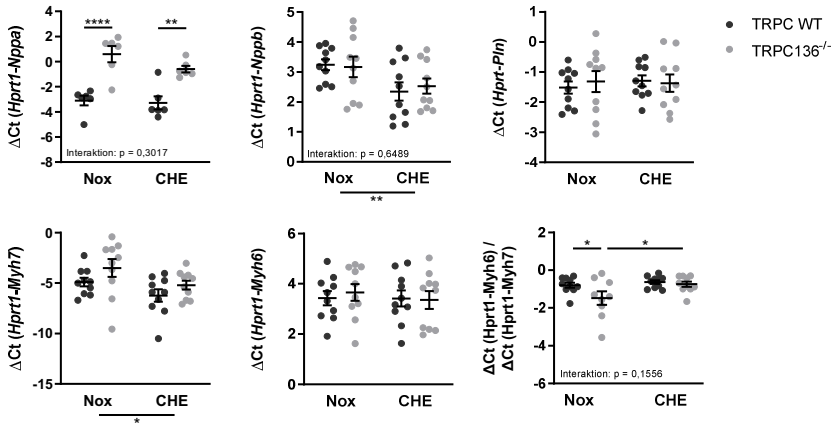
Expression des *Trpc5* Gens größtenteils nicht detektierbar, weshalb auf eine grafische Darstellung in der vorliegenden Arbeit verzichtet wird.



**Abbildung 4.5.12: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die TRPC mRNA-Expression in LV**

Genexpression von *Trpc4* und *Trpc7* in linken Ventrikeln (LV) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxie- (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 6 - 10).

Die Expression von *Nppb* im LV war nach CHE sowohl bei TRPC WT als auch bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen reduziert, sodass sich ein signifikanter Hypoxie-Effekt ergab (**Abbildung 4.5.13**). Im Gegensatz dazu zeigten TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant erhöhte Expression von *Nppa* im Vergleich zu TRPC WT Mäusen nach Normoxieexposition wie auch nach CHE (**Abbildung 4.5.13**). Des Weiteren konnte eine signifikant reduzierte Expression von *Myh7* nach CHE für TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse festgestellt werden. Hingegen zeigte die Genexpression von *Myh7* zwischen TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> und TRPC WT Mäusen keinen signifikanten Unterschied (p = 0,057). Jedoch konnte für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach Normoxieexposition eine signifikant geringere *Myh6* zu *Myh7*-Ratio festgestellt werden. Diese stieg jedoch nach CHE auf den Wert der Normoxie-exponierten TRPC WT Mäuse an, sodass sich zwischen Normoxie- und Hypoxie-exponierten TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen ein signifikanter Unterschied der *Myh6* zu *Myh7*-Ratio ergab (**Abbildung 4.5.13**). Hingegen ergab die Untersuchung der Genexpression von *Pln* keine Unterschiede zwischen TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 4.5.13**).



**Abbildung 4.5.13:** Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Genexpression von *Nppa*, *Nppb*, *Pln*, *Myh6* und *Myh7* im LV

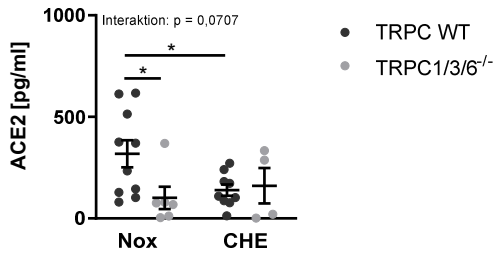
Genexpression von atrialem natriuretischem Peptid (*Nppa*), B-Typ natriuretischem Peptid (*Nppb*), Phospholamban (*Pln*), der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen der Myosin schweren Ketten (*myosin heavy chain isoform  $\alpha$*  und  *$\beta$* , *Myh6* und *Myh7*) und das Verhältnis der Genexpression von *Myh6* und *Myh7* in linken Ventrikeln (LV) von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxie- (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 6 - 10). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05); \*\* (p<0,01); \*\*\*\* (p<0,0001).

#### 4.5.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Aufgrund der Veränderungen des Herz- und Lungengewebes, den Unterschieden der untersuchten Blutgefäße und des erhöhten LVSP sowie SAP wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen die Konzentration von Plasmaproteinen bestimmt wurden. Dazu wurden Plasmaproben der TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse mittels ELISA-Verfahren analysiert. Untersucht wurde das blutdruckregulierende Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und eine alternative, ebenfalls blutdruckregulierende Achse, die aus ACE2, Angiotensin (1-7), (Ang(1-7)) und dem *mitochondrial assembly receptor* (MasR) besteht. Diese wird als ACE2/Ang-(1-7)/MasR-Achse bezeichnet (Chung 2020).

Dabei zeigten TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach Normoxieexposition (101,3 ± 55,2 pg/ml) eine signifikant geringere ACE2-Konzentration gegenüber TRPC WT Mäusen (379,7 ± 85,9 pg/ml). Nach CHE ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen feststellen (TRPC WT Mäuse: 139,6 ± 27,8 pg/ml und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse: 161,0 ± 87,2 pg/ml). Allerdings war die

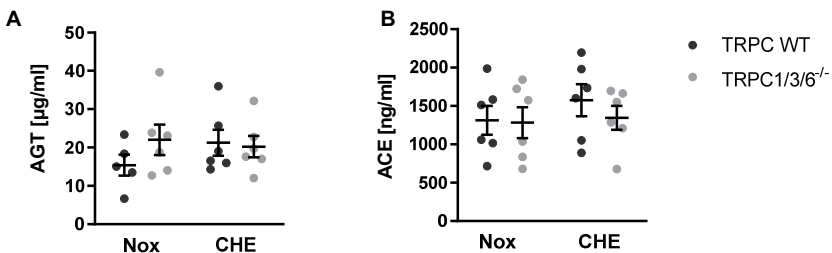
ACE2-Konzentration von TRPC WT Mäusen nach CHE signifikant geringer im Vergleich zu TRPC WT Mäusen nach normoxischer Exposition (**Abbildung 4.5.14**).



**Abbildung 4.5.14: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Plasmakonzentration von ACE2**

Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (*angiotensin converting enzyme 2*, ACE2)-Konzentration in Plasmaproben von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxie- (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 4 - 11). Signifikanter Unterschied, wenn \* (p<0,05).

Untersuchungen des Angiotensin I (AngI)-Vorläufers Angiotensinogen ergaben keine Unterschiede in der Plasmakonzentration nach Normoxieexposition (TRPC WT Mäuse: 14,4 ± 6,8 µg/ml und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse: 10,6 ± 1,7 µg/ml) und CHE (TRPC WT Mäuse: 11,0 ± 2,0 µg/ml und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse: 10,1 ± 1,4 µg/ml) (**Abbildung 4.5.15 A**). Auch für die Konzentration des ACE zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen (**Abbildung 4.5.15 B**). Sie betrug für TRPC WT Mäuse 1300 ± 200 ng/ml nach Normoxieexposition und 1600 ± 200 ng/ml nach CHE. Für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse ergab sich eine ACE-Konzentration von 1300 ± 200 ng/ml (Nox) und 1400 ± 200 ng/ml (CHE).

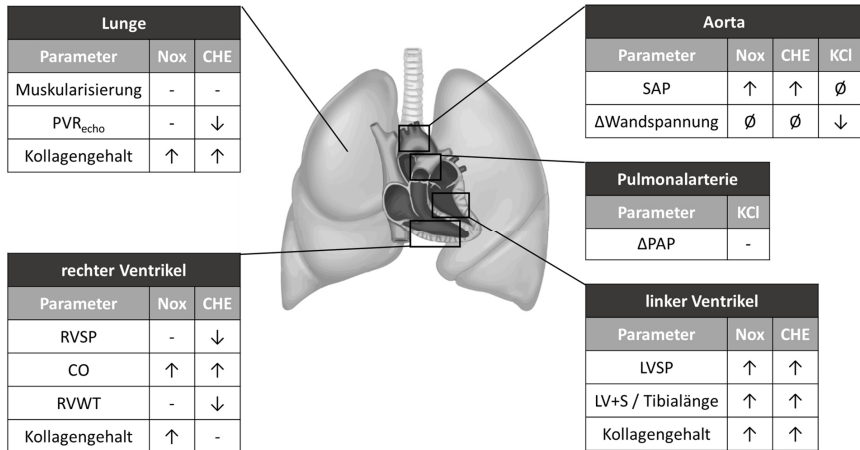


**Abbildung 4.5.15: Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Plasmakonzentration von AGT und ACE**

A) Angiotensinogen (AGT)-Konzentration und B) Angiotensin-konvertierendes Enzym (*angiotensin converting enzyme*, ACE)-Konzentration in Plasmaproben von TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 28-tägiger Hypoxie- (CHE; 10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxieexposition (Nox; 21% O<sub>2</sub>) (n = 5 - 6).

## 5 Diskussion

Die Kernbefunde der vorliegenden Arbeit in Bezug auf Lunge, Herz und Gefäße sind zusammenfassend in einem Schaubild dargestellt (**Abbildung 5.1**). Im Folgenden werden die Resultate des Dissertationsprojekts eingehend diskutiert.



**Abbildung 5.1: Darstellung der Kernbefunde**

Dargestellt sind die in der vorliegenden Arbeit festgestellten Unterschiede der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse verglichen mit TRPC WT Mäusen für Lunge, Herz und Gefäße. Dabei kennzeichnen „↑“ höhere, „↓“ niedrigere und „-“ unveränderte Werte für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nicht untersuchte Konditionen sind mit „∅“ markiert. Verändert nach Gerke 2020.

### 5.1 Wahl von TRPC1, 3 und 6 als Kandidat für die Entstehung von CHPH

Die Expression von TRPC Proteinen konnte in verschiedenen humanen und murinen Gefäßen sowie in Gefäßen von Ratten auf mRNA und auf Protein-Ebene nachgewiesen werden (Firth 2007). Erkrankten Patienten an PH, geht dies mit einer Hochregulation von TRPC3 und TRPC6 im Lungengewebe und in den PASMCS dieser Patienten einher (Yu 2004). Zudem wurde eine erhöhte Expression von TRPC1 auf mRNA Ebene in PASMCS unter chronischer Hypoxie für Mäuse, Ratten und den Menschen beobachtet (Malczyk 2013). Weiterhin zeigten Xia et al. (2014), dass TRPC1 Proteine bei TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen und TRPC6 Proteine bei TRPC1<sup>-/-</sup> Mäusen in

Pulmonalarterien nach CHE hochreguliert sind (Xia 2014). In PASMC von Ratten konnte dies mithilfe von kleiner interferierender RNA (small interfering RNA, siRNA) allerdings nicht bestätigt werden (Lin 2004). In Lungenhomogenaten von TRPC3<sup>-/-</sup> Mäusen wurde eine erhöhte Expression von TRPC1 und TRPC6 nach CHE beobachtet (Mayser 2021).

Die Bedeutung von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 für die Entstehung einer PH wurde bereits mithilfe von *in vivo* Versuchen für Mäuse mit singulärem Knockout eruiert (Malczyk 2013; Mayser 2021; Weissmann 2006; Xia 2014). So zeigten TRPC1<sup>-/-</sup> Mäuse einen reduzierten RVSP sowie eine verminderte Muskularisierung der kleinen Lungengefäße nach CHE im Vergleich zur Kontrollgruppe (Malczyk 2013). Der Einfluss von TRPC6 auf die Entstehung einer CHPH ist in der Literatur umstritten. Zwar konnte die essentielle Bedeutung von TRPC6 für die Reaktion auf akute Hypoxie nachgewiesen werden, in Bezug auf die CHPH sind die Angaben aus der wissenschaftlichen Literatur allerdings widersprüchlich (Weissmann 2006; Xia 2014). Auch TRPC3<sup>-/-</sup> Mäuse reagierten - verglichen mit ihren Kontrolltieren - auf chronische Hypoxie mit einem reduzierten Anstieg des RVSP und einer reduzierten Zunahme der Muskularisierung kleiner Lungengefäße (Mayser 2021). Es ist davon auszugehen, dass TRPC Proteinen generell und insbesondere TRPC1, 3 und 6 eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer CHPH zuzuschreiben ist.

Aufbauend auf die Kenntnisse vorangegangener Studien wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie das gleichzeitige Fehlen von TRPC1, 3 und 6 Proteinen die Entstehung von CHPH beeinflusst und welche Rolle dabei die Interaktion dieser TRPC Proteine übernimmt. Ziel war es zu untersuchen, ob die globale, singuläre Deletion des *Trpc1*, 3 und 6 Gens eine Gegenregulation der jeweils anderen Gene bedingt und ob diese Gegenregulation erklären kann, warum in den vorausgehenden Studien kein vollständiger Schutz vor der Entwicklung einer CHPH beobachtet werden konnte. Dabei konnte in den eigenen Untersuchungen ein Einfluss des Dreifachknockouts auf die physiologischen Eigenschaften der Maus (Phänotyp) festgestellt werden. So zeigte sich ein erhöhter Kollagengehalt im Herz- und Lungengewebe der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse, der mit einer LVH assoziiert war. In der Literatur konnte bereits bestätigt werden, dass TRPC Proteine im Herzen wichtige Funktionen übernehmen (Seo 2014; Seth 2009; Wu 2010). Die Interaktion der drei hier analysierten TRPC Proteine wurde bislang allerdings nicht im Herzen untersucht. Aus diesem Grund wurde dieser Phänotyp im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter analysiert.

## 5.2 Verwendete Modelle

### 5.2.1 Wahl des Tiermodells

Die pulmonale Hypertonie ist eine gravierende Erkrankung, die aufgrund ihrer unspezifischen Symptomatik meist erst im späten Stadium diagnostiziert wird (**Brown** 2011). Es bestehen derzeit keine heilenden Therapieansätze. Im Krankheitsverlauf entwickelt sich aufgrund des erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstands und der erhöhten Nachlast des RV eine RVH. Die daraus resultierende finale rechtsventrikuläre Insuffizienz führt zum Tod der Patienten (**Galiè** 2015; **Stenmark** 2009). Die Entstehung von PH basiert auf multifaktoriellen Ursachen und führt zur Beeinflussung multipler Organsysteme, zu denen nicht nur das Atmungs- und Herz-Kreislauf-System, sondern u.a. auch die Niere, die Leber oder der Gastrointestinaltrakt zählen (**Stiefelhagen** 2021). Um die Zusammenhänge dieser verschiedenen Organsysteme zu untersuchen und die Pathogenese der PH zu entschlüsseln ist eine Erforschung am Gesamttier unerlässlich. Aufgrund ihres vollständig entschlüsselten Genoms handelt es sich bei der Maus um ein geeignetes Versuchstier. Zudem existieren derzeit ausschließlich Mäuse mit einem Knockout des *Trpc1*, 3 und 6 Gens, sodass diese Tierart für die Versuche der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Dabei ist zu bedenken, dass ein globaler Knockout die Embryogenese beeinflussen und zu kompensatorischen Regulationen führen kann. So wurde in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Genexpression von TRPC5 sowie eine erhöhte Genexpression von TRPC7 in PASM von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt. Des Weiteren konnte eine reduzierte ACE2-Konzentration im Plasma der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse gemessen werden. Weitere Auswirkungen des Dreifachknockouts auf die Gen- und Proteinexpression können daher nicht ausgeschlossen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Pathogenese der PH Gruppe 3 nach WHO-Klassifikation zu untersuchen. Es existieren zwar verschiedene Tiermodelle um die Entstehung von PH zu induzieren, jedoch spiegelt die CHE den physiologischen Stimulus der CHPH am besten wider. Die pulmonalen vaskulären Veränderungen sowie die resultierende RVH, die bei Mäusen nach CHE beobachtet werden können, entsprechen den Veränderungen bei anderen Spezies, die eine Hypoxie induzierte PH entwickeln, und denen, die auch bei PH Patienten zu finden sind (**Colvin** 2015; **Pak** 2010; **Stenmark** 2009). Der vaskuläre Gefäßumbau der Hypoxie induzierten

PH ist nach anschließender Normoxieexposition sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen reversibel. Allerdings entwickeln Mäuse lediglich eine milde PH Symptomatik nach chronischer Hypoxieexposition, sodass die CHPH als Modell der funktionellen Klasse 1 und 2 nach WHO Definition angesehen werden kann (**Pak** 2010; **Stenmark** 2009). Trotz dieser milden PH Symptomatik bei Mäusen handelt es sich bei der CHE um ein vorhersehbares und gut reproduzierbares Tiermodell, das am besten für die Erforschung der CHPH geeignet ist. Dennoch können aufgrund der milderer Symptomatik die Untersuchungen dieses Tiermodells nur bedingt auf den Menschen übertragen werden. Nichtsdestoweniger ist dieses Tiermodell sehr gut geeignet, um die Pathomechanismen der CHPH zu untersuchen und zu verstehen, weshalb es in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde.

Die chronische Hypoxieexposition kann unter normobaren oder hypobaren Bedingungen erfolgen. Für erstere wird die Sauerstoffkonzentration der Umgebungsluft reduziert und so ein verminderter Sauerstoffpartialdruck erreicht. Bei der hypobaren Exposition wird hingegen das Gasgemisch der Atmosphäre nicht verändert, sondern lediglich der Luftdruck reduziert und dadurch ein Abfall des Sauerstoffpartialdrucks erzielt (**Pak** 2010). Da in der Literatur vorwiegend die normobare Hypoxieexposition beschrieben wird, wurde dieses Modell auch in der vorliegenden Arbeit verwendet (**Kapitsinou** 2016; **Tian** 2021).

Eine vierwöchige Hypoxieexposition führt bei Mäusen zur sicheren Entstehung einer manifesten PH mit RVH (**Ikeda** 2019). Daher erfolgte die Hypoxie- bzw. Normoxieexposition der Mäuse in der vorliegenden Arbeit für 4 Wochen. Um die Veränderungen des RV analysieren zu können, erfolgte bei Versuchsende eine echokardiografische Untersuchung.

Die Verwendung von CHE zusammen mit dem VEGF-Antagonisten Sugen5416 führt, im Gegensatz zu einer reinen CHE, zur Ausbildung charakteristischer plexiformer Läsionen in den Gefäßen und ruft zudem eine stärkere Symptomatik mit teilweisem Versterben der Tiere hervor. Da diese vaskulären Charakteristika beim Menschen mit CHPH nicht zu finden sind und bis heute nicht vollständig geklärt ist, welche klinische Klasse durch Kombination aus Sugen5416 und CHE imitiert wird, wurde auf die Anwendung von Sugen5416 in der vorliegenden Arbeit verzichtet (**Abe** 2010; **Bikou** 2020; **Pak** 2010; **Taraseviciene-Stewart** 2001; **Vitali** 2014).

Eine weitere Möglichkeit die Entstehung von PH im Tiermodell zu induzieren, besteht in der Gabe des Pyrrolizidinalkaloids MCT bzw. dessen Stoffwechselprodukts MCTP. Da die

Entstehung einer PH nach Applikation von MCT und MCTP im Mausmodell kritisch diskutiert wird und die Ergebnisse nicht immer reproduziert werden können, ist die Verwendung dieses Modells nicht gut geeignet um die Entstehung von PH bei Mäusen zu untersuchen (**Dumitrascu 2008; Raoul 2007**).

### 5.2.2 Wahl des Zellkulturmodells

Obwohl die Untersuchung des Gesamtorganismus für die Entstehung von PH unerlässlich ist, können zellbasierte Analysen einen ebenso wichtigen Beitrag leisten. Mithilfe molekularbiologischer Untersuchungen können sie insbesondere der Entschlüsselung von Signalwegen und der Identifizierung wichtiger, an der Pathogenese beteiligter Proteine dienen.

Präkapilläre pulmonalarterielle glatte Muskelzellen zeigen unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Proliferation und Migration sowie eine reduzierte Apoptose (**Pietra 2004; Stenmark 2009**). Die verminderte Apoptose bei gleichzeitig gesteigerter Proliferation und Migration führen zum pathophysiologischen Umbauprozess der Lungengefäße (**Malczyk 2016**). Es entsteht eine Zunahme der Muskularisierung kleiner Lungengefäße sowie eine Neomuskularisierung von zuvor nicht-muskularisierten Gefäßen (**Rabinovitch 1979**). Somit trägt das veränderte Verhalten der PASMC maßgeblich zur Entstehung von PH bei. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit besonderes Augenmerk auf diesen Zelltyp gelegt und PASMC aus murinen Lungen für die eigenen Versuche isoliert. Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  können die Proliferations-, Migrations- sowie Apoptoserate von PASMC beeinflussen (**Malczyk 2017; Pietra 2004; Stenmark 2009**). Um Alterationen des  $Ca^{2+}$ -Haushalts von PASMC isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu TRPC WT Mäusen zu untersuchen, wurden daher fluoreszenzbasierte Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  durchgeführt.

Neben den PASMC nehmen auch pulmonalarterielle Endothelzellen (PAEC) Einfluss auf die Pathogenese der PH (**Malczyk 2016; Voelkel 2000**). Über sezernierte vasoaktive Substanzen können PAEC das Verhalten umliegender Zelltypen, wie z. B. PASMC, verändern (**Galiè 2004**). Versuche mit PASMC und PAEC in Co-Kultur könnten daher weitere Informationen zu Signalwegen, die an der Entstehung von PH beteiligt sind, liefern, waren aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit (**Gairhe 2011**).

Bei der Analyse primärer Zellen müssen wichtige Aspekte beachtet werden. Unter anderem kann bei der Isolation von PASMC aus murinen Lungen keine Reinkultur erreicht werden. So sind, neben PASMC, weitere Zelltypen, insbesondere Fibroblasten, in der isolierten Zellkultur vorhanden. In der Literatur sind Kulturen mit einem maximal möglichen Anteil der PASMC von bis zu 80% beschrieben (**Malczyk** 2013). Da dieser jedoch variiert, kann es folglich zu einer Beeinflussung der zellbasierten Versuche kommen. Des Weiteren kann sich der Phänotyp der isolierten SMC je nach Herkunft, Kultivierung oder verwendeter Zellpopulation unterscheiden (**Wang** 2016, **Wohrley** 1995; **Xie** 2011). Zum Beispiel sind SMC der inneren *Tunica media*, weniger differenziert, als SMC des äußeren Bereichs der *Tunica media* (**Dempsey** 1997; **Slomp** 1997). Zudem können sie in Abhängigkeit äußerer Einflüsse ihren Phänotypen vom differenzierten, kontraktile zum dedifferenzierten, proliferierenden Phänotypen ändern (**Yi** 2012; **Yao** 2019). Beispielsweise zeigen frisch isolierte PASMC weiterhin die Fähigkeit zu kontrahieren, während sie ab Passage 2 bis 3 vorwiegend einen proliferierenden Phänotyp aufweisen (**Worth** 2001).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass zellbasierte Versuche nur schwer zu standardisieren und zudem nur bedingt reproduzierbar sind. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit großer Wert auf gleichbleibende Bedingungen während der Zellversuche gelegt, um eine möglichst hohe Aussagekraft zu erreichen.

### 5.3 Bedeutung von TRPC1, 3 und 6 für die Entstehung einer CHPH

#### 5.3.1 TRPC1, 3 und 6 *in vivo*

Ein andauernder Aufenthalt in großen Höhen, der mit globaler alveolärer Hypoxie einhergeht, führt beim Menschen zur Entstehung von CHPH (**Simonneau** 2009). Die Pathogenese dieser Erkrankung kann im Mausmodell mithilfe chronischer experimenteller Hypoxieexposition imitiert werden (**Stenmark** 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von TRPC1, 3 und 6 Proteinen auf die Entstehung einer CHPH untersucht. Nach 28-tägiger Hypoxieexposition konnte die Entwicklung einer PH mit einhergehender RVH bei TRPC WT Mäusen mithilfe hämodynamischer, echokardiografischer und histologischer Untersuchungen festgestellt werden, wodurch die

Entstehung einer CHPH, mithilfe des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiermodells, bestätigt werden kann.

Dabei ergab sich ein signifikant höherer Hämatokrit bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach CHE im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Sachverhalt lässt folgende Interpretation zu: Zwar wurde nach Normoxieexposition kein Unterschied des Hämatokriten zwischen den beiden Genotypen festgestellt, trotzdem könnte der globale Knockout des *Trpc1*, 3 und 6 Gens einen Einfluss auf die Blutbildung oder Gerinnung haben und somit den Hämatokriten beeinflussen. Möglicherweise wird dieser Effekt durch die Hypoxieexposition verstärkt und ist daher nur in dieser Gruppe feststellbar.

Weiterhin konnte bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach CHE ein signifikant geringerer Anstieg des RVSP sowie ein geringerer RVWT und PVR<sub>echo</sub> nach CHE im Vergleich zu TRPC WT Mäusen festgestellt werden. Hingegen zeigte der Fulton Index, der RVID, die TAPSE sowie PAAT/RVET keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Zudem wiesen TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse einen erhöhten CO sowohl nach CHE als auch nach Normoxieexposition auf. Prinzipiell ist das Vorhandensein einer rechtsventrikulären Dekompensation möglich, da diese mit einem reduzierten RVSP einhergeht (**Konstam** 2018). Eine rechtsventrikuläre Dysfunktion nach CHE bei Mäusen ist in der Literatur jedoch nur als sehr selten beschrieben (**Stenmark** 2009) und daher eher unwahrscheinlich. Zudem konnte kein reduzierter CO, wie er bei Vorliegen einer rechtsventrikulären Dekompensation zu erwarten wäre, festgestellt werden. Ebenso kann eine rechtsventrikuläre Dysfunktion in der vorliegenden Arbeit durch den RVID und die TAPSE nicht bestätigt werden. Da sich das vaskuläre Remodelling zwischen TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach CHE nicht unterschied, könnte eine Veränderung des Gefäßtonus eine weitere Erklärung für den reduzierten RVSP der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach Hypoxieexposition sein. Zum einen konnte ein reduzierter PVR<sub>echo</sub> für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach CHE festgestellt werden, zum anderen zeigten TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse keinen Anstieg des  $\Delta$ PAP bei akuter und anhaltender Hypoxie in Untersuchungen der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Lunge. Ein möglicher Zusammenhang zwischen einem reduzierten  $\Delta$ PAP und einem reduzierten RVSP nach CHE konnte bereits von Xia et al. (2014) für TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC6<sup>-/-</sup> sowie TRPC1 und 6 defiziente Mäuse (TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse) gezeigt werden (**Xia** 2014). Da die Analyse der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit war, werden diese Daten hier nicht gezeigt, sind aber der Vollständigkeit halber im Anhang

dargestellt (siehe Kapitel 12.1). Weiterhin zeigten Weissmann et al. (2005) einen positiven Effekt eines erhöhten Hämatokriten auf die Entstehung von PH (**Weissmann 2005**). Da TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse in der vorliegenden Arbeit einen erhöhten Hämatokriten nach CHE aufwiesen, könnte auch dies eine mögliche Erklärung für den reduzierten Anstieg des RVSP nach CHE sein. Des Weiteren zeigten TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant höhere Relation des RV Gewichts zur Tibiallänge nach CHE. Diese Abweichung sowie die Unterschiede der RVWT und des Fulton Index lassen drei Interpretationen zu: Zum einen könnte die echokardiografische Untersuchung des RV sensitiver als die Messung des RV Gewichts sein. Dies kann dazu führen, dass das Vorhandensein von nur geringen Unterschieden durch echokardiografische Messungen besser eruiert werden kann als durch die Gewichtsbestimmung der Ventrikel. Zum anderen könnte das globale Fehlen der *Trpc1, 3* und *6* Gene die Morphologie und Funktion des RV der Maus beeinflussen und die beschriebenen Unterschiede zwischen den beiden Linien bedingen. Zudem können Veränderungen des LV die Berechnung des Fulton Index beeinflussen, was die Abweichungen zwischen den Parametern erklären kann.

Bei der histologischen Analyse der Muskularisierung konnte für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse kein protektiver Effekt, wie er für singuläre TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und teilweise auch für TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse beschrieben ist, beobachtet werden (**Malczyk 2013; Mayser 2021; Xia 2014**). Zudem zeigten Xia et al. (2014), dass auch TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine reduzierte Muskularisierung kleiner pulmonaler Gefäße nach CHE aufweisen (**Xia 2014**). Das zusätzliche Fehlen des TRPC3 Proteins in TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen könnte eine kompensatorische, verstärkte Expression anderer Proteine verursachen und so den protektiven Effekt des Doppelknockouts antagonisieren. Zusammenfassend lässt sich die Entstehung einer PH mit geringerem Schweregrad für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu TRPC WT Mäusen feststellen. Daher könnte ein partieller Schutz vor der Entstehung einer PH, wie er auch für TRPC1<sup>-/-</sup>, TRPC3<sup>-/-</sup> und zum Teil auch für TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse beschrieben ist, vorliegen (**Malczyk 2013; Mayser 2021; Xia 2014**).

### 5.3.2 TRPC1, 3 und 6 *in vitro*

Ein gesteigertes Proliferations- und Migrationsverhalten sowie eine verminderte Apoptoserate von PASMC sind entscheidende Mechanismen für die Entstehung von CHPH

(Pietra 2004; Stenmark 2009). Da in vorangegangenen Studien bereits gezeigt werden konnte, dass chronische Hypoxieexposition von PASMC zu einer erhöhten Proliferations- sowie Migrationsrate führt, wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mögliche Unterschiede zwischen den beiden Genotypen nach Hypoxieexposition untersucht (Malczyk 2017). Eine reduzierte Apoptoserate nach chronischer Hypoxieexposition wurde - mithilfe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode - bislang nicht gezeigt. Jedoch ist eine Abnahme der Apoptoserate durch chronische Hypoxie in der Literatur beschrieben, sodass auch hier ausschließlich mögliche Abweichungen zwischen den beiden Genotypen nach Hypoxieexposition untersucht wurden (Fernandez 2015; Schermuly 2011; Stenmark 2018). Für die TRPC Proteine konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie einen Einfluss auf die Proliferation von PASMC haben. So zeigten PASMC von TRPC1<sup>-/-</sup> sowie von TRPC1/6<sup>-/-</sup> Mäusen einen reduzierten Anstieg der Proliferation unter chronischer Hypoxie (Malczyk 2013). Für TRPC3<sup>-/-</sup> Mäuse konnte jedoch kein Unterschied der Proliferation nach chronischer Hypoxie von PASMC festgestellt werden (Maysen 2021). Im Gegensatz dazu zeigten PASMC isoliert aus Ratten eine niedrigere, durch ET-1 induzierte Proliferationsrate nach *knockdown* von TRPC3 und TRPC4 (Jiang 2016). Die Bedeutung von TRPC6 für die Proliferation der PASMC wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So berichteten Malczyk et al. (2013), dass das Fehlen des TRPC6 Proteins bei Mäusen keinen Effekt auf die Proliferationsrate hat, während Yu et al. (2004) eine reduzierte Proliferationsrate von PASMC bei IPAH Patienten nach *knockdown* von TRPC6 feststellen konnten (Malczyk 2013; Yu 2004). Allerdings könnten die unterschiedlichen zugrundeliegenden Mechanismen der Entstehung einer CHPH bzw. IPAH die abweichenden Ergebnisse zwischen den beiden Arbeitsgruppen begründen. Für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse ergab sich kein Unterschied der Proliferationsrate verglichen mit TRPC WT Mäusen nach chronischer Hypoxie. Daher ist zu vermuten, dass das Fehlen aller drei Proteine zu einer Gegenregulation führt, die dem Effekt des TRPC1 *knockouts* entgegenwirkt und mit einer erhöhten Proliferationsrate einhergeht. Da in der Literatur beschrieben ist, dass die Phosphorylierung der mitogenaktivierten Proteinkinase (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) p38 einen Einfluss auf das Hypoxie induzierte Proliferationsverhalten von PASMC nimmt, wurde die Proteinexpression von p38 und dem phosphorylierten p-p38 untersucht (Li 2020; Yue 2020). Dabei konnte ein Hypoxie induzierter Anstieg der Expression von p-p38, wie er auch bereits in der Literatur beschrieben ist, in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Malczyk 2017).

Zudem zeigten PASCMS der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine generell verminderte Expression von p-p38 im Vergleich zu PASCMS der TRPC WT Mäuse. Dass trotz dieser verminderten Expression von p-p38 kein Unterschied der Proliferationsrate zwischen den Genotypen beobachtet werden konnte, könnte durch eine mögliche Gegenregulation anderer, die Proliferation beeinflussender, Proteine begründet sein. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass das angleichen der Proliferationsrate von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> und TRPC WT Mäusen nach chronischer Hypoxie nicht durch eine veränderte Regulation von p-p38 begründet ist. Für TRPC1<sup>-/-</sup> Mäuse konnte kein Unterschied für die Phosphorylierung von p38 festgestellt werden (**Malczyk** 2017). Hingegen ist eine Hochregulation von TRPC6 durch Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs in PASCMS von Ratten beschrieben (**Lu** 2010; **Zhang** 2014). Derzeit gibt es leider keine Antikörper, die TRPC4, 5 und 7 sicher detektieren, sodass eine Untersuchung dieser Proteine in der vorliegenden Arbeit nur auf mRNA-Ebene erfolgen konnte. Während für TRPC5 eine reduzierte Genexpression festgestellt werden konnte, ergab sich für TRPC7 eine erhöhte Genexpression in PASCMS von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> verglichen mit TRPC WT Mäusen basierend auf einem Genotyp-Effekt. Daher könnte eine kompensatorische Hochregulierung von TRPC7 möglicherweise ein Grund für die veränderte Proliferationsrate der PASCMS von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> im Vergleich zu TRPC1<sup>-/-</sup> Mäusen sein. Dies müsste jedoch auf Proteinebene bestätigt werden, sobald Antikörper, die TRPC7 sicher detektieren, zur Verfügung stehen.

In der Literatur ist ein reduzierter Anstieg der Migrationsrate nach Hypoxieexposition für PASCMS der TRPC1<sup>-/-</sup> Mäuse verglichen mit TRPC WT Mäusen beschrieben (**Malczyk** 2017). Des Weiteren wird berichtet, dass TRPC6 über calciumsensitive Rezeptoren Einfluss auf das Migrationsverhalten von PASCMS nimmt (**Tang** 2016). Zudem zeigten pulmonalvenöse SMC eine verminderte Migrationsrate durch knockdown von TRPC6 nach Hypoxieexposition (**Wang** 2016). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied der Migrationsrate für PASCMS der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse festgestellt werden. Jedoch wiesen PASCMS isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen eine tendenziell - aber nicht signifikant - höhere Migrationsrate im Vergleich zu TRPC WT Mäusen auf. Auch hier ist zu vermuten, dass eine kompensatorische Gegenregulation zugrunde liegt. Daher müssten weitere Untersuchungen angeschlossen werden, um den Einfluss von TRPC1, 3 und 6 Proteinen auf die Migration von PASCMS zu eruieren.

Die Analyse der Apoptose von PASMCMC ergab eine signifikante Reduzierung für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse verglichen mit TRPC WT Mäusen nach Hypoxieexposition. Hingegen konnte unsere Arbeitsgruppe für TRPC1<sup>-/-</sup> Mäuse keinen Unterschied zu TRPC WT Mäusen bei hypoxisch exponierten PASMCMC feststellen (**Malczyk** 2017). Daher ist zu vermuten, dass ein kombiniertes Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine die Apoptose der PASMCMC hemmt. Im Gegensatz dazu zeigten Qiao et al. (2021), dass TRPC6 für das Apoptoseverhalten von PASMCMC nicht von Bedeutung ist. Die Inhibierung des TRPC6 Kanals mithilfe von SKF-96365 führte zu keinem Unterschied in der Apoptoserate nach Hypoxieexposition zwischen den Gruppen (**Qiao** 2021). Jedoch isolierte diese Arbeitsgruppe Zellen aus der Pulmonalarterie von Broilern und kultivierte sie bei lediglich 3% O<sub>2</sub> für 48 h während die Kultivierung in der vorliegenden Arbeit bei 1% O<sub>2</sub> für 72 h erfolgte. Diese methodischen Differenzen sowie der unterschiedliche Stamm der untersuchten Spezies (Säugetier vs. Vogel) können die unterschiedlichen Resultate bedingen.

Die unveränderte Proliferations- sowie Migrationsrate sowie die verminderte Apoptoserate der PASMCMC der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse könnte erklären, weshalb keine Unterschiede für das vaskuläre Remodelling in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnten. Daher unterstützen die Resultate die Vermutung, dass der reduzierte RVSP, der sich für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach CHE ergab, durch einen reduzierten Gefäßtonus bedingt sein könnte. Ob das gleichzeitige Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine auch unter normoxischen Bedingungen einen Einfluss auf die Proliferations-, Migrations- und Apoptoserate hat, müsste in weiterführenden Untersuchungen eruiert werden.

Die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase von PASMCMC kann das Proliferations-, Migrations- und Apoptoseverhalten von Zellen beeinflussen und damit zur Entstehung von CHPH beitragen (**He** 2018; **Malczyk** 2013; **Shibata** 2019). Die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wiederum wird von TRPC Kanälen beeinflusst. Diese werden derzeit in der Literatur, je nach Aktivierung, in ROC und SOC unterteilt. Nach chronischer Hypoxieexposition von murinen PASMCMC kommt es zu einem gesteigerten ROCE, der mit einer erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Einstromgeschwindigkeit einhergeht (**Malczyk** 2017). Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls eine Bedeutung des ROCE für den Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nach chronischer Hypoxie zeigen (**Lin** 2004; **Shibata** 2019). Ob auch der SOCE eine wichtige Rolle für den Hypoxie induzierten Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> spielt, wird in der Literatur kontrovers

diskutiert. Während unsere Arbeitsgruppe keinen Unterschied des SOCE nach chronischer Hypoxie feststellen konnten (nicht publizierte Daten der AG Weißmann, Justus-Liebig-Universität Gießen), berichten Lin et al. (2004) und Shibata et al. (2019) von einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über SOC (Lin 2004; Shibata 2019). Jedoch gibt es zwischen den Arbeitsgruppen methodische Unterschiede, die die abweichenden Resultate erklären können wie beispielsweise die unter hypoxischen Bedingungen verwendeten  $\text{O}_2$ -Konzentration von 1% bzw. 4%.

Um die Bedeutung der TRPC1, 3 und 6 Proteine auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase von PASMC zu untersuchen, wurden Messungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durchgeführt. Nach Applikation von OAG in Calcium-haltigem Puffer zeigten PASMC der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse neben einer signifikant geringeren basalen und maximalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  einen ebenso signifikant langsameren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Damit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von TRPC1, 3 und 6 den ROCE maßgeblich reduziert. In der Literatur sind für PASMC von TRPC1<sup>-/-</sup> Mäusen vergleichbare Resultate beschrieben, wobei sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromgeschwindigkeit nach OAG Applikation von den PASMC der Kontrollgruppe deutlicher unterscheidet als dies für PASMC der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse zutrifft (Malczyk 2017). Daher ist zu vermuten, dass TRPC1 Proteine essentiell für die Bildung und Funktion der TRPC1/3/6 Kanäle sind und die Kanalbildung bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> wie bei TRPC1<sup>-/-</sup> Mäusen erfolgt. Da die Geschwindigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in PASMC aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen weniger reduziert ist als in PASMC aus TRPC1<sup>-/-</sup> Mäusen, ist anzunehmen, dass es durch Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine zu einer kompensatorischen Gegenregulation anderer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle kommt.

Die spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle scheinen dabei allerdings keine wichtige Rolle zu übernehmen, da die Inhibierung dieser Kanäle durch Applikation von Nifedipin keinen Einfluss auf die Unterschiede der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> und TRPC WT Mäusen hatte.

Die Gabe des unspezifischen TRPC-Inhibitors SKF-96365 führte hingegen dazu, dass sich sowohl die basale und maximale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  als auch die Einstromgeschwindigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den PASMC der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> und TRPC WT Mäuse anglich. Hierbei erreichte die basale und maximale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  der PASMC aus TRPC WT Mäusen sogar niedrigere Werte als die der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse. Möglicherweise wird eine kompensatorischen Gegenregulation, wie sie bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen zu vermuten ist, erst beim längerfristigen Fehlen dieser Kanäle erreicht, während sie beim akuten Inhibieren keine Rolle spielt. In der Literatur konnte bereits

bestätigt werden, dass SKF-96365 zu einer reduzierten  $[Ca^{2+}]_i$  führt. So zeigten Wang et al. (2006), dass die Applikation von SKF-96365 zu einem Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  in PASMC von Mäusen und Ratten nach CHE führt (Wang 2006). Da es sich bei SKF-96365 um einen unspezifischen TRPC-Inhibitor handelt, sind die Ergebnisse hier nur eingeschränkt interpretierbar und müssen mithilfe weiterer Untersuchungen bestätigt werden, sobald spezifische Inhibitoren für alle hier untersuchten TRPC Proteine zur Verfügung stehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Gabe des SERCA-Inhibitors CPA keine veränderte Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher in PASMC der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu TRPC WT Mäusen festgestellt werden. Allerdings zeigten PASMC isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen eine tendenziell schnellere Entleerung ihrer  $Ca^{2+}$ -Speicher im Vergleich zu PASMC der TRPC WT Mäuse. Auch dies lässt eine kompensatorische Regulation anderer Proteine aufgrund des Dreifachknockouts vermuten. Eine mögliche kompensatorische Gegenregulation müsste jedoch mithilfe weiterer Analysen genauer untersucht werden. Weitere Unterschiede konnten nicht beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe und Storch et al. (2012) und zeigt, dass die Zugehörigkeit von TRPC1 zu SOC hinterfragt werden muss (Malczyk 2017; Storch 2012).

Um den Einfluss des Dreifachknockouts auf andere TRPC- und spannungsabhängige L-Type  $Ca^{2+}$ -Kanäle sowie deren Bedeutung für den SOCE zu untersuchen, wurden Versuche mit den Substanzen Nifedipin und SKF-96365 durchgeführt. Die Applikation von Nifedipin führte dazu, dass die Reaktion auf die Gabe von  $Ca^{2+}$ -haltigem Puffer nahezu vollständig verschwand. Dies lässt vermuten, dass SOC über den  $Ca^{2+}$ -Einstrom der spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VOC) aktiviert werden. Da sich zwischen TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> und TRPC WT Mäuse kein Unterschied feststellen ließ, ist anzunehmen, dass keine Verbindung zwischen dem SOCE und den hier untersuchten TRPC1, 3 und 6 Proteinen besteht.

In Versuchen mit und ohne SKF-96365 war kein Unterschied bei der Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher der PASMC isoliert aus TRPC WT Mäusen zu beobachten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die durch SKF-96365 inhibierten Kanäle nur eine untergeordnete Rolle beim SOCE einnehmen und der SOCE über andere Kanäle weiterhin möglich ist. Somit scheint die Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher in PASMC TRPC-unabhängig zu erfolgen. Hingegen ergab sich nach zeitgleicher Applikation von CPA mit SKF-96365 eine signifikant niedrigere maximale  $[Ca^{2+}]_i$  sowie  $Ca^{2+}$ -Einstromgeschwindigkeit in PASMC von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> verglichen mit TRPC

WT Mäusen. Somit scheinen zum einen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher der PAMSC von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach Gabe von SKF-96365 leerer zu sein, zum anderen lässt sich daraus eine reduzierte Befüllung der Speicher vermuten. Dieser Effekt geschieht unabhängig von TRPC1, 3 und 6 Proteinen, da diese Beobachtung bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen in Versuchen ohne SKF-96365 nicht gemacht werden konnte. Vielmehr wird die schnellere Speicherentleerung, wie sie in CPA-Versuchen festgestellt werden konnte, durch die Gabe von SKF-96365 umgekehrt. Folglich könnte die Applikation von SKF-96365 dazu führen, dass die kompensatorische Gegenregulation, die in Versuchen ohne SKF beobachtet wurde, nach dessen Applikation nicht mehr zum Tragen kommt. Andererseits ist es möglich, dass SKF-96365 nicht nur zu einer Inhibierung von TRPC-Kanälen führt, sondern möglicherweise die Funktion weiterer Proteine beeinflusst. Beispielsweise wird in der Literatur ein inhibitorischer Effekt von SKF-96365 auf Stim1 und Orai1 beschrieben (Mai 2016). Da SKF-96365 nur ein unspezifischer TRPC-Inhibitor ist, sind auch diese Ergebnisse nur eingeschränkt interpretierbar und müssen mittels weiterer Untersuchungen überprüft werden, sobald spezifische Inhibitoren für alle hier untersuchten TRPC Proteine verfügbar sind.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von Genen untersucht, die von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der PAMSC beeinflusst werden. Da die verwendeten Antikörper gegen Stim- und Orai-Proteine sowie gegen den Ryr2 und die SERCA2 nicht sicher funktionierten, konnten diese ausschließlich auf mRNA-Ebene untersucht werden. Hingegen wurde die Expression des IP<sub>3</sub>R sowohl auf Protein- als auch auf Gen-Ebene analysiert. Dabei konnte für *Stim1* und *Stim2*, *Orai3* wie auch für *Atp2a2* und den *Itpr1* eine Hypoxie-induzierte Herunterregulierung der Genexpression festgestellt werden. Auf Proteinebene ließ sich das für den p-IP<sub>3</sub>R bestätigen, auch wenn sich zwischen Hypoxie- und Normoxie-exponierten PAMSC der TRPC WT Mäuse aufgrund der Streuung der Daten kein signifikanter Unterschied im *post-hoc* Test ergab. Dies unterstützt die vorliegenden Resultate zu Untersuchungen des SOCE und deutet darauf hin, dass SOC bei der Entstehung von CHPH nur eine untergeordnete Rolle spielen. Jedoch müssten, sobald Antikörper vorliegen, die die entsprechenden Proteine sicher detektieren, weitere Untersuchungen der Proteinexpression erfolgen, um die Ergebnisse der mRNA-Analysen auf Proteinebene zu bestätigen. Des Weiteren zeigten PAMSC der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine stärkere Herunterregulierung des p-IP<sub>3</sub>R nach Hypoxieexposition

als PASMC der TRPC WT Mäuse. Dies scheint jedoch keinen Einfluss auf den SOCE zu haben, da in Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  keine Unterschiede für den SOCE zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden konnten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit berichteten He et al. (2018) von einer erhöhten Proteinexpression von Stim1 und Stim2 sowie von Orai1 und Orai2 in PASMC nach Hypoxieexposition (He 2018). Diese Arbeitsgruppe verwendete jedoch kommerziell verfügbare, humane PASMC. Zudem wurden die Zellen lediglich für 72 Stunden bei einer  $O_2$ -Konzentration von 3% kultiviert. Hingegen berichten Hou et al. (2013) von einer erhöhten Expression von Stim1 in distalen pulmonalen Arterien von Ratten während Song et al. (2011) keine Unterschiede der Stim1-Expression - in PASMC von Patienten, die an IPAH erkrankt sind - beobachten konnten (Hou 2013; Song 2011). Diese Arbeitsgruppe stellte jedoch eine erhöhte Expression von Stim2 und Orai2 bei vorliegender IPAH fest (Song 2011). Zudem konnte die Proliferation von PASMC durch knockdown von Stim1 reduziert werden (Hou 2013). Die Rolle von SERCA2 wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Liu et al. (2020) konnte eine erhöhte SERCA2 Proteinexpression in humanen pulmonalvenösen SMC sowie in Pulmonalvenen von Mäusen nach Hypoxie feststellen (Liu 2020). Im Gegensatz dazu zeigte Hadri et al. (2013) eine reduzierte SERCA2 Proteinexpression bei PAH-Patienten und demonstrierte einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation und Migration von humanen PASMC (Hadri 2013). Welche Bedeutung Stim- und Orai-Proteine sowie SERCA2 für die Entstehung von PH haben konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit somit nicht vollständig geklärt und muss daher weiter untersucht werden.

Im nächsten Schritt wurde die Proteinexpression von Calmodulin und CamKII untersucht. Bei CamKII handelt es sich um ein Enzym, das durch die Bindung von Calmodulin aktiviert werden kann. Des Weiteren kann eine Autophosphorylierung von CamKII am Thr286 erfolgen, die zu einer permanenten Aktivierung des Enzyms führt. Jedoch kann es nur dann zu dieser Autophosphorylierung kommen, wenn intrazellulär ausreichend  $Ca^{2+}$  oder Calmodulin akkumuliert (Barria 1997; Hughes 2001).

Für die Expression des Calmodulins konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Auch für die Proteinexpression von p-CamKII ergaben sich in PASMC keine signifikanten Unterschiede. Jedoch konnte eine tendenziell - aber nicht signifikant - erhöhte Expression von p-CamKII nach Hypoxieexposition in Relation zur Proteinmenge von CamKII beobachtet werden, auch wenn

diese aufgrund der Streuung der Daten keine Signifikanz erreichte. Da jedoch die Proteinmenge von CamKII in PASMC nach Hypoxieexposition signifikant geringer war, lassen sich diese Ergebnisse nur bedingt interpretieren. Auch in Relation zur Proteinmenge von  $\beta$ -Aktin zeigte sich eine erhöhte, jedoch nicht signifikante Proteinexpression von p-CamKII für Hypoxie-exponierte PASMC isoliert aus TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen. In der Literatur ist ein Effekt der CamKII Aktivität auf verschiedene Zelltypen beschrieben. So konnte nach Aktivierung von CamKII die Migration pulmonaler Endothelzellen sowie eine erhöhte Proliferationsrate in vaskulären glatten Muskelzellen beobachtet werden (**House 2007, Meoli 2009**). Eine reduzierte p-CamKII Expression konnte im Modell der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie bei Mäusen festgestellt werden. Jedoch war auch CamKII in diesem Modell reduziert exprimiert, während sich für Calmodulin eine erhöhte Proteinmenge ergab (**Turlova 2021**). Allerdings unterscheidet sich das von Turlova et al. (2021) untersuchte Modell von dem in der vorliegenden Arbeit. Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der p-CamKII ein Antikörper gegen Tyr231 von der Firma CellSignal verwendet. Dabei handelt es sich laut Hersteller um eine noch nicht publizierte Phosphorylierungsstelle der p-CamKII. Dies könnte zudem die unterschiedlichen Resultate zwischen Turlova et al. (2021) und der vorliegenden Arbeit erklären.

Nichtsdestoweniger lässt sich zusammenfassend feststellen, dass ein Effekt des Calmodulin/CamKII-Signalwegs auf PASMC nicht ausgeschlossen werden kann und daher weitergehend untersucht werden sollte. Eine Möglichkeit bietet dabei die Messung der CamKII-Aktivität (**Ashpole 2013; Wang 2014**).

Eine Herunterregulierung von  $\alpha$ -SMA nach Hypoxieexposition ist in der Literatur beschrieben und konnte durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (**Gong 2019; Hao 2017; Malczyk 2017**). Allerdings war der Unterschied der Hypoxie- und Normoxie-exponierten PASMC der TRPC WT Mäuse im *post-hoc* Test aufgrund der Streuung der Daten nicht signifikant. Ein Einfluss des gleichzeitigen Fehlens der *Trpc1*, 3 und 6 Gene auf Strukturproteine der PASMC konnte in der vorliegenden Arbeit mithilfe von Untersuchungen des  $\alpha$ -SMAs nicht gezeigt werden.

## 5.4 Einfluss des globalen Knockouts von TRPC1, 3 und 6 auf die Physiologie der Maus

### 5.4.1 Entstehung von rechts- und linksventrikulärer Hypertrophie

Im Rahmen der hämodynamischen Messung erfolgt die Bestimmung des LVSP sowie des SAP, um Auswirkungen der gentechnischen Veränderung auf die Hämodynamik zu überprüfen und um Effekte des LV auf den RVSP auszuschließen. Dabei wurde in der vorliegenden Arbeit ein erhöhter LVSP und SAP bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> im Vergleich zu TRPC WT Mäusen festgestellt. Ein Einfluss der CHE auf den LVSP und SAP ist in der Literatur nicht beschrieben, sodass das Mausmodell der CHE als Ursache für den Anstieg des LVSP und SAP als sehr unwahrscheinlich zu werten ist (Cruz 2012; Kojima 2019; Nakano 2005). Zudem konnte der Unterschied des LVSP und SAP nicht nur nach CHE, sondern auch bei Normoxie-exponierten TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden. Dies lässt annehmen, dass das kombinierte Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine einen Einfluss auf die Hämodynamik der Maus nimmt. Diese Vermutung wird durch den signifikanten Anstieg des Gewichts des LV und S ohne und mit Relation zur Tibiallänge für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach Normoxieexposition und CHE bestärkt und lässt die Entstehung einer LVH annehmen. In echokardiografischen Untersuchungen konnte jedoch keine erhöhte LVWT bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden. Grund dafür könnte die Streuung der Messwerte sein, sodass die Aufstockung der n-Zahl Aufschluss über eine mögliche, durch den Dreifachknockout induzierte LVH geben könnte. Zudem könnte sich das Gewicht des LV durch die Einlagerung von Kollagen erhöhen, sodass eine LVH mit unveränderter LVWT zu sehen ist. Des Weiteren ergab sich eine signifikant geringere EF und ein signifikant größerer LVID für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nach CHE. Eine solche Veränderung dieser Werte ist in der Literatur bei Vorliegen einer linksventrikulären Dysfunktion beschrieben (Noll 2020; Ponikowski 2016; Riehle 2011), sodass sich eine beginnende linksventrikuläre Dysfunktion bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach CHE vermuten lässt.

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass TRPC Kanäle bei der Entstehung von kardialer Hypertrophie eine wichtige Rolle spielen können (Dragún 2019; Seo 2014). Änderungen in der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> beeinflussen das Verhalten von Kardiomyozyten und tragen entscheidend zur Entstehung von LVH und zu Herzinsuffizienz bei. Zudem führt eine Erhöhung

der  $[Ca^{2+}]_i$ ; dazu, dass kardiale Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren (**Kirschmer** 2014). Nakayama et al. (2006) zeigten, dass eine Überexpression von TRPC3 zur Entstehung einer ventrikulären Hypertrophie beiträgt (**Nakayama** 2006). Zudem zeigten Seth et al. (2009) und Wu et al. (2010), dass das Fehlen von *Trpc1*, *3* oder *6* Genen vor der Entstehung einer kardialen Hypertrophie schützt (**Wu** 2010; **Seth** 2009). Weiterhin wurde eine höhere Expression von 1) TRPC3 und TRPC6 in Herzen von Mäusen, 2) TRPC1, TRPC3, TRPC6 und TRPC7 in Herzen von Ratten und 3) TRPC1, TRPC5 und TRPC6 in humanen Herzen bei vorliegender Herzinsuffizienz festgestellt (**Dragún** 2019; **Kirschmer** 2014). Nach transversaler aortaler Konstriktion (*transverse aortic constriction*, TAC) im Mausmodell konnte eine erhöhte Expression von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 gezeigt werden (**Falcón** 2020; **Eder** 2011). Auch in Versuchen mit TAC- und Ang II-induzierter linksventrikulärer Hypertrophie waren TRPC1<sup>-/-</sup> Mäuse partiell vor der Entstehung einer LVH geschützt (**Seth** 2009). Während Wu et al. (2010) zeigen konnten, dass die Kardiomyozyten-spezifische Deletion von entweder TRPC3 oder TRPC6 nach TAC partiell vor der Entstehung einer LVH schützt, demonstrierten Seo et al. (2014), dass die Deletion von TRPC3 und TRPC6 (TRPC3/6<sup>-/-</sup> Mäuse) einen besseren Schutz bietet als das Fehlen eines der beiden Proteine (**Wu** 2010; **Seo** 2014). Hingegen berichten Camacho Londoño et al. (2015) keinen protektiven Effekt bei TRPC3/6<sup>-/-</sup> Mäusen nach TAC (**Camacho Londoño** 2015). Darüber hinaus konnte nicht nur eine reduzierte LVH bei TRPC1 und TRPC4 defizienten Mäusen (TRPC1/4<sup>-/-</sup> Mäuse) festgestellt werden, sondern auch gezeigt werden, dass TRPC1 und TRPC4 für einen basalen  $Ca^{2+}$ -Einstrom in Kardiomyozyten verantwortlich sind, der der Feinabstimmung der systolischen und diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  dient (**Camacho Londoño** 2015).

Der in der Literatur beschriebene protektive Effekt singulärer TRPC1, *3* und *6* sowie gleichzeitiger TRPC3 und *6* Defizienz auf die Entstehung einer LVH konnte in der vorliegenden Arbeit für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse nicht festgestellt werden (**Seo** 2014; **Seth** 2009; **Wu** 2010). Hingegen lassen die erhobenen Resultate für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> und TRPC WT Mäuse annehmen, dass es durch den globalen Knockout von TRPC1, *3* und *6* Proteinen zur Entwicklung einer LVH mit Anstieg des LVSP und beginnender linksventrikulärer Dysfunktion kommt. Bezieht man die Veränderungen des RV mit ein, lässt sich die Entstehung einer Hypertrophie durch den globalen Dreifachknockout in beiden Ventrikeln vermuten (siehe Kapitel 5.3.1).

Um zu analysieren, ob der beschriebene Phänotyp ein mögliches Mausmodell für die PH der Gruppe 2 (PH bei Linksherzerkrankung) darstellt, wurden weitergehende Untersuchungen durchgeführt. Als Ursache für den veränderten kardialen Phänotyp der Maus kommt eine kompensatorische Gegenregulation anderer Proteine in Frage. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit mögliche Regulationen der Gen- und Proteinexpression im RV, LV und Plasma untersucht. Lediglich für TRPC7 konnte eine erhöhte Expression im RV der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse unabhängig von der exponierten Kondition festgestellt werden, die jedoch aufgrund der Streuung keine Signifikanz erreichte. Ob TRPC7 die Entstehung einer ventrikulären Hypertrophie beeinflusst, wurde bereits auch in vorausgegangenen Studien diskutiert. Beispielsweise konnte in isolierten, neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten nach Applikation des Hypertrophie-auslösenden Peptidhormons AngII eine vermehrte Expression des TRPC7 Gens beobachtet werden. Zudem zeigten diese Zellen nach Überexpression von TRPC7 eine erhöhte Apoptoserate (**Satoh** 2006). Um den möglichen Einfluss von TRPC7 zu bestätigen, könnte bei Mäusen eine Überexpression von TRPC7 vorgenommen und der entsprechende Phänotyp untersucht werden.

Da für TRPC4 keine Veränderungen festgestellt werden konnten und TRPC5 nur sehr gering exprimiert war, scheint eine Gegenregulation des TRPC4 und TRPC5 Gens nicht die Ursache des beschriebenen murinen Phänotyps zu sein. Um dies abschließend belegen zu können, müssten auch hier entsprechende Mausmodelle untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Genexpression des Peptidhormons ANP im LV von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des LV erreichte die *Nppa*-Expression im RV aufgrund der großen Streuung der Daten keinen signifikanten Unterschied. Dass eine erhöhte ANP Produktion mit Vorliegen einer ventrikulären Hypertrophie einhergeht und antihypertrophische Effekte vermitteln kann, ist in der Literatur beschrieben (**Holtwick** 2003; **Horio** 2000; **Klaiber** 2011; **Kuhn** 2004). Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Entstehung einer ventrikulären Hypertrophie bei Mäusen und Ratten zu einem Anstieg der Genexpression von *Nppa* in Kardiomyozyten des LV führt (**Cerrudo** 2021; **Kaganovsky** 2001; **Sergeeva** 2013). Obwohl ohne Proteinexpressionsanalysen von ANP dessen Rolle in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden kann, deutet die erhöhte *Nppa*-Expression auf das Vorhandensein einer

ventrikulären Hypertrophie bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen hin. Während die *Nppb*-Expression in den LV der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu TRPC WT Mäusen unverändert blieb, zeigte sich für den RV eine erhöhte Expression von *Nppb* nach CHE für beide Genotypen. Da es sich dabei um eine Genotyp-unabhängige Reaktion zu handeln scheint, wird in diesem Kapitel nicht weiter auf die Bedeutung von BNP auf den hier vorliegenden Maus-Phänotypen eingegangen. Darüber hinaus konnte eine tendenziell erhöhte Genexpression von *Myh7* im LV von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> verglichen mit TRPC WT Mäusen nachgewiesen werden, die aufgrund der Streuung allerdings nicht signifikant war. Daraus resultierte eine signifikant verminderte *Myh6* zu *Myh7*-Ratio zwischen den beiden Genotypen nach Normoxieexposition. Hingegen konnte nach CHE kein Unterschied zwischen TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> und TRPC WT Mäusen festgestellt werden. Ob es sich hierbei tatsächlich um einen Genotyp-Effekt handelt, der auch auf Proteinebene beobachtet werden kann, müsste in weiteren Untersuchungen analysiert werden. Das Verhältnis von  $\alpha$ - und  $\beta$ -MHC wird in der Literatur als Indikator für eine Herzmuskelhypertrophie oder Herzinsuffizienz beschrieben (Lowes 1997; Nielsen 2017). Im Gegensatz zu den Resultaten der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse in der vorliegenden Arbeit zeigten Wu et al. (2010), dass eine kardiospezifische Suppression des TRPC3 Gens zu einer reduzierten  $\beta$ -MHC-Expression nach TAC führt (Wu 2010). Weiterhin konnte in H9c2-Kardiomyozyten nach Behandlung mit AngII eine reduzierte Expression von  $\beta$ -MHC durch die Zugabe von SKF-96365 induziert werden (Cheng 2020). Obwohl eine Verbindung zwischen TRPC Proteinen und MHC Molekülen in der Literatur beschrieben ist, kann die genauere Rolle von MHC Molekülen für die Resultate der vorliegenden Arbeit nur durch weitergehende Untersuchungen bestimmt werden.

Da ein erhöhter LVSP durch blutdrucksteigernde und pro-proliferative Effekte des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems verursacht werden kann, wurde dieses System in der vorliegenden Arbeit weitergehend untersucht. Innerhalb dieses Systems erfolgt die Umwandlung von AngI zu AngII durch das ACE. Angiotensin II wiederum bindet an den Angiotensin-Rezeptor 1 (*Angiotensin II receptor type 1*, AT1R) und vermittelt über diesen u.a. pro-proliferative, pro-fibrotische und vasokonstriktorische Effekte (Chung 2020). Bei IPAH-Patienten wurden erhöhte Serumkonzentrationen von AngI und AngII festgestellt, die mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierten. Weiterhin konnte eine erhöhte Expression von

AT1R in den PASMC dieser Patienten festgestellt werden (**de Man** 2012). Zudem wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen demonstriert, dass die Blockierung des AT1R oder die Inhibierung des ACE vor der Entstehung einer MCT induzierten PH bei Ratten schützt (**de Man** 2012; **Kato** 2008; **Wittmer** 2015). In der vorliegenden Arbeit zeigten die Plasmakonzentrationen des AngI-Vorläufers Angiotensinogen (AGT) sowie des ACE keine Unterschiede zwischen TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> und TRPC WT Mäusen, sodass sich kein Einfluss des Dreifachknockouts und der Exposition erkennen lässt.

Hingegen konnte eine reduzierte ACE2-Konzentration der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse unabhängig von der Exposition sowie der TRPC WT Mäuse nach CHE festgestellt werden. ACE2 dient dem Abbau von AngII zu Ang1-7, welches an den MasR bindet. Darüber vermittelt Ang1-7 neben anti-inflammatorischen auch anti-proliferative sowie anti-fibrotische Effekte. Weiterhin trägt es über diesen Signalweg zur Vasodilatation und Diurese bei (**Chung** 2020). Die Rolle von ACE2 für die Entstehung einer PH wurde bereits mehrfach in der Literatur diskutiert. So zeigen Dai et al. (2020) reduzierte Serumkonzentrationen von ACE2 und Ang(1-7) bei PAH-Patienten, während Zhang et al. (2013), eine reduzierte ACE2-Expression in kleinen pulmonalen Arterien von IPAH-Patienten feststellen konnten (**Dai** 2013; **Zhang** 2018). Zudem berichteten Zhang et al. (2009), dass die Hemmung von ACE2 zu einer erhöhten Proliferation und Migration von humanen PASMC führt (**Zhang** 2009). Des Weiteren entwickelten ACE2-defiziente Mäuse eine stärkere CHPH, während Mäuse mit einer erhöhten ACE2-Aktivität vor Entstehung einer CHPH geschützt sind (**Sharma** 2020; **Zhang** 2018).

Eine Verbindung von TRPC Proteinen und ACE2 in Bezug auf PH ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Lediglich in Osteosarkomzellen wird von einer potentiellen Verbindung zwischen TRPC und der ACE2/Ang-(1-7)/Mas-Achse berichtet (**Lässig** 2021). Ob eine indirekte Verbindung über weitere Signalwege vorliegt und diese womöglich eine Bedeutung für die Entstehung von PH hat, muss jedoch weiter untersucht werden.

### 5.4.2 Einfluss auf den Kollagenhaushalt

Neben einer ventrikulären Hypertrophie kann auch eine kardiale Fibrose mit einem Anstieg des LVSP und des LV-Gewichts einhergehen (**Kazakov** 2018; **Pan** 2018). Da die Hemmung von ACE2 mit einer verstärkten Kollagenbildung einhergeht, können auch die reduzierten ACE2-

Plasmakonzentrationen der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse auf einen veränderten Kollagenhaushalt hinweisen (**Imai 2005; Trask 2010**). Die Ursachen einer Myokardfibrose sind vielfältig. So können Myokardinfarkte, Hypertension und hypertrophe, dilatative oder toxische Kardiomyopathien, aber auch Erkrankungen wie Diabetes mellitus und chronische Niereninsuffizienz zu einer kardialen Fibrose führen (**Burt 2014; Hashimura 2017**). Um zu analysieren, ob den kardialen Veränderungen der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine Abweichung des Kollagenhaushalts zugrunde liegt, wurden histologische Untersuchungen zur Bestimmung des prozentualen Kollagenanteils durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass sowohl im LV als auch in der Lunge ein signifikant erhöhter Kollagenanteil der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu TRPC WT Mäusen unabhängig von der Exposition vorliegt. Daraus lässt sich herleiten, dass die gleichzeitige globale und kongenitale Deletion des TRPC1, 3 und 6 Proteins zu einer vermehrten Kollageneinlagerung in diesen Organen führt. Im RV ergab sich ein signifikant erhöhter Kollagengehalt nur für Normoxie-exponierte TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse, während diese nach CHE keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen. Dies lässt zwei Interpretationen zu: Zum einen könnte die Hypoxie induzierte RVH dazu führen, dass die kardiale Fibrose aufgrund der hypertrophierenden Kardiomyozyten maskiert wird. Zum anderen könnten durch Hypoxieexposition Mechanismen induziert worden sein, die einer Myokardfibrose entgegenwirken.

Auch in der Literatur werden TRPC Kanäle mit der Entstehung von kardialer Fibrose in Verbindung gebracht. Camacho Londoño et al. (2015) berichteten, dass TRPC1/4<sup>-/-</sup> Mäuse nach TAC eine reduzierte Kollageneinlagerung im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen (**Camacho Londoño 2015**). Eine weitaus wichtigere Rolle wird allerdings TRPC3 zugeschrieben. Nach Applikation von gegen TRPC3 gerichteter siRNA konnte für isolierte Kardiomyozyten von Ratten eine geringere Reaktion auf Fibrose-auslösende Substanzen festgestellt werden. Dies wird auch für humane Kardiomyozyten beschrieben (**Numaga-Tomita 2016**). Zudem zeigen TRPC3<sup>-/-</sup>, wie auch TRPC1/4<sup>-/-</sup> Mäuse, eine verminderte Kollagenneubildung nach Drucküberlastung des LV (**Camacho Londoño 2015; Numaga-Tomita 2016**). Jedoch hat das Fehlen des TRPC3 Proteins bei Mäusen keinen protektiven Einfluss auf die Entstehung einer LVH (**Numaga-Tomita 2016**). Hingegen konnten Kitajima et al. (2016) demonstrieren, dass TRPC3<sup>-/-</sup> Mäuse einen höheren LVSP sowie ein höheres Herzgewicht nach TAC verglichen mit ihrer Kontrollgruppe aufweisen. TRPC3<sup>-/-</sup> Mäuse reagierten folglich sensitiver auf eine

Drucküberlastung des LV (**Kitajima** 2016). Dabei wird ein Einfluss von TRPC3 über die Expression von NADPH Oxidase 2 vermutet (**Kitajima** 2016; **Numaga-Tomita** 2016). Die Bedeutung von TRPC6 für die Entstehung einer kardialen Fibrose wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Während Nishida et al. (2007), von einer protektiven Wirkung von TRPC6 auf die Fibroblastendifferenzierung von Ratten berichteten, demonstrierten Ikeda et al. (2013), dass TRPC6 Proteine die Differenzierung von Fibroblasten unterstützen (**Nishida** 2007; **Ikeda** 2013). Eine weitere Arbeitsgruppe wiederum beschreibt, dass TRPC6 Proteine nicht nur notwendig, sondern essentiell für die Fibroblastendifferenzierung sind (**Davis** 2012). Die vermehrte Kollageneinlagerung in Herz- und Lungengewebe der TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse lässt vermuten, dass auch der Kollagenanteil weiterer Gewebe und Organe durch das globale Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine beeinflusst wird. Daher wurde der Einfluss einer bei TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen möglichen Fibrose der Gefäßwand auf die Kontraktion der Gefäße in der vorliegenden Arbeit untersucht. In Versuchen der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Lunge und bei Messungen im Myographensystem konnte eine reduzierte Vasokonstriktion der PA bzw. Aorta nach Applikation von KCl für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse verglichen mit TRPC WT Mäusen festgestellt werden. Daher ist zu vermuten, dass der Dreifachknockout die Kontraktionsfähigkeit der Gefäße beeinflusst und möglicherweise ein veränderter Kollagenhaushalt als Ursache zugrunde liegt.

## 5.5 Resümee und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass TRPC1, 3 und 6 Proteine eine bedeutsame Funktion bei der Pathogenese von CHPH übernehmen und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu TRPC WT Mäusen eine weniger stark ausgebildete CHPH entwickeln. Dabei konnte durch das Fehlen von TRPC1, 3 und 6, eine Verbesserung des - durch chronische Hypoxie induzierten - rechtsventrikulären Remodellings festgestellt werden, während die rechtsventrikuläre Funktion, trotz reduziertem PVR, unbeeinflusst blieb. Zudem scheinen TRPC1, 3 und 6 eine wichtige Rolle für die Funktion des ROCE in PASMCM zu übernehmen und die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase dieser Zellen zu beeinflussen. Hingegen zeigten PASMCM isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen keine Veränderung ihres Proliferations- und Migrationsverhaltens. Weiterhin blieb der SOCE von PASMCM durch das Fehlen von TRPC1, 3 und 6 weitgehend

unbeeinflusst. Ob dabei der Unterschied der Genexpression anderer TRPC Gene von Bedeutung ist, muss in weiteren molekularbiologischen Untersuchungen analysiert werden.

Des Weiteren konnte durch den globalen Knockout von TRPC1, 3 und 6 ein Einfluss auf die Physiologie der Maus festgestellt werden. Dabei bedingte das Fehlen von TRPC1, 3 und 6 ein Remodelling des RV und LV sowie der Lunge, welches die kardiale und pulmonale Funktion maßgeblich beeinflusste. Zudem wiesen TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine reduzierte vaskuläre Kontraktilität sowie einen veränderten Plasmaspiegel von Proteinen, die an der ACE2/Ang-(1-7)/MasR-Achse beteiligt sind, auf. Da auch diese Veränderungen die Entstehung einer PH maßgeblich beeinflussen können, müssen weitere Untersuchungen erfolgen. Hierbei könnte die Nutzung eines zelltypspezifischen und induzierbaren Knockouts von TRPC1, 3 und 6 eine Möglichkeit darstellen, die Rolle von TRPC1, 3 und 6 auf die Entstehung von CHPH weiter zu analysieren.

## 6 Zusammenfassung

Chronische Hypoxie induzierte pulmonale Hypertonie (CHPH) ist eine schwerwiegende Erkrankung, die mit einer Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks auf über 25 mmHg einhergeht. Im Zuge der Erkrankung kommt es zum vaskulären Remodelling, an dem insbesondere pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cells*, PASMC) der *Tunica media* beteiligt sind und das zu einem Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstands und somit des rechtsventrikulären Drucks führt. Bei schweren Fällen führt dies zu einer rechtsventrikulären Hypertrophie, die im finalen Stadium der PH eine systolische und diastolische Dysfunktion des rechten Ventrikels zur Folge hat. Dabei beeinflusst die Funktion des rechten Ventrikels entscheidend die Überlebensdauer der an PH erkrankten Patienten. Obwohl eine steigende Prävalenz der an PH erkrankten Patienten verzeichnet wird, existiert bislang keine Therapie, die ein Fortschreiten der Erkrankung vollständig verhindert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der klassischen transienten Rezeptor Potential (TRPC) Proteine 1, 3 und 6 für die Entstehung von CHPH untersucht. TRPC Proteine bilden nicht-selektive Kationenkanäle, die vorwiegend Calcium- und Natrium-Ionen leiten. Eine hohe intrazelluläre Calciumkonzentration wird mit einer hohen Proliferations- sowie Migrationsrate und einer reduzierten Apoptoserate der PASMC in Verbindung gebracht, sodass eine Verbesserung der PH-assoziierten Veränderungen durch das Fehlen von TRPC1, 3 und 6 vermutet wird.

Daher wurden TRPC1, 3 und 6 defiziente Mäuse (TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse) sowie TRPC1/3/6 Wildtyp Mäuse (TRPC WT Mäuse) im Hypoxiemodell der pulmonalen Hypertonie untersucht. Dabei zeigten die hämodynamischen sowie echokardiografischen Untersuchungen, dass TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse eine PH mit geringerem Schweregrad im Vergleich zu TRPC WT Mäuse entwickeln. Obwohl auch der echokardiografisch bestimmte pulmonale Gefäßwiderstand eine Verbesserung aufwies, blieb das vaskuläre Remodelling durch die gleichzeitige Defizienz von TRPC1, 3 und 6 unverändert gegenüber der Kontrollgruppe. Auch wenn die intrazelluläre Calciumkonzentration der PASMC durch das Fehlen der TRPC1, 3 und 6 Proteine reduziert werden konnte, zeigten PASMC isoliert aus TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu PASMC isoliert aus TRPC WT Mäusen keine reduzierte Proliferations- sowie Migrationsrate. Im Gegensatz dazu konnte eine verminderte Apoptoserate der PASMC von TRPC1/3/6<sup>-/-</sup>

verglichen mit TRPC WT Mäusen festgestellt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse zudem eine rechts- und linksventrikuläre Hypertrophie sowie eine erhöhte Kollageneinlagerung in das Herz- sowie Lungengewebe. Des Weiteren ergab sich in Untersuchungen mithilfe des 4-Kammer-Myographensystems eine reduzierte aortale Wandspannung sowie bei Versuchen der isolierten, ventilerten und blutfrei perfundierten Lunge ein reduzierter Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks nach Applikation des Vasokonstriktors Kaliumchlorid für TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse. Zudem konnte eine geringere Konzentration des Angiotensin-konvertierenden Enzyms 2 in Plasmaproben der Normoxie-exponierten TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse festgestellt werden. Darüber hinaus hatte die gleichzeitige TRPC1, 3 und 6 Defizienz einen Einfluss auf die systemische Hämodynamik. Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Deletion der TRPC1, 3 und 6 Proteine zu einem partiellen Schutz vor der Entstehung einer CHPH führt. Ursachen, warum in der vorliegenden Arbeit lediglich ein partieller Schutz festgestellt werden konnte, wie beispielsweise mögliche kompensatorische Gegenregulationen, bleibt in zukünftigen Studien zu untersuchen.

## 7 Summary

Chronic hypoxia induced pulmonary hypertension (CHPH) is a severe disease, which is accompanied by a rise in mean pulmonary arterial pressure above 25 mmHg. In addition, it is characterized by an increased right ventricular systolic pressure due to pulmonary vascular remodeling, in which pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) of the tunica media are particularly involved. Pulmonary vascular remodeling results in increased muscularization of small pulmonary arteries and pulmonary vascular resistance leading to right ventricular hypertrophy and can ultimately result in systolic and diastolic right ventricular dysfunction. In this context, the function of the right ventricle decisively influences the survival of patients suffering from PH. Although the prevalence of PH patients is increasing, there is no therapy available that completely prevents the progression of the disease nor can it be cured. In the present work, the role of the classical transient receptor potential (TRPC) proteins 1, 3 and 6 in the pathogenesis of CHPH was investigated. TRPC channels are non-selective cation channels, especially conducting calcium and sodium ions. High level of intracellular calcium concentration is associated with abnormal proliferation, migration and apoptosis of PASMCs, which is supposed to be the reason for the development of PH, thus amelioration of PH-associated changes is presumed by the absence of TRPC1, 3, and 6.

Therefore, mice simultaneously deficient of TRPC1, 3, and 6 (TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> mice) and TRPC1/3/6 wild type mice (TRPC WT mice) were studied in the chronic hypoxia induced PH. Here, the hemodynamic as well as echocardiographic measurements showed that PH was less severe in TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> mice when compared to TRPC WT mice. While echocardiographically determined pulmonary vascular resistance was ameliorated, vascular remodeling was unaffected by knockout of TRPC1, 3, and 6. Even though PASMCs isolated from TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> mice had a lower intracellular calcium concentration, reduced proliferation and migration rate were not observed. In contrast, a decreased apoptosis rate of PASMCs isolated from TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> compared with TRPC WT mice was detected. However, TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> mice developed right and left ventricular hypertrophy and demonstrated increased collagen content in heart and lung tissue. In addition, studies using the 4-chamber myograph system showed a reduced aortic wall tension and isolated, ventilated and perfused lung

measurements displayed a reduced increase in pulmonary arterial pressure after application of potassium chloride in these mice. In addition, a lower concentration of angiotensin-converting enzyme 2 was detected in plasma samples of normoxia-exposed TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> mice. Moreover, the simultaneous deficiency of TRPC1, 3 and 6 had an impact on systemic hemodynamics. Overall, the present results show that deletion of TRPC1, 3, and 6 proteins lead to partial protection against the development of CHPH. Causes why only partial protection could be observed in the present work, such as possible compensatory counterregulations, remain to be determined in future studies.

## 8 Literaturverzeichnis

**Abe, K.; Toba, M.; Alzoubi, A.; Ito, M.; Fagan, K. A.; Cool, C. D.; Voelkel, N. F.; McMurtry, I. F.; Oka, M.** (2010): Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 121 (25), S. 2747-2754.

**Ambudkar, I. S.; Souza, L. B. de; Ong, H. L.** (2017): TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. *Cell Calcium* 63, S. 33-39.

**Ashpole, N. M.; Chawla, A. R.; Martin, M. P.; Brustovetsky, T.; Brustovetsky, N.; Hudmon, A.** (2013): Loss of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in cortical astrocytes decreases glutamate uptake and induces neurotoxic release of ATP. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (20), S. 14599-14611.

**Ávila-Medina, J.; Calderón-Sánchez, E.; González-Rodríguez, P.; Monje-Quiroga, F.; Rosado, J. A.; Castellano, A.; Ordóñez, A.; Smani, T.** (2016): Orai1 and TRPC1 Proteins Co-localize with CaV1.2 Channels to Form a Signal Complex in Vascular Smooth Muscle Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 291 (40), S. 21148-21159.

**Barria, A.; Muller, D.; Derkach, V.; Griffith, L. C.; Soderling, T. R.** (1997): Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276 (5321), S. 2042-2045.

**Bendiks, L.; Geiger, F.; Gudermann, T.; Feske, S.; Dietrich, A.** (2020): Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in primary murine lung fibroblasts is independent of classical transient receptor potential (TRPC) channels and contributes to cell migration. *Scientific Reports* 10 (1).

**Bikou, O.; Hajjar, R. J.; Hadri, L.; Sassi, Y.** (2020): Induction and Characterization of Pulmonary Hypertension in Mice using the Hypoxia/SU5416 Model. *Journal of Visualized Experiments* (160).

**Bisping, E.; Wakula, P.; Poteser, M.; Heinzl, F. R.** (2014): Targeting cardiac hypertrophy: toward a causal heart failure therapy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 64 (4), S. 293-305.

**Brazer, S.-C. W.; Singh, B. B.; Liu, X.; Swaim, W.; Ambudkar, I. S.** (2003): Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (29), S. 27208-27215.

**Brittain, E. L.; Talati, M.; Fessel, J. P.; Zhu, H.; Penner, N.; Calcutt, M. W.; West, J. D.; Funke, M.; Lewis, G. D.; Gerszten, R. E.; Hamid, R.; Pugh, M. E.; Austin, E. D.; Newman, J. H.; Hemnes, A. R.** (2016): Fatty Acid Metabolic Defects and Right Ventricular Lipotoxicity in Human Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 133 (20), S. 1936-1944.

**Brown, L. M.; Chen, H.; Halpern, S.; Taichman, D.; McGoon, M. D.; Farber, H. W.; Frost, A. E.; Liou, T. G.; Turner, M.; Feldkircher, K.; Miller, D. P.; Elliott, C. G.** (2011): Delay in recognition of pulmonary arterial hypertension: factors identified from the REVEAL Registry. *Chest* 140 (1), S. 19-26.

**Burke, D. L.; Frid, M. G.; Kunrath, C. L.; Karoor, V.; Anwar, A.; Wagner, B. D.; Strassheim, D.; Stenmark, K. R.** (2009): Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-

specific chronic inflammatory microenvironment. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (2), S. L238-50.

**Bursi, F.; McNallan, S. M.; Redfield, M. M.; Nkomo, V. T.; Lam, C. S. P.; Weston, S. A.; Jiang, R.; Roger, V. L.** (2012): Pulmonary pressures and death in heart failure: a community study. *Journal of the American College of Cardiology* 59 (3), S. 222-231.

**Burt, J. R.; Zimmerman, S. L.; Kamel, I. R.; Halushka, M.; Bluemke, D. A.** (2014): Myocardial T1 mapping: techniques and potential applications. *Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 34 (2), S. 377-395.

**Camacho Londoño, J. E.; Tian, Q.; Hammer, K.; Schröder, L.; Camacho Londoño, J.; Reil, J. C.; He, T.; Oberhofer, M.; Mannebach, S.; Mathar, I.; Philipp, S. E.; Tabellion, W.; Schweda, F.; Dietrich, A.; Kaestner, L.; Laufs, U.; Birnbaumer, L.; Flockerzi, V.; Freichel, M.; Lipp, P.** (2015): A background  $Ca^{2+}$  entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling. *European Heart Journal* 36 (33), S. 2257-2266.

**Cambronero, F.; Marín, F.; Roldán, V.; Hernández-Romero, D.; Valdés, M.; Lip, G. Y. H.** (2009): Biomarkers of pathophysiology in hypertrophic cardiomyopathy: implications for clinical management and prognosis. *European Heart Journal* 30 (2), S. 139-151.

**Cerrudo, C. S.; Cavallero, S.; Rodríguez Fermepín, M.; González, G. E.; Donato, M.; Kouyoumdzian, N. M.; Gelpi, R. J.; Hertig, C. M.; Choi, M. R.; Fernández, B. E.** (2021): Cardiac Natriuretic Peptide Profiles in Chronic Hypertension by Single or Sequentially Combined Renovascular and DOCA-Salt Treatments. *Frontiers in Physiology* 12.

**Chaouat, A.; Bugnet, A.-S.; Kadaoui, N.; Schott, R.; Enache, I.; Ducloné, A.; Ehrhart, M.; Kessler, R.; Weitzenblum, E.** (2005): Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172 (2), S. 189-194.

**Chen, Y.-F.; Chen, Y.-T.; Chiu, W.-T.; Shen, M.-R.** (2013): Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *Journal of Biomedical Science* 20.

**Cheng, H.; Li, J.; Wu, Q.; Zheng, X.; Gao, Y.; Yang, Q.; Sun, N.; He, M.; Zhou, Y.** (2020): Effect of SKF-96365 on cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin II. *Molecular Medicine Reports* 21 (2), S. 806-814.

**Chung, M. K.; Karnik, S.; Saef, J.; Bergmann, C.; Barnard, J.; Lederman, M. M.; Tilton, J.; Cheng, F.; Harding, C. V.; Young, J. B.; Mehta, N.; Cameron, S. J.; McCrae, K. R.; Schmaier, A. H.; Smith, J. D.; Kalra, A.; Gebreselassie, S. K.; Thomas, G.; Hawkins, E. S.; Svensson, L. G.** (2020): SARS-CoV-2 and ACE2: The biology and clinical data settling the ARB and ACEI controversy. *EBioMedicine* 58.

**Ciucian, L.; Bonneau, O.; Hussey, M.; Duggan, N.; Holmes, A. M.; Good, R.; Stringer, R.; Jones, P.; Morrell, N. W.; Jarai, G.; Walker, C.; Westwick, J.; Thomas, M.** (2011): A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (10), S. 1171-1182.

**Clapham, D. E.** (2003): TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426 (6966), S. 517-524.

**Colvin, K. L.; Yeager, M. E.** (2014): Animal Models of Pulmonary Hypertension: Matching Disease Mechanisms to Etiology of the Human Disease. *Journal of Pulmonary & Respiratory Medicine* 4 (4), S. L1013-L1032.

- Cosens, D. J.; Manning, A.** (1969): Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224 (5216), S. 285-287.
- Cruz, J. A.; Bauer, E. M.; Rodriguez, A. I.; Gangopadhyay, A.; Zeineh, N. S.; Wang, Y.; Shiva, S.; Champion, H. C.; Bauer, P. M.** (2012): Chronic hypoxia induces right heart failure in caveolin-1<sup>-/-</sup> mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 302 (12), S. H2518-H2527.
- Dai, H.; Guo, Y.; Guang, X.; Xiao, Z.; Zhang, M.; Yin, X.** (2013): The changes of serum angiotensin-converting enzyme 2 in patients with pulmonary arterial hypertension due to congenital heart disease. *Cardiology* 124 (4), S. 208-212.
- Dartevelle, P.; Fadel, E.; Mussot, S.; Chapelier, A.; Hervé, P.; Perrot, M. de; Cerrina, J.; Ladurie, F. L.; Lehouerou, D.; Humbert, M.; Sitbon, O.; Simonneau, G.** (2004): Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal* 23 (4), S. 637-648.
- Davis, J.; Burr, A. R.; Davis, G. F.; Birnbaumer, L.; Molkenin, J. D.** (2012): A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Developmental Cell* 23 (4), S. 705-715.
- DeHaven, W. I.; Jones, B. F.; Petranka, J. G.; Smyth, J. T.; Tomita, T.; Bird, G. S.; Putney, J. W.** (2009): TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *The Journal of Physiology* 587 (Pt 10), S. 2275-2298.
- Del Haworth, S. G.** (2007): The cell and molecular biology of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *European Heart Journal Supplements* 9 (suppl\_H), S. H10-H16.
- Dempsey, E. C.; Frid, M. G.; Aldashev, A. A.; Das, M.; Stenmark, K. R.** (1997): Heterogeneity in the proliferative response of bovine pulmonary artery smooth muscle cells to mitogens and hypoxia: importance of protein kinase C. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75 (7), S. 936-944.
- Dietrich, A.; Fahlbusch, M.; Gudermann, T.** (2014): Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator? *Cells* 3 (4), S. 939-962.
- Dietrich, A.; Kalwa, H.; Rost, B. R.; Gudermann, T.** (2005): The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 451 (1), S. 72-80.
- Dietrich, A.; Mederos y Schnitzler, M.; Gollasch, M.; Gross, V.; Storch, U.; Dubrovská, G.; Obst, M.; Yildirim, E.; Salanova, B.; Kalwa, H.; Essin, K.; Pinkenburg, O.; Luft, F. C.; Gudermann, T.; Birnbaumer, L.** (2005a): Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice. *Molecular and Cellular Biology* 25 (16), S. 6980-6989.
- Dorfmueller, P.; Perros, F.; Balabanian, K.; Humbert, M.** (2003): Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *The European Respiratory Journal* 22 (2), S. 358-363.
- Dragún, M.; Gažová, A.; Kyselovič, J.; Hulman, M.; Mátuš, M.** (2019): TRP Channels Expression Profile in Human End-Stage Heart Failure. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 55 (7).
- Dumitrascu, R.; Koebrich, S.; Dony, E.; Weissmann, N.; Savai, R.; Pullamsetti, S. S.; Ghofrani, H. A.; Samidurai, A.; Traupe, H.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Schermuly, R. T.** (2008):

Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulmonary Medicine* 8.

**Eder, P.; Molкетин, J. D.** (2011): TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circulation Research* 108 (2), S. 265-272.

**Engelke, M.; Friedrich, O.; Budde, P.; Schäfer, C.; Niemann, U.; Zitt, C.; Jüngling, E.; Rocks, O.; Lückhoff, A.; Frey, J.** (2002): Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *FEBS Letters* 523 (1-3), S. 193-199.

**Evans, J. D. W.; Girerd, B.; Montani, D.; Wang, X.-J.; Galiè, N.; Austin, E. D.; Elliott, G.; Asano, K.; Grünig, E.; Yan, Y.; Jing, Z.-C.; Manes, A.; Palazzini, M.; Wheeler, L. A.; Nakayama, I.; Satoh, T.; Eichstaedt, C.; Hinderhofer, K.; Wolf, M.; Rosenzweig, E. B.; Chung, W. K.; Soubrier, F.; Simonneau, G.; Sitbon, O.; Gräf, S.; Kaptoge, S.; Di Angelantonio, E.; Humbert, M.; Morrell, N. W.** (2016): BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *The Lancet. Respiratory Medicine* 4 (2), S. 129-137.

**Falcón, D.; Galeano-Otero, I.; Calderón-Sánchez, E.; Del Toro, R.; Martín-Bórnez, M.; Rosado, J. A.; Hmadcha, A.; Smani, T.** (2019): TRP Channels: Current Perspectives in the Adverse Cardiac Remodeling. *Frontiers in Physiology* 10, S. 159.

**Falcón, D.; Galeano-Otero, I.; Martín-Bórnez, M.; Fernández-Velasco, M.; Gallardo-Castillo, I.; Rosado, J. A.; Ordóñez, A.; Smani, T.** (2020): TRPC Channels: Dysregulation and Ca<sup>2+</sup> Mishandling in Ischemic Heart Disease. *Cells* 9 (1).

**Fang, J. C.; DeMarco, T.; Givertz, M. M.; Borlaug, B. A.; Lewis, G. D.; Rame, J. E.; Gomberg-Maitland, M.; Murali, S.; Frantz, R. P.; McGlothlin, D.; Horn, E. M.; Benza, R. L.** (2012): World Health Organization Pulmonary Hypertension group 2: pulmonary hypertension due to left heart disease in the adult—a summary statement from the Pulmonary Hypertension Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: the Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 31 (9), S. 913-933.

**Farber, H. W.; Loscalzo, J.** (2004): Pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine* 351 (16), S. 1655-1665.

**Fernandez, R. A.; Wan, J.; Song, S.; Smith, K. A.; Gu, Y.; Tauseef, M.; Tang, H.; Makino, A.; Mehta, D.; Yuan, J. X.-J.** (2015): Upregulated expression of STIM2, TRPC6, and Orai2 contributes to the transition of pulmonary arterial smooth muscle cells from a contractile to proliferative phenotype. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 308 (8), S. C581-C593.

**Firth, A. L.; Remillard, C. V.; Yuan, J. X.-J.** (2007): TRP channels in hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772 (8), S. 895-906.

**Frey, N.; Katus, H. A.; Olson, E. N.; Hill, J. A.** (2004): Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109 (13), S. 1580-1589.

**Frid, M. G.; Kale, V. A.; Stenmark, K. R.** (2002): Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circulation Research* 90 (11), S. 1189-1196.

Fuchs, B.; Rupp, M.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Weissmann, N. (2011): Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respiratory Research* 12 (1), S. 1-10.

Fukumoto, Y.; Shimokawa, H. (2011): Recent progress in the management of pulmonary hypertension. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 75 (8), S. 1801-1810.

Gairhe, S.; Bauer, N. N.; Gebb, S. A.; McMurtry, I. F. (2011): Myoendothelial gap junctional signaling induces differentiation of pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 301 (4), S. L527-L535.

Galiè, N.; Hoeper, M. M.; Humbert, M.; Torbicki, A.; Vachiery, J.-L.; Barbera, J. A.; Beghetti, M.; Corris, P.; Gaine, S.; Gibbs, J. S.; Gomez-Sanchez, M. A.; Jondeau, G.; Klepetko, W.; Opitz, C.; Peacock, A.; Rubin, L.; Zellweger, M.; Simonneau, G. (2009): Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European Heart Journal* 30 (20), S. 2493-2537.

Galiè, N.; Humbert, M.; Vachiery, J.-L.; Gibbs, S.; Lang, I.; Torbicki, A.; Simonneau, G.; Peacock, A.; Vonk Noordegraaf, A.; Beghetti, M.; Ghofrani, A.; Gomez Sanchez, M. A.; Hansmann, G.; Klepetko, W.; Lancellotti, P.; Matucci, M.; McDonagh, T.; Pierard, L. A.; Trindade, P. T.; Zompatori, M.; Hoeper, M. (2015): 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). *The European Respiratory Journal* 46 (4), S. 903-975.

Galiè, N.; Torbicki, A.; Barst, R.; Dartevelle, P.; Haworth, S.; Higenbottam, T.; Olschewski, H.; Peacock, A.; Pietra, G.; Rubin, L. J.; Simonneau, G.; Piro, S. G.; Garcia, M. A. A.; Blanc, J.-J.; Budaj, A.; Cowie, M.; Dean, V.; Deckers, J.; Burgos, E. F.; Lekakis, J.; Lindahl, B.; Mazzotta, G.; McGregor, K.; Morais, J.; Oto, A.; Smiseth, O. A.; Barbera, J. A.; Gibbs, S.; Hoeper, M.; Humbert, M.; Naeije, R.; Pepke-Zaba, J. (2004): Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* 25 (24), S. 2243-2278.

Gerke, A. K.; Schmidt, G. A. (2020): Physiology of Heart-Lung Interactions. In: Surya P. Bhatt (Hg.): *Cardiac Considerations in Chronic Lung Disease*. Springer International Publishing, S. 149-160.

Ghofrani, H.-A.; Galiè, N.; Grimminger, F.; Grünig, E.; Humbert, M.; Jing, Z.-C.; Keogh, A. M.; Langleben, D.; Kilama, M. O.; Fritsch, A.; Neuser, D.; Rubin, L. J. (2013): Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine* 369 (4), S. 330-340.

Gomberg-Maitland, M.; Olschewski, H. (2008): Prostacyclin therapies for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The European Respiratory Journal* 31 (4), S. 891-901.

- Gomez-Arroyo, J. G.; Farkas, L.; Alhussaini, A. A.; Farkas, D.; Kraskauskas, D.; Voelkel, N. F.; Bogaard, H. J.** (2012): The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 302 (4), S. L363-L369.
- Gong, J.; Chen, Z.; Chen, Y.; Lv, H.; Lu, H.; Yan, F.; Li, L.; Zhang, W.; Shi, J.** (2019): Long non-coding RNA CASC2 suppresses pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and phenotypic switch in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respiratory Research* 20 (1).
- Grimminger, J.; Richter, M.; Tello, K.; Sommer, N.; Gall, H.; Ghofrani, H. A.** (2017): Thin Air Resulting in High Pressure: Mountain Sickness and Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Canadian Respiratory Journal* 2017.
- Guazzi, M.; Borlaug, B. A.** (2012): Pulmonary hypertension due to left heart disease. *Circulation* 126 (8), S. 975-990.
- Guazzi, M.; Galiè, N.** (2012a): Pulmonary hypertension in left heart disease. *European Respiratory Review: an Official Journal of the European Respiratory Society* 21 (126), S. 338-346.
- Haag, D.** (2014): Rolle der Siah-Ubiquitinligasen in der Entstehung der pulmonalen Hypertonie und daraus resultierenden rechtsventrikulären Hypertrophie. 1. Aufl. Giessen: Laufersweiler.
- Hadri, L.; Kratlian, R. G.; Benard, L.; Maron, B. A.; Dorfmueller, P.; Ladage, D.; Guignabert, C.; Ishikawa, K.; Aguero, J.; Ibanez, B.; Turnbull, I. C.; Kohlbrenner, E.; Liang, L.; Zsebo, K.; Humbert, M.; Hulot, J.-S.; Kawase, Y.; Hajjar, R. J.; Leopold, J. A.** (2013): Therapeutic efficacy of AAV1.SERCA2a in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 128 (5), S. 512-523.
- Hadzic, S.; Wu, C.-Y.; Gredic, M.; Kojonazarov, B.; Pak, O.; Kraut, S.; Sommer, N.; Kosanovic, D.; Grimminger, F.; Schermuly, R. T.; Seeger, W.; Bellusci, S.; Weissmann, N.** (2021): The effect of long-term doxycycline treatment in a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 320 (5), S. L903-L915.
- Han, M. K.; McLaughlin, V. V.; Criner, G. J.; Martinez, F. J.** (2007): Pulmonary diseases and the heart. *Circulation* 116 (25), S. 2992-3005.
- Hao, M.; Li, M.; Li, W.** (2017): Galectin-3 inhibition ameliorates hypoxia-induced pulmonary artery hypertension. *Molecular Medicine Reports* 15 (1), S. 160-168.
- Hashimura, H.; Kimura, F.; Ishibashi-Ueda, H.; Morita, Y.; Higashi, M.; Nakano, S.; Iguchi, A.; Uotani, K.; Sugimura, K.; Naito, H.** (2017): Radiologic-Pathologic Correlation of Primary and Secondary Cardiomyopathies: MR Imaging and Histopathologic Findings in Hearts from Autopsy and Transplantation. *Radiographics: a Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc* 37 (3), S. 719-736.
- He, X.; Song, S.; Ayon, R. J.; Balisterieri, A.; Black, S. M.; Makino, A.; Wier, W. G.; Zang, W.-J.; Yuan, J. X.-J.** (2018): Hypoxia selectively upregulates cation channels and increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> in pulmonary, but not coronary, arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 314 (4), S. C504-C517.
- Herrera, E. A.; Riquelme, R. A.; Ebensperger, G.; Reyes, R. V.; Ulloa, C. E.; Cabello, G.; Krause, B. J.; Pared, J. T.; Giussani, D. A.; Llanos, A. J.** (2010): Long-term exposure to high-altitude chronic hypoxia during gestation induces neonatal pulmonary hypertension at sea level.

*American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299 (6), S. R1676-1684.

**Hill-Eubanks, D. C.; Werner, M. E.; Heppner, T. J.; Nelson, M. T.** (2011): Calcium signaling in smooth muscle. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (9).

**Hoeper, M. M.; Dinh-Xuan, A. T.** (2008): Pulmonary hypertension: basic concepts and practical management. Basic concepts and practical management. *The European Respiratory Journal* 31 (2), S. 236-237.

**Hoeper, M. M.; Bogaard, H. J.; Condliffe, R.; Frantz, R.; Khanna, D.; Kurzyna, M.; Langleben, D.; Manes, A.; Satoh, T.; Torres, F.; Wilkins, M. R.; Badesch, D. B.** (2013): Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl), S. D42-D50.

**Hoeper, M. M.; Ghofrani, H.-A.; Grünig, E.; Klose, H.; Olschewski, H.; Rosenkranz, S.** (2017): Pulmonary Hypertension. *Deutsches Aerzteblatt Online* 114, S. 73-84.

**Hoeper, M. M.; Humbert, M.; Souza, R.; Idrees, M.; Kawut, S. M.; Sliwa-Hahnle, K.; Jing, Z.-C.; Gibbs, J. S. R.** (2016): A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet. Respiratory Medicine* 4 (4), S. 306-322.

**Hoeper, M. M.; Mayer, E.; Simonneau, G.; Rubin, L. J.** (2006): Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 113 (16), S. 2011-2020.

**Hofmann, T.; Schaefer, M.; Schultz, G.; Gudermann, T.** (2002): Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11), S. 7461-7466.

**Holtwick, R.; van Eickels, M.; Skryabin, B. V.; Baba, H. A.; Bubikat, A.; Begrow, F.; Schneider, M. D.; Garbers, D. L.; Kuhn, M.** (2003): Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *The Journal of Clinical Investigation* 111 (9), S. 1399-1407.

**Horio, T.; Nishikimi, T.; Yoshihara, F.; Matsuo, H.; Takishita, S.; Kangawa, K.** (2000): Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension (Dallas, Tex.)* 35 (1 Pt 1), S. 19-24.

**Hou, X.; Chen, J.; Luo, Y.; Liu, F.; Xu, G.; Gao, Y.** (2013): Silencing of STIM1 attenuates hypoxia-induced PSMCs proliferation via inhibition of the SOC/Ca<sup>2+</sup>/NFAT pathway. *Respiratory Research* 14 (1).

**House, S. J.; Ginnan, R. G.; Armstrong, S. E.; Singer, H. A.** (2007): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-delta isoform regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 292 (6), S. C2276-C2287.

**Hughes, K.; Edin, S.; Antonsson, A.; Grundström, T.** (2001): Calmodulin-dependent kinase II mediates T cell receptor/CD3- and phorbol ester-induced activation of I $\kappa$ B kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276 (38), S. 36008-36013.

**Humbert, M.; Morrell, N. W.; Archer, S. L.; Stenmark, K. R.; MacLean, M. R.; Lang, I. M.; Christman, B. W.; Weir, E. K.; Eickelberg, O.; Voelkel, N. F.; Rabinovitch, M.** (2004): Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 43 (12 Suppl S), S. 13S-24S.

- Hunter, C.; Barer, G. R.; Shaw, J. W.; Clegg, E. J. (1974): Growth of the heart and lungs in hypoxic rodents: a model of human hypoxic disease. *Clinical Science and Molecular Medicine* 46 (3), S. 375-391.
- Hurdman, J.; Condliffe, R.; Elliot, C. A.; Swift, A.; Rajaram, S.; Davies, C.; Hill, C.; Hamilton, N.; Armstrong, I. J.; Billings, C.; Pollard, L.; Wild, J. M.; Lawrie, A.; Lawson, R.; Sabroe, I.; Kiely, D. G. (2013): Pulmonary hypertension in COPD: results from the ASPIRE registry. *The European Respiratory Journal* 41 (6), S. 1292-1301.
- Ibe, J. C. F.; Zhou, Q.; Chen, T.; Tang, H.; Yuan, J. X.-J.; Raj, J. U.; Zhou, G. (2013): Adenosine monophosphate-activated protein kinase is required for pulmonary artery smooth muscle cell survival and the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49 (4), S. 609-618.
- Ikeda, K. T.; Hale, P. T.; Pauciulo, M. W.; Dasgupta, N.; Pastura, P. A.; Le Cras, T. D.; Pandey, M. K.; Nichols, W. C. (2019): Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension in Different Mouse Strains: Relation to Transcriptome. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 60 (1), S. 106-116.
- Ikeda, K.; Nakajima, T.; Yamamoto, Y.; Takano, N.; Tanaka, T.; Kikuchi, H.; Oguri, G.; Morita, T.; Nakamura, F.; Komuro, I. (2013): Roles of transient receptor potential canonical (TRPC) channels and reverse-mode  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger on cell proliferation in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor  $\beta$ 1. *Cell Calcium* 54 (3), S. 213-225.
- Imai, Y.; Kuba, K.; Rao, S.; Huan, Y.; Guo, F.; Guan, B.; Yang, P.; Sarao, R.; Wada, T.; Leong-Poi, H.; Crackower, M. A.; Fukamizu, A.; Hui, C.-C.; Hein, L.; Uhlrig, S.; Slutsky, A. S.; Jiang, C.; Penninger, J. M. (2005): Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436 (7047), S. 112-116.
- Jia, S.; Rodriguez, M.; Williams, A. G.; Yuan, J. P. (2017): Homer binds to Orai1 and TRPC channels in the neointima and regulates vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Scientific Reports* 7 (1).
- Jiang, H.-N.; Zeng, B.; Chen, G.-L.; Lai, B.; Lu, S.-H.; Qu, J.-M. (2016): Lipopolysaccharide potentiates endothelin-1-induced proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells by upregulating TRPC channels. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 82, S. 20-27.
- Kaganovsky, E.; Belkin, V.; Barhum, Y.; Schaper, J.; Schaper, W.; Kessler-Icekson, G. (2001): Occurrence and distribution of atrial natriuretic peptide-containing cells in the left ventricle of hypertensive rats. Effect of antihypertensive treatment. *Cell and Tissue Research* 303 (1), S. 57-67.
- Kapitsinou, P. P.; Rajendran, G.; Astleford, L.; Michael, M.; Schonfeld, M. P.; Fields, T.; Shay, S.; French, J. L.; West, J.; Haase, V. H. (2016): The Endothelial Prolyl-4-Hydroxylase Domain 2/Hypoxia-Inducible Factor 2 Axis Regulates Pulmonary Artery Pressure in Mice. *Molecular and Cellular Biology* 36 (10), S. 1584-1594.
- Kato, T.; Nasu, T.; Sonoda, H.; Ito, K. M.; Ikeda, M.; Ito, K. (2008): Evaluation of olmesartan medoxomil in the rat monocrotaline model of pulmonary hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 51 (1), S. 18-23.
- Kay, J. M.; Harris, P.; Heath, D. (1967): Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* 22 (2), S. 176-179.

- Kazakov, A.; Hall, R. A.; Werner, C.; Meier, T.; Trouvain, A.; Rodionycheva, S.; Nickel, A.; Lammert, F.; Maack, C.; Böhm, M.; Laufs, U.** (2018): Raf kinase inhibitor protein mediates myocardial fibrosis under conditions of enhanced myocardial oxidative stress. *Basic Research in Cardiology* 113 (6): 42.
- Kirschmer, N.; Lorenz, K.; Eder-Negrin, P.:** TRPC Channels in Cardiac Hypertrophy. *Pathologies of Calcium Channels* (22), S. 441-462
- Kitajima, N.; Numaga-Tomita, T.; Watanabe, M.; Kuroda, T.; Nishimura, A.; Miyano, K.; Yasuda, S.; Kuwahara, K.; Sato, Y.; Ide, T.; Birnbaumer, L.; Sumimoto, H.; Mori, Y.; Nishida, M.** (2016): TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. *Scientific Reports* 6.
- Kiyonaka, S.; Kato, K.; Nishida, M.; Mio, K.; Numaga, T.; Sawaguchi, Y.; Yoshida, T.; Wakamori, M.; Mori, E.; Numata, T.; Ishii, M.; Takemoto, H.; Ojida, A.; Watanabe, K.; Uemura, A.; Kurose, H.; Morii, T.; Kobayashi, T.; Sato, Y.; Sato, C.; Hamachi, I.; Mori, Y.** (2009): Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (13), S. 5400-5405.
- Klaiber, M.; Dankworth, B.; Kruse, M.; Hartmann, M.; Nikolaev, V. O.; Yang, R.-B.; Völker, K.; Gassner, B.; Oberwinkler, H.; Feil, R.; Freichel, M.; Groschner, K.; Skryabin, B. V.; Frantz, S.; Birnbaumer, L.; Pongs, O.; Kuhn, M.** (2011): A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (45), S. 18500-18505.
- Kojima, H.; Tokunou, T.; Takahara, Y.; Sunagawa, K.; Hirooka, Y.; Ichiki, T.; Tsutsui, H.** (2019): Hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  deletion in myeloid lineage attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Physiological Reports* 7 (7).
- Konstam, M. A.; Kiernan, M. S.; Bernstein, D.; Bozkurt, B.; Jacob, M.; Kapur, N. K.; Kociol, R. D.; Lewis, E. F.; Mehra, M. R.; Pagani, F. D.; Raval, A. N.; Ward, C.** (2018): Evaluation and Management of Right-Sided Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 137 (20), S. e578-e622.
- Kraut, S.** (2014): Pathomechanismen der Schlafapnoe im Mausmodell. Rolle der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase. 1. Aufl. Giessen: Laufersweiler.
- Kuhn, M.** (2015): Cardiac actions of atrial natriuretic peptide: new visions of an old friend. *Circulation Research* 116 (8), S. 1278-1280.
- Kuhn, M.; Voss, M.; Mitko, D.; Stypmann, J.; Schmid, C.; Kawaguchi, N.; Grabellus, F.; Baba, H. A.** (2004): Left ventricular assist device support reverses altered cardiac expression and function of natriuretic peptides and receptors in end-stage heart failure. *Cardiovascular Research* 64 (2), S. 308-314.
- Lässig, F.; Klann, A.; Bekeschus, S.; Lendeckel, U.; Wolke, C.** (2021): Expression of canonical transient receptor potential channels in U-2 OS and MNNG-HOS osteosarcoma cell lines. *Oncology Letters* 21 (4).
- Laurino, A.; Spinelli, V.; Gencarelli, M.; Balducci, V.; Dini, L.; Diolaiuti, L.; Ghionzoli, M.; Messineo, A.; Mugelli, A.; Cerbai, E.; Raimondi, L.; Sartiani, L.** (2019): Angiotensin-II Drives

Human Satellite Cells Toward Hypertrophy and Myofibroblast Trans-Differentiation by Two Independent Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (19).

**Lawrie, A.** (2014): A report on the use of animal models and phenotyping methods in pulmonary hypertension research. *Pulmonary Circulation* 4 (1), S. 2-9.

**Li, B.; Yang, L.; Shen, J.; Wang, C.; Jiang, Z.** (2007): The antiproliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells is mediated via upregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and degradation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Anesthesia and Analgesia* 105 (4), S. 1034-1041.

**Li, T.; Li, S.; Feng, Y.; Zeng, X.; Dong, S.; Li, J.; Zha, L.; Luo, H.; Zhao, L.; Liu, B.; Ou, Z.; Lin, W.; Zhang, M.; Li, S.; Jiang, Q.; Qi, Q.; Xu, Q.; Yu, Z.** (2020): Combination of Dichloroacetate and Atorvastatin Regulates Excessive Proliferation and Oxidative Stress in Pulmonary Arterial Hypertension Development via p38 Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020.

**Lin, M.-J.; Leung, G. P. H.; Zhang, W.-M.; Yang, X.-R.; Yip, K.-P.; Tse, C.-M.; Sham, J. 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. *Circulation Research* 95 (5), S. 496-505.

**Liu, B.; Wang, D.; Luo, E.; Hou, J.; Qiao, Y.; Yan, G.; Wang, Q.; Tang, C.** (2019): Role of TG2-Mediated SERCA2 Serotonylation on Hypoxic Pulmonary Vein Remodeling. *Frontiers in Pharmacology* 10.

**Lopez, J. J.; Jardin, I.; Sanchez-Collado, J.; Salido, G. M.; Smani, T.; Rosado, J. A.** (2020): TRPC Channels in the SOCE Scenario. *Cells* 9 (1).

**Lowes, B. D.; Minobe, W.; Abraham, W. T.; Rizeq, M. N.; Bohlmeier, T. J.; Quaife, R. A.; Roden, R. L.; Dutcher, D. L.; Robertson, A. D.; Voelkel, N. F.; Badesch, D. B.; Groves, B. M.; Gilbert, E. M.; Bristow, M. R.** (1997): Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *The Journal of Clinical Investigation* 100 (9), S. 2315-2324.

**Lu, W.; Ran, P.; Zhang, D.; Lai, N.; Zhong, N.; Wang, J.** (2010): Bone morphogenetic protein 4 enhances canonical transient receptor potential expression, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 299 (6), S. C1370-C1378.

**Maarman, G.; Lecour, S.; Butrous, G.; Thienemann, F.; Sliwa, K.** (2013): A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulmonary Circulation* 3 (4), S. 739-756.

**Mai, X.; Shang, J.; Liang, S.; Yu, B.; Yuan, J.; Lin, Y.; Luo, R.; Zhang, F.; Liu, Y.; Lv, X.; Li, C.; Liang, X.; Wang, W.; Zhou, J.** (2016): Blockade of Orai1 Store-Operated Calcium Entry Protects against Renal Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 27 (10), S. 3063-3078.

**Malczyk, M.** (2017): Die Rolle von TRPC-Kanälen in der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in der Maus. Justus-Liebig-Universität Gießen. Gießen.

**Malczyk, M.; Veith, C.; Fuchs, B.; Hofmann, K.; Storch, U.; Schermuly, R. T.; Witzenrath, M.; Ahlbrecht, K.; Fecher-Trost, C.; Flockerzi, V.; Ghofrani, H. A.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Weissmann, N.** (2013): Classical transient receptor potential

channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 188 (12), S. 1451-1459.

**Malczyk, M.; Veith, C.; Schermuly, R. T.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Sommer, N.; Weissmann, N.; Pak, O.** (2016): NADPH oxidases-do they play a role in TRPC regulation under hypoxia? *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 468 (1), S. 23-41.

**Man, F. S. de; Tu, L.; Handoko, M. L.; Rain, S.; Ruiter, G.; François, C.; Schalij, I.; Dorfmueller, P.; Simonneau, G.; Fadel, E.; Perros, F.; Boonstra, A.; Postmus, P. E.; van der Velden, J.; Vonk-Noordegraaf, A.; Humbert, M.; Eddahibi, S.; Guignabert, C.** (2012): Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (8), S. 780-789.

**Mayer, C.** (2020): Die Rolle des klassischen transienten Rezeptorpotential 3 Kanalproteins bei der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Maus. Justus-Liebig-Universität Gießen. Gießen.

**Meoli, D. F.; White, R. J.** (2009): Thrombin induces fibronectin-specific migration of pulmonary microvascular endothelial cells: requirement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (4), S. L706-L714.

**Montani, D.; Günther, S.; Dorfmueller, P.; Perros, F.; Girerd, B.; Garcia, G.; Jaïs, X.; Savale, L.; Artaud-Macari, E.; Price, L. C.; Humbert, M.; Simonneau, G.; Sitbon, O.** (2013): Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8.

**Moosmang, S.; Schulla, V.; Welling, A.; Feil, R.; Feil, S.; Wegener, J. W.; Hofmann, F.; Klugbauer, N.** (2003): Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *The EMBO Journal* 22 (22), S. 6027-6034.

**Naeye, R. L.** (1967): Polycythemia and hypoxia. Individual effects on heart and pulmonary arteries. *The American Journal of Pathology* 50 (6), S. 1027-1033.

**Nakano, D.; Hayashi, T.; Tazawa, N.; Yamashita, C.; Inamoto, S.; Okuda, N.; Mori, T.; Sohmiya, K.; Kitaura, Y.; Okada, Y.; Matsumura, Y.** (2005): Chronic hypoxia accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 28 (10), S. 837-845.

**Nakayama, H.; Wilkin, B. J.; Bodi, I.; Molkentin, J. D.** (2006): Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *FASEB Journal* 20 (10), S. 1660-1670.

**Nielsen, E. A.; Okumura, K.; Sun, M.; Hjortdal, V. E.; Redington, A. N.; Friedberg, M. K.** (2017): Regional septal hinge-point injury contributes to adverse biventricular interactions in pulmonary hypertension. *Physiological Reports* 5 (14).

**Nilius, B.; Owsianik, G.** (2011): The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology* 12 (3).

**Nishida, M.; Onohara, N.; Sato, Y.; Suda, R.; Ogushi, M.; Tanabe, S.; Inoue, R.; Mori, Y.; Kurose, H.** (2007): G $\alpha_{12/13}$ -mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation. *Journal of Biological Chemistry* 282 (32), S. 23117-23128.

- Noll, N. A.; Lal, H.; Merryman, W. D.** (2020): Mouse Models of Heart Failure with Preserved or Reduced Ejection Fraction. *The American Journal of Pathology* 190 (8), S. 1596-1608.
- Numaga-Tomita, T.; Kitajima, N.; Kuroda, T.; Nishimura, A.; Miyano, K.; Yasuda, S.; Kuwahara, K.; Sato, Y.; Ide, T.; Birnbaumer, L.; Sumimoto, H.; Mori, Y.; Nishida, M.** (2016): TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis. *Scientific Reports* 6.
- Numaga-Tomita, T.; Nishida, M.** (2020): TRPC Channels in Cardiac Plasticity. *Cells* 9 (2).
- Pak, O.; Janssen, W.; Ghofrani, H. A.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Schermuly, R. T.; Weissmann, N.** (2010): Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. *Drug Discovery Today: Disease Models* 7 (3-4), S. 89-97.
- Pan, S.; Zhao, X.; Wang, X.; Tian, X.; Wang, Y.; Fan, R.; Feng, N.; Zhang, S.; Gu, X.; Jia, M.; Li, J.; Yang, L.; Wang, K.; Guo, H.; Pei, J.** (2018): Sfrp1 attenuates TAC-induced cardiac dysfunction by inhibiting Wnt signaling pathway-mediated myocardial apoptosis in mice. *Lipids in Health and Disease* 17 (1).
- Pan, Z.; Yang, H.; Reinach, P. S.** (2011): Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels. *Human Genomics* 5 (2), S. 108-116.
- Piazza, G.; Goldhaber, S. Z.** (2011): Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* 364 (4), S. 351-360.
- Pietra, G. G.; Capron, F.; Stewart, S.; Leone, O.; Humbert, M.; Robbins, I. M.; Reid, L. M.; Tuder, R. M.** (2004): Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 43 (12 Suppl S), S. 25S-32S.
- Ponikowski, P.; Voors, A. A.; Anker, S. D.; Bueno, H.; Cleland, J. G. F.; Coats, A. J. S.; Falk, V.; González-Juanatey, J. R.; Harjola, V.-P.; Jankowska, E. A.; Jessup, M.; Linde, C.; Nihoyannopoulos, P.; Parissis, J. T.; Pieske, B.; Riley, J. P.; Rosano, G. M. C.; Ruilope, L. M.; Ruschitzka, F.; Rutten, F. H.; van der Meer, P.** (2016): 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Revista Espanola de Cardiologia* 69 (12), S. 2129-2200.
- Pullamsetti, S. S.; Kojonazarov, B.; Storn, S.; Gall, H.; Salazar, Y.; Wolf, J.; Weigert, A.; El-Nikhely, N.; Ghofrani, H. A.; Krombach, G. A.; Fink, L.; Gattenlöhner, S.; Rapp, U. R.; Schermuly, R. T.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Savai, R.** (2017): Lung cancer-associated pulmonary hypertension: Role of microenvironmental inflammation based on tumor cell-immune cell cross-talk. *Sci. Transl. Med.* 9 (416).
- Qiao, N.; Pan, J.; Chen, H.; Kang, Z.; Pang, C.; Liu, B.; Zeng, Q.; Mehmood, K.; Bilal, R. M.; Pasha, R. H.; Ullah, Q.; Tang, Z.; Li, Y.** (2021): Hypoxia Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via Modulating TRPC6. *Pakistan Veterinary Journal*.
- Rabinovitch, M.; Gamble, W.; Nadas, A. S.; Miettinen, O. S.; Reid, L.** (1979): Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *The American Journal of Physiology* 236 (6), S. H818-H827.
- Raoul, W.; Wagner-Ballon, O.; Saber, G.; Hulin, A.; Marcos, E.; Giraudier, S.; Vainchenker, W.; Adnot, S.; Eddahibi, S.; Maitre, B.** (2007): Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Respiratory Research* 8.

- Reddy, S.; Bernstein, D.** (2015): Molecular Mechanisms of Right Ventricular Failure. *Circulation* 132 (18), S. 1734-1742.
- Rich, S.; Rabinovitch, M.** (2008): Diagnosis and treatment of secondary (non-category 1) pulmonary hypertension. *Circulation* 118 (21), S. 2190-2199.
- Riehle, C.; Wende, A. R.; Zaha, V. G.; Pires, K. M.; Wayment, B.; Olsen, C.; Bugger, H.; Buchanan, J.; Wang, X.; Moreira, A. B.; Doenst, T.; Medina-Gomez, G.; Litwin, S. E.; Lelliott, C. J.; Vidal-Puig, A.; Abel, E. D.** (2011): PGC-1 $\beta$  deficiency accelerates the transition to heart failure in pressure overload hypertrophy. *Circulation Research* 109 (7), S. 783-793.
- Ryan, J. J.; Archer, S. L.** (2014): The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circulation Research* 115 (1), S. 176-188.
- Samak, M.; Fatullayev, J.; Sabashnikov, A.; Zeriuoh, M.; Schmack, B.; Farag, M.; Popov, A.-F.; Dohmen, P. M.; Choi, Y.-H.; Wahlers, T.; Weymann, A.** (2016): Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Medical Science Monitor Basic Research* 22, S. 75-79.
- Satoh, S.; Tanaka, H.; Ueda, Y.; Oyama, J.-I.; Sugano, M.; Sumimoto, H.; Mori, Y.; Makino, N.** (2007): Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca<sup>2+</sup> channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 294 (1-2), S. 205-215.
- Schannwell, C. M.; Steiner, S.; Strauer, B.-E.** (2007): Diagnostics in pulmonary hypertension. *Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society* 58 Suppl 5 (Pt 2), S. 591-602.
- Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Wilkins, M. R.; Grimminger, F.** (2011): Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews. Cardiology* 8 (8), S. 443-455.
- Schermuly, R. T.; Dony, E.; Ghofrani, H. A.; Pullamsetti, S.; Savai, R.; Roth, M.; Sydykov, A.; Lai, Y. J.; Weissmann, N.; Seeger, W.; Grimminger, F.** (2005): Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *The Journal of Clinical Investigation* 115 (10), S. 2811-2821.
- Schreier, D. A.; Hacker, T. A.; Hunter, K.; Eickoff, J.; Liu, A.; Song, G.; Chesler, N.** (2014): Impact of increased hematocrit on right ventricular afterload in response to chronic hypoxia. *Journal of Applied Physiology* 117 (8), S. 833-839.
- Seeger, W.; Adir, Y.; Barberà, J. A.; Champion, H.; Coghlan, J. G.; Cottin, V.; Marco, T. de; Galiè, N.; Ghio, S.; Gibbs, S.; Martinez, F. J.; Semigran, M. J.; Simonneau, G.; Wells, A. U.; Vachiéry, J.-L.** (2013): Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl), S. D109-D116.
- Seo, K.; Rainer, P. P.; Shalkey Hahn, V.; Lee, D.-I.; Jo, S.-H.; Andersen, A.; Liu, T.; Xu, X.; Willette, R. N.; Lepore, J. J.; Marino, J. P.; Birnbaumer, L.; Schnackenberg, C. G.; Kass, D. A.** (2014): Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (4), S. 1551-1556.

- Sergeeva, I. A.; Christoffels, V. M.** (2013): Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1832 (12), S. 2403-2413.
- Seth, M.; Zhang, Z.-S.; Mao, L.; Graham, V.; Burch, J.; Stiber, J.; Tsiokas, L.; Winn, M.; Abramowitz, J.; Rockman, H. A.; Birnbaumer, L.; Rosenberg, P.** (2009): TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circulation Research* 105 (10), S. 1023-1030.
- Sharma, R. K.; Oliveira, A. C.; Yang, T.; Karas, M. M.; Li, J.; Lobaton, G. O.; Aquino, V. P.; Robles-Vera, I.; Kloet, A. D. de; Krause, E. G.; Bryant, A. J.; Verma, A.; Li, Q.; Richards, E. M.; Raizada, M. K.** (2020): Gut Pathology and Its Rescue by ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Hypertension* 76 (1), S. 206-216.
- Shibata, A.; Uchida, K.; Kodo, K.; Miyauchi, T.; Mikoshiba, K.; Takahashi, T.; Yamagishi, H.** (2019): Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor inhibits the progression of pulmonary arterial hypertension via calcium signaling and apoptosis. *Heart and Vessels* 34 (4), S. 724-734.
- Shin, J. T.; Semigran, M. J.** (2010): Heart failure and pulmonary hypertension. *Heart Failure Clinics* 6 (2), S. 215-222.
- Simonneau, G.; Gatzoulis, M. A.; Adatia, I.; Celermajer, D.; Denton, C.; Ghofrani, A.; Gomez Sanchez, M. A.; Krishna Kumar, R.; Landzberg, M.; Machado, R. F.; Olschewski, H.; Robbins, I. M.; Souza, R.** (2013): Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl), S. D34-D41.
- Simonneau, G.; Montani, D.; Celermajer, D. S.; Denton, C. P.; Gatzoulis, M. A.; Krowka, M.; Williams, P. G.; Souza, R.** (2019): Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal* 53 (1).
- Simonneau, G.; Robbins, I. M.; Beghetti, M.; Channick, R. N.; Delcroix, M.; Denton, C. P.; Elliott, C. G.; Gaine, S. P.; Gladwin, M. T.; Jing, Z.-C.; Krowka, M. J.; Langleben, D.; Nakanishi, N.; Souza, R.** (2009): Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 54 (1 Suppl), S. S43-S54.
- Slomp, J.; Gittenberger-de Groot, A. C.; Glukhova, M. A.; van Conny Munsteren, J.; Kockx, M. M.; Schwartz, S. M.; Kotliansky, V. E.** (1997): Differentiation, dedifferentiation, and apoptosis of smooth muscle cells during the development of the human ductus arteriosus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17 (5), S. 1003-1009.
- Smith, K. A.; Ayon, R. J.; Tang, H.; Makino, A.; Yuan, J. X.-J.** (2016): Calcium-Sensing Receptor Regulates Cytosolic Ca<sup>2+</sup> and Plays a Major Role in the Development of Pulmonary Hypertension. *Frontiers in Physiology* 7.
- Sommer, N.; Strielkov, I.; Pak, O.; Weissmann, N.** (2016): Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *The European Respiratory Journal* 47 (1), S. 288-303.
- Song, M. Y.; Makino, A.; Yuan, J. X.-J.** (2011): STIM2 Contributes to Enhanced Store-operated Ca Entry in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulmonary Circulation* 1 (1), S. 84-94.
- Stenmark, K. R.; Fagan, K. A.; Frid, M. G.** (2006): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circulation Research* 99 (7), S. 675-691.

**Stenmark, K. R.; Frid, M. G.; Graham, B. B.; Tudor, R. M.** (2018): Dynamic and diverse changes in the functional properties of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Cardiovascular Research* 114 (4), S. 551-564.

**Stenmark, K. R.; McMurtry, I. F.** (2005): Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension: a time for reappraisal? *Circulation Research* 97 (2), S. 95-98.

**Stenmark, K. R.; Meyrick, B.; Galie, N.; Mooi, W. J.; McMurtry, I. F.** (2009): Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (6), S. L1013-L1032.

**Stiefelhagen, P.** (2021): Die Rechtsherzinsuffizienz ist eine Systemerkrankung. *CardioVasc* 21 (2), S. 10-11.

**Storch, U.; Forst, A.-L.; Philipp, M.; Gudermann, T.; Mederos y Schnitzler, M.** (2012): Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (5), S. 3530-3540.

**Strielkov, I.; Krause, N. C.; Knoepf, F.; Alebrahimdehkordi, N.; Pak, O.; Garcia, C.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Sommer, N.; Weissmann, N.** (2020): Cytochrome P450 epoxygenase-derived 5,6-epoxyeicosatrienoic acid relaxes pulmonary arteries in normoxia but promotes sustained pulmonary vasoconstriction in hypoxia. *Acta Physiologica* 230 (1).

**Tamura, N.; Ogawa, Y.; Chusho, H.; Nakamura, K.; Nakao, K.; Suda, M.; Kasahara, M.; Hashimoto, R.; Katsuura, G.; Mukoyama, M.; Itoh, H.; Saito, Y.; Tanaka, I.; Otani, H.; Katsuki, M.** (2000): Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (8), S. 4239-4244.

**Tang, H.; Yamamura, A.; Yamamura, H.; Song, S.; Fraidenburg, D. R.; Chen, J.; Gu, Y.; Pohl, N. M.; Zhou, T.; Jiménez-Pérez, L.; Ayon, R. J.; Desai, A. A.; Goltzman, D.; Rischard, F.; Khalpey, Z.; Black, S. M.; García, J. G. N.; Makino, A.; Yuan, J. X. J.** (2016): Pathogenic role of calcium-sensing receptors in the development and progression of pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 310 (9), S. L846-L859.

**Taraseviciene-Stewart, L.; Kasahara, Y.; Alger, L.; Hirth, P.; Mc Mahon, G.; Waltenberger, J.; Voelkel, N. F.; Tudor, R. M.** (2001): Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB Journal* 15 (2), S. 427-438.

**Thomas, C. A.; Anderson, R. J.; Condon, D. F.; Jesus Perez, V. A. de** (2020): Diagnosis and Management of Pulmonary Hypertension in the Modern Era: Insights from the 6th World Symposium. *Pulmonary Therapy* 6 (1), S. 9-22.

**Tian, Q.; Fan, X.; Ma, J.; Li, D.; Han, Y.; Yin, X.; Wang, H.; Huang, T.; Wang, Z.; Shentu, Y.; Xue, F.; Du, C.; Wang, Y.; Mao, S.; Fan, J.; Gong, Y.** (2021): Critical role of VGLL4 in the regulation of chronic normobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *FASEB Journal* 35 (8).

**Trask, A. J.; Groban, L.; Westwood, B. M.; Varagic, J.; Ganten, D.; Gallagher, P. E.; Chappell, M. C.; Ferrario, C. M.** (2010): Inhibition of angiotensin-converting enzyme 2 exacerbates

cardiac hypertrophy and fibrosis in Ren-2 hypertensive rats. *American Journal of Hypertension* 23 (6), S. 687-693.

**Tuder, R. M.; Marecki, J. C.; Richter, A.; Fijalkowska, I.; Flores, S.** (2007): Pathology of pulmonary hypertension. *Clinics in Chest Medicine* 28 (1), S. 23-42 vii.

**Turlova, E.; Wong, R.; Xu, B.; Li, F.; Du, L.; Habbous, S.; Horgen, F. D.; Fleig, A.; Feng, Z.-P.; Sun, H.-S.** (2021): TRPM7 Mediates Neuronal Cell Death Upstream of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Calcineurin Mechanism in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Transl. Stroke Res.* 12 (1), S. 164-184.

**Urban, N.; Hill, K.; Wang, L.; Kuebler, W. M.; Schaefer, M.** (2012): Novel pharmacological TRPC inhibitors block hypoxia-induced vasoconstriction. *Cell Calcium* 51 (2), S. 194-206.

**Vachiéry, J.-L.; Tedford, R. J.; Rosenkranz, S.; Palazzini, M.; Lang, I.; Guazzi, M.; Coghlan, G.; Chazova, I.; Marco, T. de** (2019): Pulmonary hypertension due to left heart disease. *The European Respiratory Journal* 53 (1).

**Vachiéry, J.-L.; Simonneau, G.** (2010): Management of severe pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Review* 19 (118), S. 279-287.

**van Wolferen, S. A.; Marcus, J. T.; Westerhof, N.; Spreeuwenberg, M. D.; Marques, K. M. J.; Bronzwaer, J. G. F.; Henkens, I. R.; Gan, C. T.-J.; Boonstra, A.; Postmus, P. E.; Vonk-Noordegraaf, A.** (2008): Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *European Heart Journal* 29 (1), S. 120-127.

**Veith, C.; Neghabian, D.; Luitel, H.; Wilhelm, J.; Egemnazarov, B.; Muntanjoh, C.; Fischer, J.-H.; Dahal, B. K.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Grimminger, F.; Fink, L.; Kwapiszewska, G.; Weissmann, N.; Sydykov, A.** (2020): FHL-1 is not involved in pressure overload-induced maladaptive right ventricular remodeling and dysfunction. *Basic Res Cardiol* 115 (2).

**Vitali, S. H.; Hansmann, G.; Rose, C.; Fernandez-Gonzalez, A.; Scheid, A.; Mitsialis, S. A.; Kourembanas, S.** (2014): The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up. *Pulmonary Circulation* 4 (4), S. 619-629.

**Voelkel, N. F.; Tuder, R. M.** (2000): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *The Journal of Clinical Investigation* 106 (6), S. 733-738.

**Vonk Noordegraaf, A.; Galiè, N.** (2011): The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Review* 20 (122), S. 243-253.

**Vonk Noordegraaf, A.; Chin, K. M.; Haddad, F.; Hassoun, P. M.; Hemnes, A. R.; Hopkins, S. R.; Kawut, S. M.; Langleben, D.; Lumens, J.; Naeije, R.** (2019): Pathophysiology of the right ventricle and of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension: an update. *The European Respiratory Journal* 53 (1).

**Wang, J.; Weigand, L.; Lu, W.; Sylvester, J. T.; Semenza, G. L.; Shimoda, L. A.** (2006): Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circulation Research* 98 (12), S. 1528-1537.

**Wang, N.; Chen, L.; Cheng, N.; Zhang, J.; Tian, T.; Lu, W.** (2014): Active calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates NMDA receptor mediated postischemic long-term potentiation (i-LTP) by promoting the interaction between CaMKII and NMDA receptors in ischemia. *Neural Plasticity* 2014.

**Wang, Q.; Wang, D.; Yan, G.; Sun, L.; Tang, C.** (2016): TRPC6 is required for hypoxia-induced basal intracellular calcium concentration elevation, and for the proliferation and migration of rat distal pulmonary venous smooth muscle cells. *Molecular Medicine Reports* 13 (2), S. 1577-1585.

**Wang, Y.; Deng, X.; Hewavitharana, T.; Soboloff, J.; Gill, D. L.** (2008): Stim, ORAI and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 35 (9), S. 1127-1133.

**Weissmann, N.; Dietrich, A.; Fuchs, B.; Kalwa, H.; Ay, M.; Dumitrascu, R.; Olschewski, A.; Storch, U.; Mederos y Schnitzler, M.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Pinkenburg, O.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Gudermann, T.** (2006): Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (50), S. 19093-19098.

**Weissmann, N.; Manz, D.; Buchspies, D.; Keller, S.; Mehling, T.; Voswinckel, R.; Quanz, K.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Fink, L.; Seeger, W.; Gassmann, M.; Grimminger, F.** (2005): Congenital erythropoietin over-expression causes "anti-pulmonary hypertensive" structural and functional changes in mice, both in normoxia and hypoxia. *Thrombosis and Haemostasis* 94 (3), S. 630-638.

**West, J. B.; Mathieu-Costello, O.** (1995): Stress failure of pulmonary capillaries as a limiting factor for maximal exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 70 (2), S. 99-108.

**Wijeratne, D. T.; Lajkosz, K.; Brogly, S. B.; Lougheed, M. D.; Jiang, L.; Housin, A.; Barber, D.; Johnson, A.; Doliszny, K. M.; Archer, S. L.** (2018): Increasing Incidence and Prevalence of World Health Organization Groups 1 to 4 Pulmonary Hypertension: A Population-Based Cohort Study in Ontario, Canada. *Circulation. Cardiovascular Quality and Outcomes* 11 (2).

**Wittmer, V. L.; Waichert, É. J.; Gava, P. L.; Pereira, F. E. L.; Guimarães, M. C. C.; Figueiredo, S. G. de; Mauad, H.** (2015): Effects of captopril on cardiovascular reflexes and respiratory mechanisms in rats submitted to monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 30, S. 57-65.

**Wohrley, J. D.; Frid, M. G.; Moiseeva, E. P.; Orton, E. C.; Belknap, J. K.; Stenmark, K. R.** (1995): Hypoxia selectively induces proliferation in a specific subpopulation of smooth muscle cells in the bovine neonatal pulmonary arterial media. *The Journal of Clinical Investigation* 96 (1), S. 273-281.

**Worth, N. F.; Rolfe, B. E.; Song, J.; Campbell, G. R.** (2001): Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 49 (3), S. 130-145.

**Wu, X.; Eder, P.; Chang, B.; Molkenin, J. D.** (2010): TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (15), S. 7000-7005.

**Xia, Y.; Yang, X.-R.; Fu, Z.; Paudel, O.; Abramowitz, J.; Birnbaumer, L.; Sham, J. S. K.** (2014): Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions. *Hypertension* 63 (1), S. 173-180.

- Xiao, X.; Liu, H.-X.; Shen, K.; Cao, W.; Li, X.-Q.** (2017): Canonical Transient Receptor Potential Channels and Their Link with Cardio/Cerebro-Vascular Diseases. *Biomolecules & Therapeutics* 25 (5), S. 471-481.
- Xie, C.; Ritchie, R. P.; Huang, H.; Zhang, J.; Chen, Y. E.** (2011): Smooth muscle cell differentiation in vitro: models and underlying molecular mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31 (7), S. 1485-1494.
- Yao, Y.; Li, H.; Da, X.; He, Z.; Tang, B.; Li, Y.; Hu, C.; Xu, C.; Chen, Q.; Wang, Q. K.** (2019): SUMOylation of Vps34 by SUMO1 promotes phenotypic switching of vascular smooth muscle cells by activating autophagy in pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 55, S. 38-49.
- Yi, B.; Cui, J.; Ning, J.; Wang, G.; Qian, G.; Lu, K.** (2012): Over-expression of PKG $\alpha$  inhibits hypoxia-induced proliferation, Akt activation, and phenotype modulation of human PASMCs: the role of phenotype modulation of PASMCs in pulmonary vascular remodeling. *Gene* 492 (2), S. 354-360.
- Yu, Y.; Fantozzi, I.; Remillard, C. V.; Landsberg, J. W.; Kunichika, N.; Platoshyn, O.; Tigno, D. D.; Thistlethwaite, P. A.; Rubin, L. J.; Yuan, J. X.-J.** (2004): Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (38), S. 13861-13866.
- Yuan, J. P.; Kim, M. S.; Zeng, W.; Shin, D. M.; Huang, G.; Worley, P. F.; Muallem, S.** (2009): TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. *Channels* 3 (4), S. 221-225.
- Yuan, J. P.; Zeng, W.; Huang, G. N.; Worley, P. F.; Muallem, S.** (2007): STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature Cell Biology* 9 (6), S. 636-645.
- Yue, Y.; Li, Y.-Q.; Fu, S.; Wu, Y.-T.; Zhu, L.; Hua, L.; Lv, J.-Y.; Li, Y.-L.; Yang, D.-L.** (2020): Osthole inhibits cell proliferation by regulating the TGF- $\beta$ 1/Smad/p38 signaling pathways in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 121.
- Zhang, J.; Dong, J.; Martin, M.; He, M.; Gongol, B.; Marin, T. L.; Chen, L.; Shi, X.; Yin, Y.; Shang, F.; Wu, Y.; Huang, H.-Y.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Kang, J.; Moya, E. A.; Huang, H.-D.; Powell, F. L.; Chen, Z.; Thistlethwaite, P. A.; Yuan, Z.-Y.; Shyy, J. Y.-J.** (2018): AMP-activated Protein Kinase Phosphorylation of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Endothelium Mitigates Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 198 (4), S. 509-520.
- Zhang, R.; Wu, Y.; Zhao, M.; Liu, C.; Zhou, L.; Shen, S.; Liao, S.; Yang, K.; Li, Q.; Wan, H.** (2009): Role of HIF-1 $\alpha$  in the regulation ACE and ACE2 expression in hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (4), S. L631-L640.
- Zhang, Y.; Wang, Y.; Yang, K.; Tian, L.; Fu, X.; Wang, Y.; Sun, Y.; Jiang, Q.; Lu, W.; Wang, J.** (2014): BMP4 increases the expression of TRPC and basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> via the p38MAPK and ERK1/2 pathways independent of BMPRII in PASMCs. *PLoS One* 9 (12).

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 2.3.1:</b> Dendrogramm der TRP Superfamilie	21
<b>Abbildung 2.3.2:</b> Aufbau von TRPC Kanälen	23
<b>Abbildung 3.2.1:</b> Schematische Darstellung des Versuchsablaufs	43
<b>Abbildung 3.2.2:</b> Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der isolierten, ventilerten und blutfrei perfundierten Lunge	51
<b>Abbildung 3.2.3:</b> Repräsentative Bilder der mit Hoechst und EdU angefärbten PASMCM	54
<b>Abbildung 3.2.4:</b> Repräsentative Bilder der apoptotischen und mit Hoechst angefärbten PASMCM	56
<b>Abbildung 3.2.5:</b> Für Calciummessungen verwendeter Metallring zur Applikation von Substanzen unter hypoxischen Bedingungen	58
<b>Abbildung 3.2.6:</b> Schematische Darstellung der Calciummessungen mit der Substanz Cyklopiazonsäure	58
<b>Abbildung 3.2.7:</b> Schematische Darstellung der Calciummessungen mit der Substanz 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol	58
<b>Abbildung 3.2.8:</b> Schematische Darstellung der Calciummessungen mit den Substanzen Cyklopiazonsäure und Nifedipin bzw. SKF-96365	59
<b>Abbildung 3.2.9:</b> Schematische Darstellung der Calciummessungen mit der Substanz 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol und Nifedipin bzw. SKF-96365	59
<b>Abbildung 3.2.10:</b> Schematische Darstellung der Auswertung der Calciummessungen	60
<b>Abbildung 4.1.1:</b> Einfluss der chronischen Hypoxie auf physiologische Parameter	69
<b>Abbildung 4.2.1:</b> Einfluss der chronischen Hypoxie auf den RVSP	70
<b>Abbildung 4.2.2:</b> Auswirkung von chronischer Hypoxie auf die RVH	71
<b>Abbildung 4.2.3:</b> Echokardiografische Messung des CO nach CHE	72
<b>Abbildung 4.2.4:</b> Echokardiografische Messung der RVWT und des RVID nach CHE	73
<b>Abbildung 4.2.5:</b> Echokardiografische Messung der TAPSE nach CHE	73
<b>Abbildung 4.2.6:</b> Echokardiografische Messung des Quotienten aus PAAT und RVET nach CHE	74
<b>Abbildung 4.2.7:</b> Berechnung des $PVR_{\text{echo}}$ mithilfe echokardiografischer Messungen nach CHE	75
<b>Abbildung 4.2.8:</b> Einfluss der chronischen Hypoxie auf den Muskularisierungsgrad kleiner Lungengefäße	76
<b>Abbildung 4.3.1:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Proliferationsrate von PASMCM	77
<b>Abbildung 4.3.2:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Migrationsrate von PASMCM	78
<b>Abbildung 4.3.3:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Apoptoserate von PASMCM	79
<b>Abbildung 4.3.4:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die TRPC mRNA-Expression in PASMCM	80
<b>Abbildung 4.3.5:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Expression der am Speicher-vermittelten $Ca^{2+}$ -Einstrom beteiligten Gene in PASMCM	81

<b>Abbildung 4.3.6:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Expression von $\alpha$ -SMA in PASMC	82
<b>Abbildung 4.3.7:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Expression des p-IP <sub>3</sub> R in PASMC	83
<b>Abbildung 4.3.8:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Phosphorylierung des pro-proliferativen Proteins p38 in PASMC	84
<b>Abbildung 4.3.9:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Expression von Calmodulin und die Phosphorylierung der CamKII in PASMC	85
<b>Abbildung 4.4.1:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den ROCE in PASMC unter chronischer Hypoxie	87
<b>Abbildung 4.4.2:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Entleerung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Speicher in PASMC unter chronischer Hypoxie	89
<b>Abbildung 4.4.3:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den SOCE in PASMC unter chronischer Hypoxie	90
<b>Abbildung 4.4.4:</b> Einfluss von Nifedipin auf den ROCE der PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6 <sup>-/-</sup> Mäusen	91
<b>Abbildung 4.4.5:</b> Einfluss von SKF-96365 auf den ROCE der PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6 <sup>-/-</sup> Mäusen	92
<b>Abbildung 4.4.6:</b> Einfluss von Nifedipin auf den SOCE der PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6 <sup>-/-</sup> Mäusen	93
<b>Abbildung 4.4.7:</b> Einfluss von SKF-96365 auf den SOCE der PASMC von TRPC WT und TRPC1/3/6 <sup>-/-</sup> Mäusen	94
<b>Abbildung 4.5.1:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den LVSP und den SAP	95
<b>Abbildung 4.5.2:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die LVH	96
<b>Abbildung 4.5.3:</b> Echokardiografische Messung der EF nach CHE	97
<b>Abbildung 4.5.4:</b> Echokardiografische Messung der LVWT und des LVID nach CHE	97
<b>Abbildung 4.5.5:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den Kollagengehalt des RV	98
<b>Abbildung 4.5.6:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den Kollagengehalt des LV	99
<b>Abbildung 4.5.7:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den Kollagengehalt der Lunge	99
<b>Abbildung 4.5.8:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den PAP in isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Mauslungen	100
<b>Abbildung 4.5.9:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die aortale Wandspannung	101
<b>Abbildung 4.5.10:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die TRPC mRNA-Expression in RV	102
<b>Abbildung 4.5.11:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Genexpression von <i>Nppa</i> , <i>Nppb</i> , <i>Pln</i> , <i>Myh6</i> und <i>Myh7</i> im RV	103
<b>Abbildung 4.5.12:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die TRPC mRNA-Expression in LV	104
<b>Abbildung 4.5.13:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Genexpression von <i>Nppa</i> , <i>Nppb</i> , <i>Pln</i> , <i>Myh6</i> und <i>Myh7</i> im LV	105
<b>Abbildung 4.5.14:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Plasmakonzentration von ACE2	106
<b>Abbildung 4.5.15:</b> Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Plasmakonzentration von AGT und ACE	106
<b>Abbildung 5.1:</b> Darstellung der Kernbefunde	107

## 10 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1.1:</b> Klinische Klassifikation der PH nach <i>6th World Symposium on Pulmonary Hypertension</i>	8
<b>Tabelle 2.1.2:</b> WHO Funktionelle Klassifikation der PH	16
<b>Tabelle 3.1.1:</b> Primersequenzen für RTqPCR	35
<b>Tabelle 3.2.1:</b> Protokoll der immunhistochemischen Färbung zur Bestimmung der Muskularisierung	46
<b>Tabelle 3.2.2:</b> Protokoll der <i>Picro-Sirius Red</i> Färbung	49
<b>Tabelle 3.2.3:</b> Protokoll der EdU Färbung	54
<b>Tabelle 3.2.4:</b> Protokoll der Apoptose Färbung	55
<b>Tabelle 3.2.5:</b> Protokoll der RT-PCR	61
<b>Tabelle 3.2.6:</b> Protokoll der semi-quantitativen Echtzeit PCR	62
<b>Tabelle 3.2.7:</b> Protokoll zur Herstellung eines 16,5% SDS-Polyacrylamid-Gels	64

## 11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre:

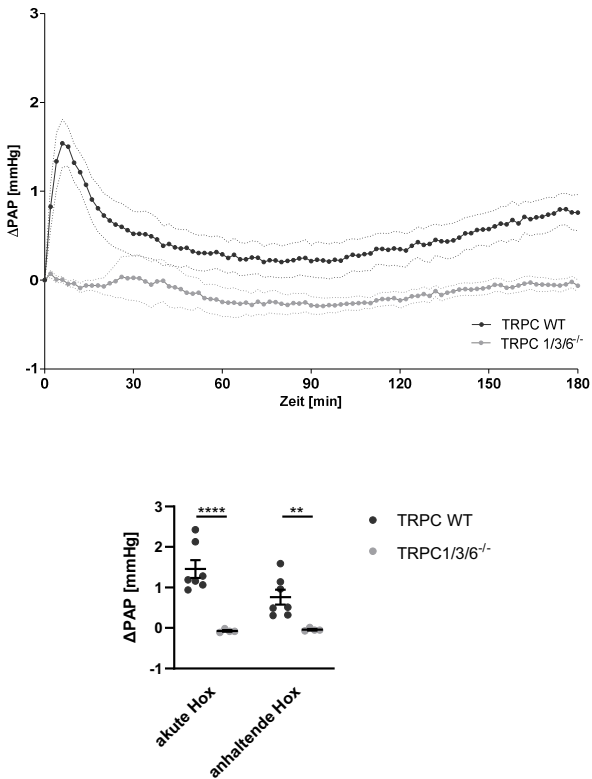
Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, 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.

Kathrin Malkmus

## 12 Anhang

### 12.1 Isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Lunge

Gezeigt werden die Resultate von Untersuchungen der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Lunge auf akute und anhaltende Hypoxie der TRPC WT und TRPC1/3/6<sup>-/-</sup> Mäuse. Die Darstellung zeigt den Verlauf des  $\Delta$ PAP über die Zeit der Messung (obere Abbildung) sowie die Auswertung des maximal erreichten  $\Delta$ PAP auf akute und anhaltende Hypoxie (untere Abbildung).



## 12.2 Veröffentlichungen

Fysikopoulos, A.; Seimetz, M.; Hadzic, S.; Knoepp, F.; Wu, C.-Y.; **Malkmus, K.**; Wilhelm, J.; Pichl, A.; Bednorz, M.; Tadele Roxlau, E.; Ghofrani, H. A.; Sommer, N.; Gierhardt, M.; Schermuly, R. T.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Weissmann, N.; Kraut, S. (2021): Amelioration of elastase-induced lung emphysema and reversal of pulmonary hypertension by pharmacological iNOS inhibition in mice. *British Journal of Pharmacology* 178 (1), S. 152-171.

Veith C.; Vartürk-Özcan I.; Wujak M.; Hadzic S.; Wu C.-Y.; Knoepp F.; Kraut S.; Petrovic A.; Gredic M.; Pak O.; Brosien M.; Heimbrodt M.; Wilhelm J.; Weisel F. C.; **Malkmus K.**; Schäfer K.; Gall H.; Tello K.; Kosanovic D.; Sydykov A.; Sarybaev A.; Günther A.; Brandes R. P.; Seeger W.; Grimminger F.; Ghofrani H. A.; Schermuly R. T.; Kwapiszewska G.; Sommer N.; Weissmann N. (2022): Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine, a Novel Regulator of Vascular Cell Function in Pulmonary Hypertension. *Circulation* 145 (12), S. 916-933.

## 12.3 Kongressbeiträge

**Malkmus, K.**; Schaffelhofer, L.; Dietrich, A.; Weißmann, N.; Seeger, W.; Kraut, S.; Brosien, M.: Classical transient receptor potential proteins 1, 3 and 6 play a role in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. GGL Annual Conference 2019, Gießen, Deutschland, **Poster**

**Malkmus, K.**; Schaffelhofer, L.; Dietrich, A.; Seeger, W.; Rummel, C.; Weißmann, N.; Kraut, S.; Brosien, M.: Classical transient receptor potential proteins 1, 3 and 6 play a role in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. GGL Annual Conference 2020, Gießen, Deutschland, **Vortrag**

**Malkmus, K.**; Schaffelhofer, L.; Seeger, W.; Rummel, C.; Gudermann, T.; Kraut, S.; Weißmann, N.; Dietrich, A.; Brosien, M.: Classical transient receptor potential proteins 1, 3 and 6 play a role in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. PVRI Digital 2021, Gießen, Deutschland, **Abstract und Kurzvortrag**

**Malkmus, K.**; Schaffelhofer, L.; Seeger, W.; Rummel, C.; Gudermann, T.; Kraut, S.; Weißmann, N.; Dietrich, A.; Brosien, M.: Classical transient receptor potential proteins 1, 3 and 6 play a role in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. CPI Day of Science 2021, Gießen, Deutschland, **Poster**

**Malkmus, K.**; Schaffelhofer, L.; Dietrich, A.; Seeger, W.; Rummel, C.; Weißmann, N.; Kraut, S.; Brosien, M.: Classical transient receptor potential proteins 1, 3 and 6 play a role in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. GGL Annual Conference 2021, Gießen, Deutschland, **Vortrag**

**Malkmus, K.;** Schäffer, J.; Knoepp, F.; Uhl, J.; Schaffelhofer, L.; Erb, A.; Kummer, L.; Seeger, W.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Weissmann, N.; Kraut, S.; Brosien, M.: TRPA1 dependent signalling in cardiac dysfunction and pulmonary hypertension. ATS 2022 International Conference, San Francisco, Kalifornien, USA, **Poster**

## **12.4 Förderung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.11.2019 bis 31.03.2021 mit einer Promotionsförderung der Studienstiftung des deutschen Volkes unterstützt.

### 13 Danksagung

Besonderer Dank gilt...

der Studienstiftung des deutschen Volkes für meine Unterstützung im Rahmen einer Promotionsförderung.

apl. Prof. Dr. Christoph Rummel für die Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin.

Prof. Dr. Norbert Weißmann für die Bereitstellung des Themas. Für die Zurverfügungstellung des Arbeitsplatzes sowie der Materialien und die externe Betreuung am Fachbereich Medizin.

Prof. Dr. Alexander Dietrich für die Bereitstellung der gentechnisch modifizierten Mauslinien und die Unterstützung seitens des Walther-Straub-Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München.

Dr. Monika Brosien für die persönliche Betreuung bei dieser Arbeit. Für die Hilfe bei jeder Fehlersuche und die vielen Lösungsansätze. Danke für die liebe Aufnahme in der Arbeitsgruppe und dein Verständnis für jedes Anliegen, das ich hatte.

Dr. Simone Kraut dafür, dass ich mit jeder Frage zu dir kommen konnte und du für alles eine Lösung parat hattest. Für die Motivation an Tagen, an denen es im Labor nicht so gut lief und die Schokolade in jeder Notlage. Dafür, dass du mir gezeigt hast, wieviel Spaß man doch bei der Arbeit haben kann.

Lisa Schaffelhofer für die tatkräftige Unterstützung. Dafür, dass du immer die beste Laune verbreitet hast und mir das Arbeiten mit dir jederzeit viel leichter gefallen ist.

Lena Kummer für die ersten gemeinsamen Stunden in der Histo, die uns fast haben verzweifeln lassen. Für die gegenseitige Motivation und die lustigen Unternehmungen außerhalb der Arbeitszeit.

Karin Quanz für all die organisatorische Unterstützung. Für die Hilfe bei allen Problemen und Schwierigkeiten, die sich ergeben haben, auch wenn noch so viel zu tun war. Dafür, dass du jedes kleine Chaos zu lösen wusstest.

Ingrid Breitenborn-Müller für die letzte Rettung, wenn bei meinen Western Blots mal wieder was schiefging. Für die vielen tollen Gespräche und dafür, dass du immer ein offenes Ohr hattest.

Julia Schäffer für die vielen unvergesslichen gemeinsamen Erinnerungen. Dafür, dass wir zusammen so viel gelacht haben und du immer für mich da warst. Für das gegenseitige Wiederaufbauen, die vielen lustigen Mittagspausen und den obligatorischen, täglich gemeinsamen Kaffee. Für jeden schönen Moment innerhalb und außerhalb des Labors.

## Danksagung

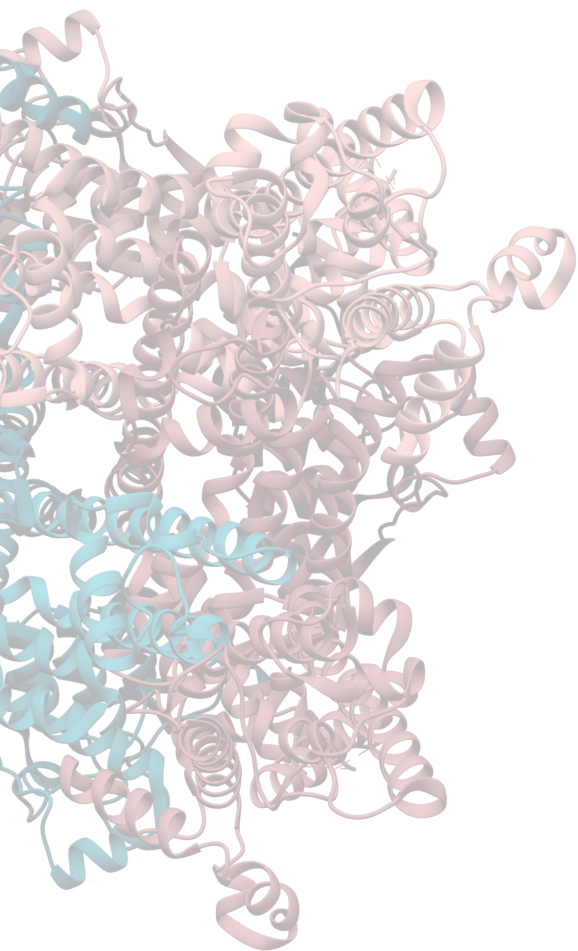
---

allen Mitarbeitern des CPI, insbesondere Carmen Homberger, Nils Schupp, Elisabeth Kappes und Susanne Lich für die technische Unterstützung.

meiner Schwester für das Korrekturlesen dieser Arbeit und das Zuhören bei den vielen gemeinsamen Telefonaten.

meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung, die ihr mir jederzeit zuteilwerden lasst. Für euer Vertrauen in mich und eure Geduld. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt und mir mein Studium und meine Promotion ermöglicht habt.

meinem Ehemann für jede Entlastung und Hilfe. Für den Zufluchtsort Zuhause und für das gemeinsame Abschalten. Für all die Sicherheit, all deinen Rückhalt und deine Geduld.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7057-1

