

Analyse der mitochondrialen Atmungskettenfunktion von peripheren mononukleären
Blutzellen bei Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie

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

Vorgelegt von Theine, Finn Fabian

aus Lübeck

Gießen (2023)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, Abteilung für Pneumologie und
Intensivmedizin

Gutachter: Prof. Dr. Hecker

Gutachter: Prof. Dr. Günther

Tag der Disputation: 30.10.2023

Inhaltsverzeichnis

I.	Hauptteil.....	1
1.	Einleitung und Problemstellung.....	1
1.1	Pulmonale Hypertonie	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2	Klassifikation	2
1.1.3	Ätiologie und Pathophysiologie.....	3
1.1.4	Klinik	6
1.1.5	Diagnostik.....	6
1.1.6	Therapie	11
1.2	Die Rolle der Mitochondrien bei der Entstehung der PAH	13
1.2.1	Aufbau und Funktion der Mitochondrien	13
1.2.2	Atmungskette	14
1.2.3	Fission und Fusion.....	16
1.2.4	Mitochondriale Veränderungen in Immunzellen.....	19
1.2.5	Mitochondriale Veränderungen bei PAH	20
1.2.6	Veränderungen peripherer Immunzellen bei PAH.....	22
1.2.7	Systemische Manifestationen der PAH	23
1.3	Ziel und Fragestellung der Studie.....	24
2.	Material und Methoden	26
2.1	Materialien	26
2.1.1	Geräte	26
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3	Chemikalien	28
2.1.4	Puffer und Medien.....	29
2.1.5	Kits und Assays.....	30
2.1.6	Verwendete Antikörper	31
2.1.7	Software.....	31
2.2	Methodik	32
2.2.1	Studiendesign	32
2.2.2	Ein- und Ausschlusskriterien	32
2.2.3	Probengewinnung.....	32
2.2.4	Aufbereitung der Blutproben und Isolation der PBMC.....	33
2.2.5	Messung der Zellatmung	34
2.2.6	„Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA).....	41
2.2.7	Weitere Proteinbestimmungen und Quantifizierung von TBARS	41
2.2.8	Western Blot	42
2.2.9	Laborwerte.....	44
2.2.10	Rechtsherzkatheter.....	45

2.2.11	Statistische Auswertung	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Charakteristika der Studienteilnehmer	46
3.2	Mitochondriale Respiration der PBMC	47
3.2.1	Ergebnisse der Zellatmung der Kohorte 1 nach Stratifikation nach PVR.....	49
3.2.2	Ergebnisse der Zellatmung der Kohorte 2 nach Stratifikation nach PVR.....	51
3.2.3	Mitochondriale Respiration in Bezug auf den Mutationsstatus	53
3.3	Ergebnisse der Proteinanalysen mittels Western Blots	54
3.3.1	Ergebnisse der Proteinanalysen der Kohorte 1	54
3.3.2	Ergebnisse der Proteinanalysen der Kohorte 2	55
3.3.3	Ergebnisse der Proteinanalysen in Bezug auf den Mutationsstatus	56
3.4	Ergebnisse der Bestimmung oxidativer und antioxidativer Marker.....	57
3.5	Ergebnisse der Analyse der Blutwerte aus den Routinekontrollen	59
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	64
4.	Diskussion.....	65
4.1	Übersicht	65
4.2	Kritische Diskussion der Methodik	66
4.3	Respiration der Mitochondrien von PBMC bei Patienten mit PAH	67
4.4	Expression von Markern der Fission und Fusion	72
4.5	Expression von Markern des oxidativen Stresses bei PAH.....	73
4.6	Weitere Blutwerte im Kontext der PAH	74
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	75
II.	Zusammenfassung	77
III.	Summary	79
IV.	Abkürzungsverzeichnis.....	80
V.	Tabellenverzeichnis	82
VI.	Abbildungsverzeichnis	83
VII.	Literaturverzeichnis	84
VIII.	Anhang	100
IX.	Publikationsverzeichnis	109
X.	Ehrenwörtliche Erklärung	110
XI.	Danksagung.....	111

I. Hauptteil

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Pulmonale Hypertonie

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Bei der pulmonalen Hypertonie (PH) handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, welche alle durch einen erhöhten Blutdruck im Lungenkreislauf charakterisiert sind. Der Erkrankungsverlauf ist progredient und führt zu einer erhöhten Belastung des rechten Herzens mit folgender Rechtsherzinsuffizienz und Rechtsherzversagen (Hoepfer et al., 2017).

Der Begriff der PH ist definiert durch einen mittleren pulmonal-arteriellen Blutdruck (mPAP) von $>20\text{mmHg}$. Zur Diagnosestellung muss ein mPAP von $>20\text{mmHg}$, in Ruhe durch eine Untersuchung mittels Rechtsherzkatheter (RHK), gemessen werden (Simonneau et al., 2019). Der mPAP beim gesunden Menschen liegt bei $14.0 \pm 3.3\text{ mmHg}$. Es lassen sich präkapilläre von postkapillären, sowie gemischten Formen der PH abgrenzen (s. Tabelle 1) (Simonneau et al., 2019).

Die postkapillären Formen der PH werden vor allem durch Linksherzerkrankungen ausgelöst. Durch die Linksherzerkrankung kommt es zu einem Rückstau des Blutes in die Lungengefäße und somit zu einer Erhöhung des pulmonal-venösen und pulmonal-arteriellen Druckes (Matthys, Konietzko, Schlehe, & Rühle, 2016). Die isolierte postkapilläre PH ist definiert durch einen mPAP $>20\text{mmHg}$, einen pulmonal-arteriellen Verschlussdruck (PAWP) $>15\text{mmHg}$, sowie einen pulmonalen-vaskulären Widerstand (PVR) von $<3\text{ Woods Unit (WU)}$ (Simonneau et al., 2019). Alternativ zu WU, kann der PVR auch in dyn/s/cm^{-5} angegeben werden. Dabei entspricht eine WU 80 dyn/s/cm^{-5} (Kwan, Shavelle, & Laughrun, 2019).

Die präkapillären Formen umfassen die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH), die pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen, die chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) sowie ggf. die PH bei multifaktorieller Genese. Diese Formen sind durch einen mPAP von $>20\text{mmHg}$, bei gleichzeitig PAWP $\leq 15\text{mmHg}$ sowie einem PVR von $\geq 3\text{WU}$ definiert (Simonneau et al., 2019). In den klinischen Gruppen 2 und 5 (s. Tabelle 2) können Mischformen auftreten, welche durch einen mPAP $>20\text{mmHg}$, einem PAWP $>15\text{mmHg}$ sowie einem PVR $\geq 3\text{WU}$ charakterisiert sind (Simonneau et al., 2019).

Weltweit liegt die Inzidenz der PH bei ca. 1%, in der Gruppe der >65-jährigen Menschen liegt die Inzidenz bereits bei ca. 10%. Den größten Anteil machen PH-Formen aufgrund von Linksherzerkrankungen sowie chronischen Lungenerkrankungen aus. Es wird geschätzt, dass bei etwa 50% der Patienten mit einer Erkrankung des linken Herzens eine PH vorliegt (Hoepfer, Humbert, et al., 2016).

In Deutschland lag 2014 die Inzidenz der PAH bei 3,9 pro Million Erwachsener sowie einer Prävalenz von 25,9 pro Million Erwachsener. Inzidenz und Prävalenz in Deutschland ähneln damit denen der europäischen Nachbarländer (Hoepfer, Huscher, & Pittrow, 2016). Aus der Gruppe der PAH machte hier die idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH) mit 62,7% die mit Abstand größte Gruppe aus. Das Durchschnittsalter der im Jahr 2014 neu diagnostizierten Patienten mit PAH in Deutschland lag bei 64 Jahren (Hoepfer, Huscher, & Pittrow, 2016).

Definition	Charakteristika	Klinische Gruppen
Präkapilläre PH	mPAP > 20mmHg PAWP ≤15mmHg PVR ≥ 3WU	1,3,4 und 5
Isolierte postkapilläre PH	mPAP >20mmHg PAWP >15mmHg PVR <3 WU	2 und 5
Kombinierte prä- und postkapilläre PH	mPAP >20mmHg PAWP >15mmHg PVR ≥3WU	2 und 5

Tabelle 1: Hämodynamische Definition der PH, nach Simonneau et al. (2019)
Erläuterung zu den klinischen Gruppen s. Tabelle 2.

1.1.2 Klassifikation

Im Jahr 1973 fand das erste Welt-Symposium zur PH in Genf statt, hier wurde erstmalig eine einheitliche Klassifikation der Erkrankung etabliert. In den folgenden Jahren wurde die Klassifikation stetig weiterentwickelt und aktualisiert (Simonneau et al., 2019).

Die aktuelle Einteilung geht auf das sechste Welt-Symposium (WSPH) von 2018 in Nizza, Frankreich, zurück. Die Einteilung erfolgt sowohl nach den klinischen Parametern, als auch nach pathophysiologischen und ätiologischen Aspekten (Simonneau et al., 2019).

Für die Einleitung der Therapie der PH ist es essenziell, dass nach der Diagnosestellung die Einteilung in einer der Untergruppen erfolgt (Matthys et al., 2016).

- 1. Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)**
 - 1.1. Idiopathische PAH (IPAH)
 - 1.2. Hereditäre PAH (HPAH)
 - 1.3. Medikamenten und Toxin induzierte PAH

<ul style="list-style-type: none"> 1.4. PAH assoziiert mit: <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1. Kollagenosen 1.4.2. HIV-Infektionen 1.4.3. Portaler Hypertension 1.4.4. Kongenitalen Herzerkrankungen 1.4.5. Schistosomiasis 1.5. PAH mit gutem Langzeit-Ansprechen auf Kalzium-Kanal-Blocker 1.6. Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) / pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH) 1.7. Persistierende PH des Neugeborenen 2. PH aufgrund von Erkrankungen des linken Herzens <ul style="list-style-type: none"> 2.1. Diastolische Dysfunktion 2.2. Systolische Dysfunktion 2.3. Erkrankungen der Herzklappen 2.4. Angeborene oder erworbene kardiovaskuläre Ursachen, die zu postkapillärer PH führen 3. PH aufgrund von Lungenerkrankungen oder Hypoxie <ul style="list-style-type: none"> 3.1. Obstruktive Lungenerkrankungen 3.2. Restriktive Lungenerkrankungen 3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischt obstruktiver/restriktiver Komponente 3.4. Hypoxie ohne Lungenerkrankung 3.5. Entwicklungsstörungen der Lunge 4. PH aufgrund Obstruktionen der Lungenarterien <ul style="list-style-type: none"> 4.1. Chronisch thromboembolische PH 4.2. Andere Obstruktionen der Lungenarterien 5. PH mit unklaren oder multifaktoriellen Mechanismen <ul style="list-style-type: none"> 5.1. Hämatologische Erkrankungen 5.2. Systemische und metabolische Erkrankungen 5.3. Andere 5.4. Komplexe angeborene Erkrankungen des Herzens
--

Tabelle 2: Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie nach Nizza (2018) (Simonneau et al., 2019)

1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie

Die PH beschreibt einen hämodynamischen Zustand mit erhöhten Drücken im Lungenkreislauf. Dieser kann sowohl als eigenständige Erkrankung auftreten oder aber Folge von anderen Grunderkrankungen sein. In beiden Fällen kommt es durch die Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes, sowie - bei präkapillären Formen der PH - des PVRs, zu einer progredienten Insuffizienz des rechten Herzens, die unbehandelt zum Tod führen kann (Humbert et al., 2019). Im Folgenden wird im Detail die Pathogenese der Gefäßumbauprozesse bei der PAH, Gruppe 1 nach der Nizza-Klassifikation (s. Tabelle 2) dargestellt, deren Mechanismen sich zum großen Teil mit denen der anderen Gruppen überschneiden. Als Ursache der Erkrankung werden neben der Assoziation mit Grunderkrankungen bei einigen Formen auch genetische Faktoren angesehen (Kim &

George, 2019). So ließ sich bei 75% der hereditären PAH und bei 25% der IPAH eine Mutation im „*bone morphogenetic protein receptor type 2*“ (BMP2) nachweisen (Jonigk, Hoepfer, Kreipe, & Länger, 2012). Zwei weitere bekannte Mutationen, die mit der Entwicklung einer PAH assoziiert sind, sind die der Gene, die für die „*activin receptor-like kinase 1*“ (ALK1) und „*endoglin*“ (ENG) kodieren (Morrell et al., 2019). ALK1 und ENG gehören, wie BMP2, zur Gruppe der „*transforming growth factor*“-Superfamilie (TGF) und sind unter anderem an Prozessen der Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose von Zellen beteiligt (Morrell et al., 2019).

Die PAH ist durch eine Vasokonstriktion und Umbauprozesse („*Remodeling*“) der pulmonalen Gefäße charakterisiert. Durch die Umbauprozesse kommt es zu einer Zunahme der Dicke aller drei Schichten der pulmonalen Arterien (Intima, Media und Adventitia), und eine Obstruktion des pulmonal-arteriellen Gefäßsystems mit erhöhtem PVR ist die Folge (Thenappan, Chan, & Kenneth Weir, 2018). Die Umbauprozesse sind durch die Proliferation verschiedener Zelltypen (v.a. glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten) in der Gefäßwand gekennzeichnet. Durch Hypertrophie und Hyperplasie von glatten Muskelzellen kommt es zur Verdickung der Media der pulmonalen Arterien sowie durch Migration von Gefäßzellen zur Muskularisierung ursprünglich muskelfreier präkapillärer Gefäße (Thenappan, Chan, et al., 2018). Davon abgesehen kommt es zur Infiltration von Entzündungszellen (u.a. B- und T-Lymphozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen) in das perivaskuläre Gewebe, welche ebenfalls die beschriebenen Umbauprozesse fördern (Humbert et al., 2019; Rabinovitch, Guignabert, Humbert, & Nicolls, 2014). Durch Proliferation der extrazellulären Matrix, insbesondere Kollagenen, kommt es außerdem zur Abnahme der Compliance und Versteifung der pulmonalen Arterien (Thenappan, Chan, et al., 2018). Eine wesentliche ursächliche Rolle bei der Vasokonstriktion und dem Gefäßumbau spielt die endotheliale Dysfunktion. Dieser Begriff beschreibt ein Ungleichgewicht von Vasodilatoren [vor allem Prostacyclin, Stickstoffmonoxid (NO) und cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP)] zugunsten von Vasokonstriktoren (z.B. Endothelin-1) (Jonigk et al., 2012; Kondo, Okumura, Adachi, & Murohara, 2019). An den Umbauprozessen sind außerdem Wachstumsfaktoren beteiligt, welche als Mitogene wirken und über Chemotaxis ebenfalls Gefäßzellen anlocken. Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren zählen hierbei der „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF), „*basic fibroblast growth factor*“ (bFGF), „*platelet derived growth factor*“ (PDGF) sowie TGF- β (Schermuly, Ghofrani, Wilkins, & Grimminger, 2011). Hinzu kommt eine

erhöhte Gerinnungsneigung, Freisetzung von Adhäsionsmolekülen wie z.B. E-Selektin sowie möglicherweise eine gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Humbert et al., 2019). Des Weiteren werden lokal Zytokine und Chemokine [u.a. Interleukin -1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6)] freigesetzt, welches eine Abnahme der Angiogenese und der Reparaturmechanismen der Gefäße zur Folge hat (Humbert et al., 2019).

Bei anderen Formen der PH als der PAH spielen noch weitere Pathomechanismen eine wesentliche Rolle, z.B. die Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion bei PH-Formen der Gruppe 3 (Simonneau et al., 2019). Ein wesentlicher Unterschied pulmonaler Gefäße zu denen des restlichen Körpers ist ihre Reaktion auf akute Hypoxie. Während es im Körperkreislauf zu einer Vasodilatation kommt, kontrahieren pulmonale Gefäße bei akuter Hypoxie (Sommer, Strielkov, Pak, & Weissmann, 2016). Bei kurzfristiger Hypoxie sorgt dieser Mechanismus, bekannt als von Euler-Liljestrand-Mechanismus, dafür, dass in schlecht ventilierten Lungenarealen der PVR ansteigt und die Areale entsprechend schlechter perfundiert werden. Der von Euler-Liljestrand-Mechanismus wirkt somit einem Ventilation-Perfusions-Mismatch entgegen. Bei länger anhaltender, globaler Hypoxie kann die Vasokonstriktion allerdings zur Entstehung einer PH beitragen und es kommt zusätzlich durch Umbauprozesse zu einer Fixierung des erhöhten PVRs (Hughes, 2016; Sommer et al., 2016). Die Mitochondrien in der glatten Muskulatur pulmonaler Arterien werden in diesem Kontext als Sauerstoffsensoren angesehen, welche durch Ausschüttung von Botenstoffen die Vasokonstriktion fördern (Dromparis, Sutendra, & Michelakis, 2010).

Bei der PH aufgrund von Linksherzerkrankungen (Gruppe 2 nach der Nizza-Klassifikation) kommt es durch den Druckanstieg im pulmonal-venösen System zu einem passiven Anstieg des mPAP (isolierte post-kapilläre PH), ggf. in Kombination mit präkapillären Gefäßumbauprozessen (gemischt prä-/postkapilläre PH) (Fernández et al., 2019). Die distalen pulmonalen Arterien zeigen histologisch eine Hypertrophie der Media sowie Proliferation der Intima mit einem Verschluss des Lumens als Folge. Außerdem konnte eine Verdickung pulmonaler Venen, insbesondere der Intima beobachtet werden (Fernández et al., 2019).

Die Ursache der Entwicklung einer PH bei chronischen Lungenerkrankungen (Nizza Klasse 3) ist multifaktoriell. Neben chronischer Hypoxie, Rarefizierung peripherer pulmonaler Gefäße und inflammatorischen Prozessen, spielen auch Umbauprozesse der

Gefäße und interstitielle Fibrosierungen eine Rolle (Klinger, 2016; Singh, Ma, & Berlin, 2016). Im Rahmen von interstitiellen Lungenerkrankungen konnten die Umbauprozesse auch in den Gefäßen von Lungenarealen, in denen keine histologischen Anzeichen einer Fibrose vorlag, nachgewiesen werden. (Klinger, 2016).

Die Ursache der CTEPH sind chronisch rezidivierende Thrombembolien, welche sich organisieren und zu Verschlüssen von Pulmonalarterien führen (Simonneau, Torbicki, Dorfmueller, & Kim, 2017). Aufgrund einer Umverteilung des Blutflusses, und damit einhergehenden Stresses der Gefäße, kommt es bei einigen Patienten, auch in durch die Embolien nicht direkt betroffenen Arealen, zu einer Mikrovaskulopathie. Ein Anstieg des PVR ist auch hier die Folge (Salibe-Filho et al., 2020; Simonneau et al., 2017).

1.1.4 Klinik

In den frühen Stadien der Erkrankung sind die Zeichen und Symptome der PH meist unspezifisch und leicht zu übersehen. Hierbei zeigen die verschiedenen Formen der PH meist eine ähnliche Klinik, hervorgerufen durch eine Dysfunktion des rechten Ventrikels (Galiè et al., 2016). Das Leitsymptom ist die Dyspnoe, anfangs nur als Belastungsdyspnoe, im weiteren Verlauf kann auch Ruhedyspnoe und Dyspnoe beim Bücken (Bendopnoe) hinzukommen (Hoepfer et al., 2017). Weitere Symptome können Müdigkeit, Erschöpfung, Brustschmerz sowie in fortgeschrittenem Stadium Synkopen sein (Galiè et al., 2016; Kondo et al., 2019). Kommt es im Krankheitsverlauf zur kardialen Dekompensation präsentiert sich der Patient mit Stauung der Jugularvenen, Hepatomegalie, Aszites sowie peripheren Ödemen (Hoepfer et al., 2017). Angelehnt an die Klassifikation der „New-York-Heart-Association“ (NYHA) der Herzinsuffizienz erfolgt eine klinische Einteilung der PH in vier Schweregrade (Hoepfer et al., 2010).

1.1.5 Diagnostik

Allgemeine Diagnostik

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik ist eine frühe Diagnosestellung häufig schwierig und oftmals haben Patienten einen längeren Weg hinter sich, bis die Diagnose der PH feststeht. Eine Studie hat dargelegt, dass es bei ca. 21% der Patienten mit PAH über zwei Jahre von Beginn der Symptome bis zur Diagnosestellung gedauert hat (Qi, Xing, Zhao, Zhu, & Zheng, 2020). Um eine zuverlässigere und zügigere Diagnosestellung zu gewährleisten, wurde ein Algorithmus zur Diagnostik bei Verdacht auf PH etabliert (s. Abbildung 1).

Nach einer ausführlichen Anamnese sollte die körperliche Untersuchung folgen. Bei Patienten mit PH könnten dabei bei der Inspektion Zeichen der peripheren oder zentralen Zyanose, sowie sicht- und tastbare Pulsationen links parasternal auffallen. Bei der Auskultation des Herzens können ein betonter zweiter Herzton bei verstärkter Pulmonaliskomponente, ein Systolikum links parasternal als Zeichen einer Trikuspidalinsuffizienz, sowie ein Diastolikum bei Pulmonalinsuffizienz erhoben werden (Galiè et al., 2016; Hoeper et al., 2017). Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung sind zusätzlich gestaute Halsvenen, Hepatomegalie, Aszites, periphere Ödeme sowie kalte Extremitäten typisch (Galiè et al., 2016). Im Anschluss an die körperliche Untersuchung folgen verschiedene Basisuntersuchungen zur weiteren Abklärung der Symptome.

Elektrokardiogramm (EKG)

Das EKG kann frühe Zeichen der PH zeigen, allerdings schließt ein normwertiges EKG die PH keinesfalls aus. Es muss daher immer weiterführende Diagnostik im Anschluss an ein EKG erfolgen. Mögliche EKG-Veränderungen können ein P-Pulmonale, eine Abweichung der Herzachse nach rechts, ein Rechtsschenkelblock sowie eine Verlängerung der QT-Zeit sein. Im späteren Verlauf der Erkrankung kann es auch zu supraventrikulären Arrhythmien kommen (Galiè et al., 2016; Qi et al., 2020)

Lungenfunktionsstest und arterielle Blutgasanalyse

Zum Ausschluss bzw. zur Suche nach zugrunde liegenden Erkrankungen der Atemwege sowie des Lungenparenchyms sollte eine Lungenfunktionsdiagnostik sowie eine arterielle Blutgasanalyse erfolgen. Ebenfalls gemessen werden sollte die Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (DLCO). Ein Abfall auf <45% des erwarteten Wertes ist mit einem schlechteren Outcome der Patienten assoziiert. Aufgrund einer kompensatorischen Hyperventilation ist der Kohlendioxidpartialdruck ($p\text{CO}_2$) oft erniedrigt (Frost et al., 2019; Qi et al., 2020).

Belastungsuntersuchungen

Belastungsuntersuchungen, wie der 6-Minuten Gehstest haben ebenfalls ihren festen Platz in der weiteren Diagnostik der PH. Insbesondere als Prognoseparameter wird der 6-Minuten Gehstest weit verbreitet in PH-Zentren regelmäßig durchgeführt (Galiè et al., 2016).

Transthorakale Echokardiographie (TTE)

Auch wenn die Diagnosestellung einer PH durch eine TTE nicht möglich ist, bleibt sie dennoch die wichtigste nicht-invasive Untersuchungsmethode zum Screening auf PH bei

entsprechender Symptomatik (Frost et al., 2019). Die Risiko-Einteilung für eine PH wird anhand der gemessenen maximalen Geschwindigkeit des Regurgitationsjets der Trikuspidalklappe sowie weiteren Nebenkriterien vorgenommen (siehe Tabelle 3) (Qi et al., 2020). Außerdem findet die TTE Anwendung bei der Suche nach der Ätiologie sowie bei Verlaufskontrollen der PH (Galiè et al., 2016).

Maximale Regurgitationsgeschwindigkeit an der Trikuspidalklappe (m/s)	Weitere Echokardiographische Zeichen der PH	Echokardiographische Wahrscheinlichkeit einer PH
≤2.8 oder nicht messbar	Nein	Niedrig
≤ 2.8 oder nicht messbar	Ja	Mittel
2.9-3.4	Nein	
2.9-3.4	Ja	Hoch
>3.4	Nicht nötig	

Tabelle 3: Echokardiographische Wahrscheinlichkeit für eine PH, gem. Frost et al.(2019)

Röntgenthorax

Zur weiteren Basisdiagnostik der PH gehört eine Röntgen-Thoraxaufnahme. Mögliche Befunde wären hier eine Vergrößerung des rechten Vorhofes und Ventrikels, erweiterte zentrale Pulmonalarterien sowie eine verminderte Füllung der peripheren Blutgefäße. Obwohl bei ca. 90% der Patienten mit IPAH bei Diagnosestellung ein pathologisches Röntgenbild befundet werden kann, schließt ein unauffälliges Röntgenbild eine PH nicht aus (Qi et al., 2020).

Ventilations-Perfusionsszintigraphie

Zum Ausschluss einer CTEPH sollte bei allen Patienten mit einer PH eine Ventilations-Perfusionsszintigraphie durchgeführt werden. Da die CTEPH potenziell kurativ therapierbar ist, ist es essenziell, sie nicht zu übersehen. Die Ventilations-Perfusionsszintigraphie kann eine CTEPH mit einer Sensitivität von 90-100% sowie einer Spezifität von 94-100% ausschließen und hat damit einen festen Platz in dem diagnostischen Algorithmus der PH (siehe Abbildung 1) (Qi et al., 2020).

RHK-Untersuchung

Nach wie vor ist die RHK-Untersuchung notwendig, um eine PH zu diagnostizieren bzw. auszuschließen. In der RHK-Untersuchung werden unter anderem PVR, mPAP, der Druck im rechten Vorhof und Ventrikel, der transpulmonale Gradient, PAWP, sowie das

Herzzeitvolumen bestimmt. Die RHK-Untersuchung ist somit essentiell zur Diagnosestellung einer PH, sowie zur Differenzierung zwischen prä- und postkapillärer Form der PH (Rosenkranz et al., 2011). Bei Patienten mit einer IPAH, HPAH, sowie bei Medikamenten und Toxin induzierter PAH ist während der RHK-Untersuchung, vor Beginn einer entsprechenden Therapie, eine Testung der Vasoreagibilität auf Kalziumkanal-Blocker möglich. Hierbei werden meistens kurzwirksame pulmonale Vasodilatoren wie inhalatives NO oder das inhalative Prostacyclin-Analogon Iloprost verwendet (Hoepfer et al., 2013). Als sog. „Responder“ gelten Patienten bei denen unter den genannten Substanzen ein Abfall des mPAP um mindestens 10mmHg auf <40mmHg, bei mindestens gleichbleibendem Herzzeitvolumen, festzustellen ist. Dieses Kriterium erfüllen ca. 15% der Patienten mit IPAH, von denen im weiteren Verlauf ca. 50% langfristig von einer Therapie mit Kalzium-Antagonisten profitieren (Rosenkranz et al., 2011).

Laboruntersuchungen

Obwohl Bluttests nicht für die Diagnosestellung der PH geeignet sind, sind sie sowohl für die weitere Abklärung der Ätiologie als auch für die Verlaufskontrolle und Diagnostik von Schäden der Endorgane wichtig (Galiè et al., 2016). Erhöhte Leberwerte und erhöhte B-Typ natriuretisches Peptid (BNP)- bzw. N-terminale-pro-B-Typ natriuretisches Peptid (NT-proBNP) -Werte können für eine Progredienz der Erkrankung und Herzinsuffizienz sprechen (Qi et al., 2020). Um eine Kollagenose als Ursache der Erkrankung zu diagnostizieren, sollte eine serologische Diagnostik erfolgen (Qi et al., 2020). Eine Testung auf Hepatitis und HIV gehören ebenfalls zum Routine-Screening (Frost et al., 2019).

Bei Patienten mit IPAH sowie Patienten mit einer positiven Familienanamnese bezüglich PAH sollte ein Screening auf Mutationen, u.a. des BMPR2 angeboten werden (Galiè et al., 2016). BMPR2- Mutationen sind als eine der wichtigsten prädisponierenden genetischen Faktoren bekannt und sind unter anderen in das vaskuläre *Remodeling* involviert (Humbert et al., 2019). Eine Analyse der Gene für ALK1 und ENG sollte insbesondere bei PAH assoziiert mit hereditärer hämorrhagischer Teleangiektasie erfolgen (Machado et al., 2009; Qi et al., 2020).

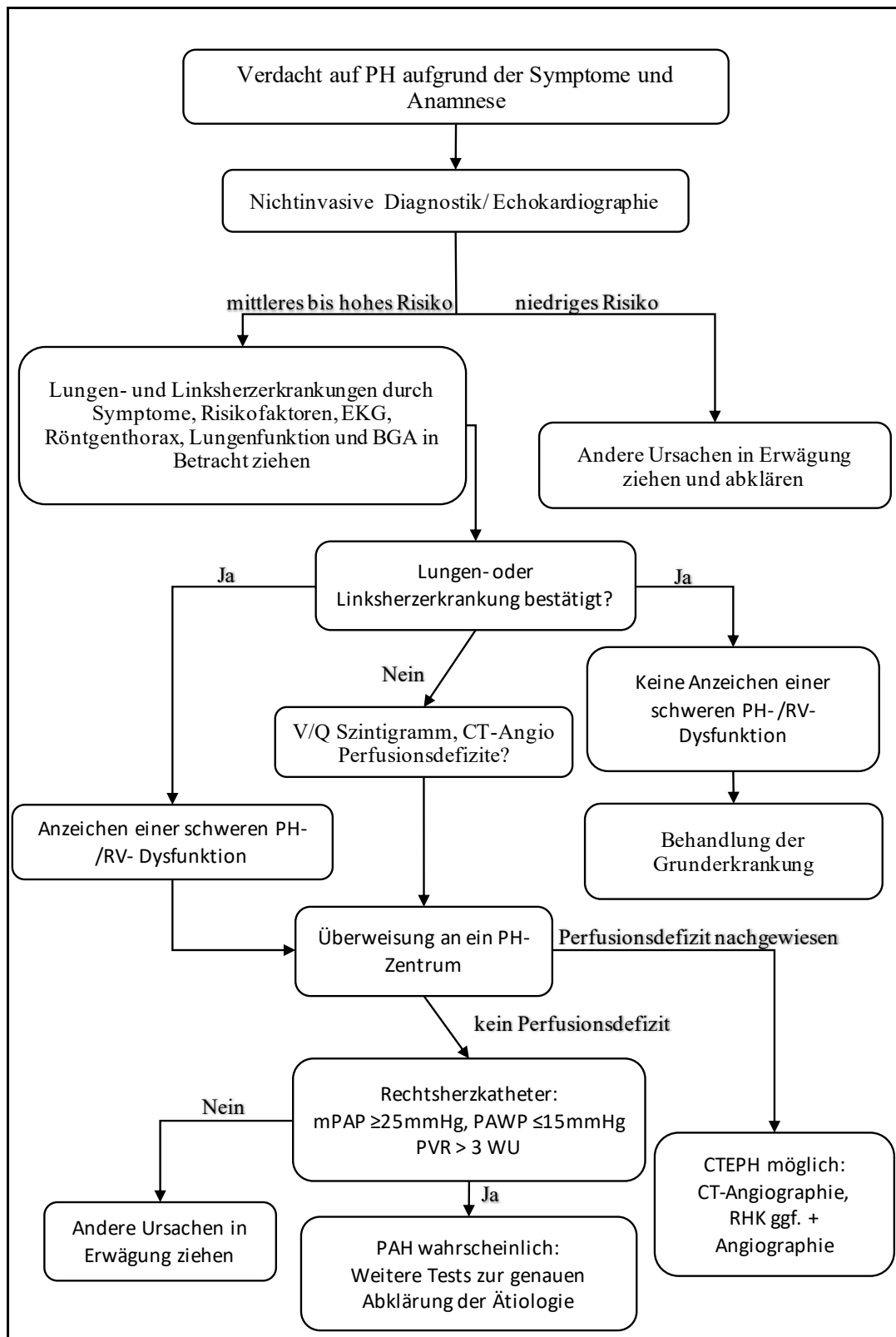


Abbildung 1: Algorithmus zur Diagnostik bei Verdacht auf eine PH modifiziert nach den ESC/ERS Leitlinien von 2015 (Galiè et al., 2016) und Qi et al. (2020)

PH: pulmonale Hypertonie; EKG: Elektrokardiogramm; mPAP: pulmonal-arterieller Mitteldruck; PAWP: mittlerer pulmonal-arterieller Verschlussdruck; PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand; WU: *Woods Unit*; RHK: Rechtsherzkatheter-Untersuchung; CTEPH: chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie; BGA: Blutgasanalyse; V/Q: Ventilation/ Perfusionsszintigraphie; CT-Angio: Computertomographie-Angiographie; RV: rechter Ventrikel;

1.1.6 Therapie

Eine spezifische Therapie der PH gibt es aktuell lediglich für die klinischen Klassen 1 und 4 nach Nizza. Die Therapie der Klassen 2,3 und 5 konzentriert sich vor allem auf die Behandlung der Grunderkrankung (Galiè et al., 2016). Im Folgenden wird die Therapie der PAH (Nizza Klasse 1) vorgestellt, da Patienten mit PAH Gegenstand der Untersuchung dieser Doktorarbeit sind.

Allgemeine und supportive Therapie

Die allgemeine Therapie der PAH umfasst neben einem moderaten betreuten körperlichen Training, die Infektionsprophylaxe durch Pneumokokken- und Influenza-Impfungen, sowie eine frühzeitige antibiotische Therapie bei Infektionen. Eine Schwangerschaft sollte, ebenso wie Reisen in größere Höhen (>1500m - 2000m über Normalnull) ohne Supplementation von Sauerstoff, vermieden werden (Galiè et al., 2016).

Liegen Zeichen des Rechtsherzversagens mit Flüssigkeitsretention vor, profitieren die Patienten von einer Therapie mittels Diuretika. Eine Sauerstofflangzeittherapie ist bei einem arteriellen Sauerstoffpartialdruck von <60 mmHg indiziert (Galiè et al., 2016).

Eine Therapie mit Kalziumantagonisten ist nach erfolgter positiver Vasoreagibilitätsmessung bei Patienten mit IPAH, HPAH sowie Medikamenten-induzierter PAH zugelassen. In diesem Kontext wird in Deutschland meistens der Kalziumantagonist Amlodipin verwendet (Hoepfer et al., 2016).

Eine orale Antikoagulation kann bei IPAH erwogen werden, ist aber eine Einzelfallentscheidung und sollte bei jedem Patienten individuell bewertet werden. Eine eventuell vorliegende Anämie, z.B. aufgrund eines Eisenmangels, sollte ebenfalls behandelt werden (Galiè et al., 2019, 2016).

Spezifische medikamentöse Therapie der PAH

Für die spezifische Therapie der PAH sind aktuell in Deutschland verschiedene Substanzklassen zugelassen. Die Substanzklassen wirken insbesondere über Signalwege der endothelialen Dysfunktion, welche die Vasodilatation und Proliferation der Gefäßmuskulatur beeinflussen. Die eingesetzten Substanzen sind Phosphodiesterase-Typ 5 (PDE5) Inhibitoren, Endothelinrezeptorantagonisten, Prostacyclinanaloga bzw. Prostacyclinrezeptor-Agonisten sowie ein Stimulator der löslichen Guanylatzyklase (sGC) (Hoepfer et al., 2016).

Anhand einer Risikostratifizierung werden die Patienten in drei Risikoklassen eingeteilt. Ziel der medikamentösen Therapie ist ein Erhalt bzw. wenn möglich eine Einstufung in

eine niedrigere Risikoklasse zu erreichen. Die Risikostratifizierung erfolgt anhand vier Kategorien in denen insgesamt sechs Parameter berücksichtigt sind und wurde bei dem 6. WSPH aktualisiert (Galiè et al., 2019; Lücke, Schmeißer, & Schreiber, 2019).

Die PDE5-Inhibitoren Sildenafil und Tadalafil hemmen den Abbau des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) durch die Phosphodiesterase 5. Die beiden Substanzen erhöhen damit die vasodilatative Wirkung des NO-cGMP-Signalweges (Galiè et al., 2016). Über den gleichen Signalweg wirkt Riociguat, ein Stimulator der löslichen Guanylatzyklase, welche wiederum die Produktion von cGMP steigert. Neben der vasodilatativen Wirkung hat der NO-cGMP Signalweg auch eine antiproliferative Komponente (Galiè et al., 2016; Matthys et al., 2016).

Endothelin (ET) wird insbesondere in Endothelzellen der Gefäße produziert und ist ein potenter Vasokonstriktor, sowie ein Mitogen für glatte Muskulatur. Es gibt einen ET-A Rezeptor, welcher sich ausschließlich auf glatten Muskelzellen befindet, und einen ET-B Rezeptor. Der ET-B Rezeptor ist sowohl auf der glatten Muskulatur als auch auf Endothelzellen vorhanden. Eine Stimulation der ET-Rezeptoren auf der glatten Muskulatur sorgt für die erwähnten mitogenen und vasokonstriktiven Effekte. Eine Stimulation des ET-B Rezeptors am Endothel hat, über eine Aktivierung von NO und Freisetzung von Prostacyclin, vasodilatative und antiproliferative Effekte (Galiè et al., 2005) Der erste in Europa zugelassene Endothelin-Antagonist (ERA) Bosentan wirkt sowohl auf den ET-A als auch auf den ET-B Rezeptor (Matthys et al., 2016). Mittlerweile stehen zusätzlich der selektive ET-A Antagonist Ambrisentan sowie der synthetische nicht selektive Antagonist Macitentan zur Therapie der PAH zur Verfügung (Galiè et al., 2016). Ambrisentan und Macitentan zeigen gegenüber Bosentan ein günstigeres Nebenwirkungsprofil in Bezug auf ihre Hepatotoxizität (Galiè et al., 2019).

Prostacyclin-Analoga hemmen neben ihrer potenten vasodilatativen Wirkung die Plättchenaggregation und haben eine antiproliferative sowie antiinflammatorische Wirkung (Kondo et al., 2019). Zu den gängigen Präparaten gehören Iloprost, Epoprostenol sowie Treprostinil. Je nach Präparat und Situation ist eine inhalative, subkutane, wie auch intravenöse Gabe möglich (Galiè et al., 2016). Seit 2016 ist außerdem der Prostacyclin-Rezeptor-Agonist Selexipag als orales Medikament zugelassen (Matthys et al., 2016).

Neben der Risikostratifizierung spielt auch die Einteilung in „typische“ PAH sowie „atypische“ PAH bei der Wahl der Therapie eine Rolle. Laut der Kölner Konsensus Konferenz 2016 werden jüngere Patienten ohne relevante kardiopulmonale

Vorerkrankungen zur „typischen“ PAH gezählt. Ältere Patienten mit relevanten kardiopulmonalen Begleiterkrankungen definieren die „atypische“ PAH (Hoepfer et al., 2016). Als Ultima-Ratio ist bei inadäquater Symptomkontrolle eine Lungentransplantation zu erwägen (Galiè et al., 2016).

1.2 Die Rolle der Mitochondrien bei der Entstehung der PAH

1.2.1 Aufbau und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, welche beim Eukaryonten in den meisten Zellen vorkommen. Sie sind von einer doppelwandigen Membran umgeben. Die äußere Membran grenzt das Mitochondrium zur Umgebung ab und ist durchlässig für viele kleinere Moleküle. Die Oberfläche der inneren Membran ist durch Falten (Cristae) und Röhren (Tubuli) stark vergrößert (Rassow, Hauser, Netzker, & Deutzmann, 2016). Im Gegensatz zur äußeren Membran ist die innere Membran auch für kleinere Moleküle undurchlässig. Der Transport durch die innere Membran ist daher durch viele Transportsysteme geregelt. An der inneren Membran findet die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) über die Atmungskette statt (Freya & Mannellab, 2000; Rassow et al., 2016).

In der Matrix der Mitochondrien befindet sich die ringförmige doppelsträngige mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (mtDNA). Die mtDNA kodiert beim Menschen lediglich für 13 Strukturproteine der Atmungskette (z.B. Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase) sowie für zwei ribosomale Ribonukleonsäuren (RNAs) und 22 Transfer-RNAs (Klopstock & Bender, 2008). Die Vererbung der mtDNA erfolgt maternal und folgt somit nicht den Mendelschen Gesetzen. Im Vergleich zur nukleären DNA ist die spontane Mutationsrate der mtDNA deutlich höher, dies wird unter anderem auf oxidativen Stress durch die Entstehung von ROS in den Mitochondrien zurückgeführt (Klopstock & Bender, 2008). Der mitochondriale Transkriptionsfaktor-A (TFAM) stabilisiert die mtDNA und ist für die Regulation der Transkription zuständig (Kang, Kim, & Hamasaki, 2007; Miranda, Foncea, Guerrero, & Leighton, 1999). Laut der Endosymbiontentheorie wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Mitochondrien um eine Symbiose aus einem anaeroben Prokaryonten mit einem Eubakterium handelt (Klopstock & Bender, 2008).

Da die meisten im Mitochondrium benötigten Proteine im Zytosol synthetisiert werden, sind Transportsysteme notwendig, um die Proteine in die Matrix des Mitochondriums zu bringen. Die beiden Transportsysteme werden „*translocase-of-the-outer-membrane*“ und

„*translocase-of-the-inner-membrane*“ (TOM und TIM) genannt (Klopstock & Bender, 2008; Rassow et al., 2016).

Die mitochondriale Matrix ist u.a. Ort der β -Oxidation der Fettsäuren, des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes, des Citratzyklus, Teile des Harnstoffzyklus sowie der Hämbiosynthese (Hoepfer et al., 2013; Machado et al., 2009). Der Pyruvatdehydrogenase-Komplex führt die im Zytosol durch die Glykolyse begonnene Verwertung von Kohlenhydraten fort. Aus Pyruvat wird Acetyl-CoA, welches dem Citratzyklus zugeführt wird. Durch die β -Oxidation von Lipiden entsteht ebenfalls Acetyl-CoA für den Citratzyklus. Im Citratzyklus werden die beiden Moleküle „*Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid*“ (NAD^+) und „*Flavin-Adenin-Dinukleotid*“ (FAD) zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ bzw. FADH_2 reduziert, welche in der Atmungskette zur Synthese von ATP verwendet werden (Löffler, 2013).

Neben der Synthese von ATP, hat das Mitochondrium noch weitere Aufgaben: so wirkt es bei der Apoptose, bei inflammatorischen Prozessen, bei der Aufrechthaltung der Kalzium-Hämostase sowie der Immunabwehr durch die Produktion von ROS mit (Dromparis & Michelakis, 2013; Freund-Michel, Khoyarattee, Savineau, Muller, & Guibert, 2014; Kohchi, Inagawa, Nishizawa, & Soma, 2009).

1.2.2 Atmungskette

Die Atmungskette dient der oxidativen ATP-Gewinnung. Die Atmungskette wird von vier Komplexen, die an der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert sind, und der ATP-Synthase, welche auch als Komplex V bezeichnet wird, gebildet. In den Stoffwechselprozessen, insbesondere der Glykolyse und dem Citratzyklus werden energiereiche Elektronen auf Transportmoleküle übertragen (Linnemann & Kühl, 2003). Die so entstehenden Reduktionsäquivalente ($\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2) dienen in der Atmungskette als Lieferanten für Elektronen. Über eine Reihe von Redoxsystemen werden die Elektronen weitergegeben, um zum Abschluss auf Sauerstoff übertragen zu werden, wobei Wasser entsteht. Die bei den Redoxprozessen freiwerdende Energie wird über Protonenpumpen dazu verwendet, einen Protonengradienten zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Intermembranraum aufzubauen. Der Protonengradient wiederum dient als Antrieb für die ATP-Synthase (Florian, 2020; Linnemann & Kühl, 2003). Einige der Elektronen reagieren während der Weitergabe in der Atmungskette mit

molekularem Sauerstoff zu Superoxid und werden zu verschiedenen anderen ROS weiter verstoffwechselt (Paulin & Michelakis, 2014).

Komplex I

Der erste Komplex der Atmungskette wird auch NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase genannt. Ein Teil des Komplexes ragt in die Matrix des Mitochondriums hinein, dort wird zunächst $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert (Linnemann & Kühl, 2003). Die Elektronen werden nun auf ein Flavinmononukleotid übertragen. Ebenfalls Teil des Komplexes I sind Eisen-Schwefel-Cluster, die nun von dem Flavinmononukleotid die Elektronen übertragen bekommen. Diese wiederum übertragen ein Elektron auf ein Ubichinon (auch Coenzym Q genannt), welches damit zu einem Semiubichinon reduziert wird. Nach Aufnahme eines weiteren Elektrons entsteht Ubichinol. Bei der Übertragung der Elektronen von dem Eisen-Schwefel-Cluster wird Energie frei, die zum Pumpen von vier Protonen in den intermembranösen Raum verwendet wird (Florian, 2020; Linnemann & Kühl, 2003).

Komplex II

Der zweite Komplex wird auch Succinat-Ubichinon-Reduktase genannt und ist identisch mit der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus. Bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat werden die freiwerdenden Elektronen auf FAD übertragen, welches damit zum FADH_2 reduziert wird (Linnemann & Kühl, 2003). Das FADH_2 überträgt nun die Elektronen auf das Ubichinon. Anders als bei Komplex I, werden, bei auf diesem Wege erzeugten Ubichinol, keine Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Ubichinon ist also der Knotenpunkt, an dem sich die Stoffwechselwege von Komplex I und II treffen (Florian, 2020; Linnemann & Kühl, 2003).

Komplex III

Der dritte Komplex umfasst die Cytochrom-c-Oxidoreduktase. Die Elektronen von Ubichinol werden im dritten Komplex auf Cytochrom c übertragen. Der Komplex III besteht aus Cytochrom b sowie einem Eisen-Schwefel Cluster. Ein Elektron des Ubichinols wird direkt über den Eisen-Schwefel Cluster auf das Cytochrom c übertragen, das andere Elektron wird an das Cytochrom b übertragen. Über das Cytochrom b wird das zweite Elektron dazu verwendet, Ubichinon (bzw. in einem zweiten Zyklus Ubisemiquinone) zu reduzieren. Beim Übertragen des Elektrons auf Cytochrom c sowie bei der Reduktion des Ubichinons werden jeweils zwei Protonen in den Intermembranraum gepumpt (Linnemann & Kühl, 2003; Williams & Chance, 1956).

Komplex IV

Der letzte Komplex der Atmungskette umfasst die Cytochrom-c-Sauerstoff-Oxidoreduktase. Über Zwischenschritte werden die Elektronen vom Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff übertragen, als Produkt entsteht Wasser. Es werden dabei zwei weitere Protonen in den Intermembranraum gepumpt (Florian, 2020; Linnemann & Kühl, 2003).

ATP-Synthese

Für die Synthese von ATP aus dem in den Komplexen I-IV aufgebauten Protonengradienten ist die ATP-Synthase zuständig. Sie befindet sich an der inneren Membran des Mitochondriums und besteht aus zwei Einheiten (Linnemann & Kühl, 2003). Die F_0 -Einheit fungiert als Kanal für die Protonen, während die F_1 -Einheit Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP phosphoryliert. Beim Durchstrom der Protonen rotiert die F_1 -Einheit, ähnlich wie eine Turbine, um das Ende der F_0 -Einheit. Untereinheiten der F_1 -Einheit, werden dabei durch Konformationsänderungen aktiviert und produzieren so ATP (Linnemann & Kühl, 2003).

Regulation der Atmungskette

Die Aktivität der Atmungskette wird unter anderem durch das Angebot an Substraten aus dem Citratzyklus, der Aktivität der Komplexe I-IV, sowie der Aktivität der ATP-Synthase bestimmt. Eine negative Rückkopplung durch ATP hemmt die Aktivität der Atmungskette, wohingegen ein hohes Angebot an ADP sie steigert (Williams & Chance, 1955).

1.2.3 Fission und Fusion

Bereits seit über 100 Jahren ist bekannt, dass die Morphologie der Mitochondrien nicht streng einheitlich ist, sondern dass die Mitochondrien in sehr unterschiedlichen Formen vorkommen (Lewis & Lewis, 1914). Jedoch wurde lange Zeit dieser Tatsache nicht weiter Beachtung geschenkt. Erst als es möglich wurde, Mitochondrien in lebenden Zellen zu beobachten, rückte die Morphologie und ihre Veränderungen wieder mehr in den Fokus. Dabei wurde beobachtet, dass die Form der Mitochondrien keinesfalls statisch ist, vielmehr unterliegen sie einer ständigen Dynamik (Bereiter-Hahn and Voth, 1994). Neben großen, kleinen, runden oder länglichen Mitochondrien werden auch netzartige Zusammenschlüsse von Mitochondrien beobachtet. Zwei der wichtigsten Mechanismen, die der Dynamik der Mitochondrien zugrunde liegen, werden Fission und Fusion, also das Spalten und Fusionieren von Mitochondrien, genannt (van der Bliek, Shen, &

Kawajiri, 2013). Zwischen den gegensätzlichen Prozessen der Fission und Fusion herrscht ein dynamisches Gleichgewicht, welches u.a. durch metabolische Prozesse beeinflusst werden kann. Eine Störung des Gleichgewichts führt entweder zu einem stark fragmentierten Gebilde mit vielen kleinen rundlichen Mitochondrien oder einem eng verflochtenen Netzwerk mit großen länglichen Mitochondrien (Tilokani, Nagashima, Paupe, & Prudent, 2018). Die Regulation der mitochondrialen Fission und Fusion erfolgt daher physiologischerweise sehr streng durch posttranslationäre Modifikationen wie Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen, sowie Protein-Protein-Interaktionen (Suárez-Rivero et al., 2016). In den letzten Jahren ist es gelungen, verschiedene Erscheinungsformen der Mitochondrien mit physiologischen und pathologischen Zuständen der Zelle in Verbindung zu bringen (Suárez-Rivero et al., 2016; Zemirli, Morel, & Molino, 2018). Die wichtigsten Proteine in diesem Kontext sind große Guaninnukleotid-bindende Proteine (GTPasen) die zur Dynamin-Familie gehören (van der Bliek et al., 2013).

Durch Fission und Fusion sind die Mitochondrien in der Lage Proteine und DNA auszutauschen. Das Abspalten und Separieren von dysfunktionalen, beschädigten Bestandteilen sorgt dafür, dass diese Teile durch Mitophagie abgebaut werden, und damit unschädlich gemacht werden können, gleichzeitig ist ein fusioniertes Netzwerk von Mitochondrien besser gegen Mitophagie geschützt. Im Rahmen der Zellteilung spielt vor allem die Fission zur Bereitstellung von Mitochondrien eine wichtige Rolle (Serasinghe & Chipuk, 2017; Tilokani et al., 2018; Zemirli et al., 2018).

Mitochondriale Fusion

Das Verschmelzen von zwei Mitochondrien zu einem Mitochondrium wird Fusion genannt. Für das Fusionieren der äußeren Mitochondrienmembran sind beim Menschen zwei GTPasen vorrangig zu benennen: Mitofusin 1 und Mitofusin 2 (MFN1 und MFN2). Im Kontaktbereich zweier Mitochondrien akkumulieren die beiden GTPasen und bilden Komplexe und fördern damit die Fusionierung (Zemirli et al., 2018). Das Fusionieren der inneren Membran wird vor allem durch die GTPase „*optic-athrophy-1*“ (OPA1) bestimmt. Es existieren von OPA1 sowohl lange als auch kurze Isoformen. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl die langen als auch die kurzen Isoformen die Fusionierung fördern, wobei die langen Isoformen als effektiverer Mediator der Fusion angesehen wird (Del Dotto, Fogazza, Carelli, Rugolo, & Zanna, 2018; Zemirli et al., 2018).

Ein fusioniertes Netzwerk der Mitochondrien bietet eine bessere Verteilung der Matrix-Komponenten und kann somit zu einer erhöhten Aktivität der ATPase sorgen. Dem

entsprechend liegt bei Zellen mit einem überwiegend fusionierten Netzwerk an Mitochondrien vor allem eine Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung über die Atmungskette vor (Kraus, Roy, Pucadyil, & Ryan, 2021). Bei Formen von mildem Stress für die Zelle [z.B. Hemmung der Proteintranslation und der RNA-Transkription, sowie Stress durch ultraviolette Strahlung (UV)] wurde vermehrtes mitochondriales Fusionieren beobachtet (Zemirli et al., 2018). Liegen geschädigte Genprodukte in den Mitochondrien vor, ist durch die Reorganisation der Mitochondrien ein Erhalt der Funktionalität der Mitochondrien möglich. Das Verschmelzen der Mitochondrien ist also unter anderem als ein Schutz-Mechanismus zu verstehen, der das Überleben der Mitochondrien, und damit der Zelle, gewährleisten soll (Tilokani et al., 2018; van der Blik et al., 2013; Zemirli et al., 2018).

Mitochondriale Fission

Mit Fission ist genau das Gegenteil von der mitochondrialen Fusion gemeint: ein Mitochondrium teilt sich auf in zwei separate Mitochondrien. Die GTPase „*dynamin-related-protein-1*“ (DRP1) ist das Schlüssel-Protein für die Fission (Serasinghe & Chipuk, 2017). Es handelt sich dabei um ein Protein, welches hauptsächlich im Zytosol vorzufinden ist und dynamisch an der Außenmembran des Mitochondriums oligomerisiert (Tilokani et al., 2018). DRP1 bindet an der Außenmembran an verschiedene Proteine, die so die Fission unterstützen. Bei den Proteinen handelt es sich vor allem um den „*mitochondrial-fission-factor*“ (MFF) und das „*mitochondrial-dynamic-protein*“ (MID) (Serasinghe & Chipuk, 2017). In Hefen konnte zusätzlich das Protein „*mitochondrial-fission-1-protein*“ (FIS1) als wichtiger Mediator für DRP1 identifiziert werden. Inwieweit dies auf humane Mitochondrien ebenfalls zutrifft, ist aktuell noch nicht abschließend geklärt. Ein Verlust von MFF zeigt den größten Abfall der Fission und wird daher als Hauptmediator angesehen (Lee & Yoon, 2016). Neuere Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass humanes FIS1 über das Blockieren von MFN1, MFN2 und OPA1 eine Hemmung der Fusion bewirkt (Yu, Jin, Lendahl, Nistér, & Zhao, 2019).

Ein Übergewicht von Prozessen der Fission sind bei hohem Stress der Zelle und bei apoptotischen Vorgängen zu beobachten. Dies ist allerdings auch in der G2/M-Phase des Zellzyklus der Fall. Für die mitochondriale Mobilität, die Qualitätskontrolle und die Vererbung der mtDNA ist die Fission ebenfalls wichtig (Tilokani et al., 2018; Zemirli et al., 2018). Außerdem wurden bei Zellen mit vermehrt fragmentierten Mitochondrien

insbesondere die Energiegewinnung durch die Glykolyse beschrieben (Kraus et al., 2021).

Ein Ungleichgewicht zwischen Fission und Fusion zugunsten erhöhter DRP1-Aktivität wird außerdem mit verstärkter endothelialer Inflammation in Verbindung gebracht (Forrester et al., 2020). So fördern Stressfaktoren wie erhöhte Glukosewerte, Hypoxie und oxidativer Stress über eine vermehrte DRP1 Aktivität die endotheliale Dysfunktion. Eine Blockierung von DRP1 wiederum hemmt die Produktion von ROS sowie die Adhäsion von Monozyten (Forrester et al., 2020). Wie oben erwähnt, hat DRP1 auch eine Funktion im Zellzyklus und damit bei der Zellproliferation. Bei Versuchen mit einem DRP1-Inhibitor war ein Arrest des Zellzyklus in der G2/M-Phase nachweisbar (Marsboom et al., 2012).

1.2.4 Mitochondriale Veränderungen in Immunzellen

Die beschriebenen dynamischen Veränderungen der Morphologie der Mitochondrien konnten auch bei Immunzellen beobachtet werden und mit unterschiedlichen Aktivitätszuständen der Immunzellen in Verbindung gebracht werden (Xie, Li, & Jin, 2020). Naive T-Zellen differenzieren sich bei Antigenkontakt zu T-Effektorzellen aus. Bei den T-Effektorzellen konnte ein vermehrt fragmentiertes mitochondriales Netzwerk beobachtet werden. Während der Großteil der T-Effektorzellen nach der Immunantwort absterben, differenzierte sich einige der T-Effektorzellen weiter zu langlebigen T-Gedächtniszellen, bei denen wiederum Prozesse der Fusion überwiegen (Faas & de Vos, 2020; Xie et al., 2020). Naive Makrophagen können sich sowohl zu proinflammatorischen M1- als auch antiinflammatorischen M2-Makrophagen differenzieren (Yunna, Mengru, Lei, & Weidong, 2020). Während bei M1-Makrophagen mitochondriale Fission überwiegt, liegen bei M2-Makrophagen vermehrt fusionierte Mitochondrienetzwerke vor (Xie et al., 2020).

Neben der Morphologie der Mitochondrien lassen sich außerdem Unterschiede zwischen verschiedenen Immunzellen bzw. unterschiedlich differenzierten Immunzellen, in der bevorzugten Energiegewinnung nachweisen (Wang & McLean, 2022). So ist bekannt, dass bestimmte Immunzellen (neutrophile Granulozyten, proinflammatorische M1-Makrophagen, T-Effektorzellen sowie dendritische Zellen) vermehrt durch eine schnelle Energiegewinnung durch die Glykolyse, andere Immunzellen (antiinflammatorische M2-Makrophagen und T-Gedächtniszellen) auf die langsamere, aber ertragreichere

Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung charakterisiert sind (Wang & McLean, 2022).

Neben den dargelegten morphologischen und metabolischen Veränderungen, denen Mitochondrien in Immunzellen, abhängig vom Zustand der Differenzierung und Aktivierung, unterliegen, spielen auch ROS im Zellzyklus bestimmter Immunzellen eine Rolle. Bei der Aktivierung von B-Zellen liegen zunächst erhöhte ROS, insbesondere Wasserstoffperoxid (H₂O₂), vor, gefolgt von einer Phase in der antioxidative Prozesse überwiegen (Yang, Bazhin, Werner, & Karakhanova, 2013). In antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritische Zellen, konnte bei Antigenkontakt eine erhöhte Produktion von ROS nachgewiesen werden (Matsue et al., 2003). Neben der Aktivierung und Ausdifferenzierung von Immunzellen sind ROS auch bei der Apoptose von T-Zellen involviert (Yang et al., 2013).

1.2.5 Mitochondriale Veränderungen bei PAH

Wie bereits dargelegt, unterliegen die pulmonalen Gefäße bei der PAH einem *Remodeling*-Prozess. Mittlerweile werden viele dieser pathologischen Umstrukturierungen mit einer Veränderung der mitochondrialen Funktion in Verbindung gebracht. Es wird angenommen, dass Mitochondrien über Veränderungen der Substratverstoffwechselung, mittels Glykolyse bzw. der oxidativen Phosphorylierung, sowie über eine veränderte Freisetzung von Mediatoren wie ROS und Ca⁺² bei der Entstehung der PAH mitwirken (Q. Yu & Chan, 2017).

In glatten Muskelzellen der pulmonalen Arterien [„*pulmonary-arterial-smooth-muscle-cells*“ (PASMC)] bei PAH-Patienten wurde ein Wechsel der Energiegewinnung von der oxidativen Phosphorylierung hin zur anaeroben Glykolyse beschrieben. Dies führte zu einer vermehrten Ansammlung von metabolischen Intermediaten, die so der Zelle damit vermehrt zum Wachstum und zur Proliferation zur Verfügung stehen (Paulin & Michelakis, 2014; Sutendra & Michelakis, 2014). Derselbe metabolische Zustand von Zellen wurde bereits mehrfach in malignen Tumorzellen beschrieben und wird auch Warburg-Effekt genannt (Culley & Chan, 2018; Liberti & Locasale, 2016; Sutendra & Michelakis, 2014). Die Annahme, dass die Mitochondrien bei PAH eine verminderte oxidative Phosphorylierung aufweisen, wird durch Studien gestützt, die *in vitro* zeigten, dass die Endothelzellen bei PAH einen geringeren Sauerstoffverbrauch aufwiesen (Q. Yu & Chan, 2017). Außerdem zeigte eine weitere Studie unserer Arbeitsgruppe, dass die respiratorische Funktion der Mitochondrien von PASMC im Tiermodell herabgesetzt war

(Sommer et al., 2011). Als Teil der metabolischen Umstrukturierung hin zur vermehrten Glykolyse wird die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) gehemmt (Culley & Chan, 2018). Durch die PDH wird Pyruvat zu Acetyl-CoA umgewandelt. Hemmung der PDH wird mit verstärkter Inflammation und vermehrter Produktion von Wachstumsfaktoren bei der PAH assoziiert (Paulin & Michelakis, 2014; Sutendra & Michelakis, 2014). Dieser Tatsache wird Rechnung getragen, indem ein therapeutischer Ansatz darin besteht, die PDH-Kinase, welche die PDH inhibiert, durch orale Gabe von Dichloracetate, zu inhibieren. In Studien konnten bereits positive Effekte auf die hämodynamischen Parameter von PAH Patienten hierdurch gezeigt werden (Michelakis et al., 2017).

Außerdem zeigten PASMCM von PH-Tiermodellen sowie PAH Patienten eine Hyperpolarisation der Mitochondrien (Dromparis & Michelakis, 2013; Paulin & Michelakis, 2014). Die hyperpolarisierten Membranen der Mitochondrien sind undurchlässiger, so gelangen u.a. apoptotische Botenstoffe (z.B. Cytochrom c und *apoptosis-inducing factor*) schwerer in das Zytoplasma (Dromparis et al., 2010). Die Zellen zeichnen also ein Zustand mit verringerter Apoptose bei gleichzeitig gesteigertem Wachstum und Proliferation aus (Culley & Chan, 2018).

Neben den beschriebenen metabolischen Veränderungen der Mitochondrien bei PAH konnten außerdem morphologische Umstrukturierungen der Mitochondrien beobachtet werden. So konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass in PASMCM eine Abnahme der Fusion von Mitochondrien vorliegt (Archer et al., 2008). Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass ebenfalls in humanen PASMCM vermehrt fragmentierte Mitochondrien durch Prozesse der Fission, unter anderem hervorgerufen durch eine Überexpression von DRP1 und FIS1 sowie einer verminderten Expression von MFN2, vorliegen (Marsboom et al., 2012; Paulin & Michelakis, 2014; Ranchoux et al., 2016; Ryan et al., 2013; Thenappan, Ormiston, Ryan, & Archer, 2018). Im Tierversuch konnte bereits gezeigt werden, dass eine therapeutische Inhibierung von DRP1, durch den „*mitochondrial division inhibitor-1*“ (Mdivi-1), zu einer Abnahme der Proliferation der PASMCM führte (Paulin & Michelakis, 2014).

Es wird außerdem davon ausgegangen, dass bei der Entwicklung bzw. der Aufrechterhaltung der PH ROS eine Rolle spielen. In der aktuellen Literatur wird allerdings die Rolle von ROS bei der Entwicklung der PH uneinheitlich beschrieben. So wurden in PH-PASMCM sowohl erniedrigte mROS (Paulin & Michelakis, 2014) als auch erhöhte ROS-Werte mit der PH in Verbindung gebracht (Yu & Chan, 2017). Durch die niedrigen mROS-Spiegel kam es zu einer Hemmung von K⁺-Kanälen in der

Zellmembran, mit erhöhten intrazellulären Ca^{2+} Spiegeln als Folge. Außerdem kam es zu einer gesteigerten Aktivität des Transkriptionsfaktors „*nuclear-factor-of-activated-T-cells*“ (NFAT) sowie dem „*hypoxia-inducible-factor-1 α* “ (HIF-1 α). Niedrige ROS-Werte führten also zu gesteigerter Proliferation, gehemmter Apoptose und außerdem zu einer Vasokonstriktion (Dromparis et al., 2010; Paulin & Michelakis, 2014; Sutendra & Michelakis, 2014). Gleichwohl werden auch erhöhte ROS-Werte als Mediator bei der PH assoziiert (Yu & Chan, 2017). Erhöhte ROS führten zu erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Spiegeln, zur Proliferation glatter Muskelzellen und zur Apoptose von Endothelzellen pulmonaler Arterien (Klopstock & Bender, 2008; Yu & Chan, 2017). Es wurde gezeigt, dass die Aktivität der Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) in PH-PASMC verringert war (Freund-Michel et al., 2014). Die SOD2 dient als Schutz der Zelle gegen oxidativen Stress (Flynn & Melovn, 2013). Weitere Biomarker des oxidativen Stress sind die Glutathione-Peroxidase, Carbonylproteine sowie Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) (Fernando et al., 2016; Jiménez-Fernández et al., 2021; Zhang et al., 2020). Eine Aktivierung und Stabilisierung von Wachstumsfaktoren und Immunzellen wurde ebenfalls durch erhöhte ROS postuliert (Diebold & Chandel, 2016; Sommer et al., 2016). Es konnten also sowohl Anzeichen erhöhter als auch erniedrigte ROS-Werte in Form von Biomarkern des oxidativen Stresses bei Patienten mit PH beobachtet werden. Die genauen Funktionen und Abläufe von ROS im Kontext der PH erscheinen komplex und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Neben den beschriebenen metabolischen Veränderungen konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass bei den Endothelzellen der Pulmonalarterien von Patienten mit IPAH eine signifikante Verringerung der mtDNA, der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase sowie der elektronenmikroskopisch gemessenen Anzahl der Mitochondrien besteht (Xu et al., 2007; Yu & Chan, 2017).

1.2.6 Veränderungen peripherer Immunzellen bei PAH

Neben den beschriebenen Veränderungen ortsständiger Zellen, wie den PASMC, bei PAH, konnten vergangene Studien zeigen, dass auch peripher gewonnene mononukleäre Blutzellen (PBMC), zu denen insbesondere Lymphozyten, Monozyten und natürliche Killerzellen gehören, bei Patienten mit PAH sich von den PBMC von gesunden Kontrollgruppen unterscheidet (Hoffmann, Wilhelm, Olschewski, & Kwapiszewska, 2016). So konnten genetische Modifikationen der PBMC von Patienten mit PAH nachgewiesen werden. Hierbei scheinen unter anderem Gene betroffen zu sein, deren

Genprodukt bei Entzündungsreaktionen, bei der Immunabwehr sowie bei der Stressantwort beteiligt sind (Bull et al., 2004; Hoffmann et al., 2016; Ulrich, Taraseviciene-Stewart, Huber, Speich, & Voelkel, 2008). So sind u.a. Gene für Chemokine und deren Rezeptoren bei PBMC von Patienten mit einer PAH überexprimiert nachgewiesen worden (Bull et al., 2004). Bei den bereits beschriebenen Prozessen des *Remodeling* kommt es unter anderem zur Proliferation von Endothelzellen (Thenappan, Ormiston, et al., 2018). Dazu passend wurden in PBMC von Patienten mit PAH eine erhöhte Expression des Genes, welches für den „*endothel-cell-growth-factor*“ codiert, nachgewiesen (Bull et al., 2004). Hinzukommend wurde eine gesteigerte Expression von Genen in PBMC von Patienten mit PAH nachgewiesen, welches für die Arachidonat-5-Lipoxygenase, sowie den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor codieren. Beides sind Proteine, die im Lungengewebe von Patienten mit schwerer PAH ebenfalls vermehrt nachgewiesen wurden (Bull et al., 2004).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in PBMC von PAH-Patienten die Expression bestimmter microRNAs herauf bzw. herabreguliert war und teilweise mit der Schwere bzw. dem Verlauf der Erkrankung korrelierten (Hoffmann et al., 2016). Bei den microRNAs, deren Expression herabreguliert ist, handelt es sich teilweise um Tumorsuppressoren, bei anderen, welche heraufreguliert sind um Onkogene (Saki, Abroun, Soleimani, Hajizamani, & Shahjahani, 2015). Eine entsprechende Herabregulation dieser microRNAs konnte bereits bei Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) vom T-Zell-Typ nachgewiesen werden. Eine, der bei den PBMC heraufregulierten microRNAs wurde in der Vergangenheit bereits mit einer B-Zell ALL assoziiert (Hoffmann et al., 2016; Saki et al., 2015). Neben den in der Lunge vorliegenden Immunzellen scheinen also auch peripher gewonnene Immunzellen bei der PAH mitbeteiligt zu sein bzw. Veränderungen zu unterliegen.

1.2.7 Systemische Manifestationen der PAH

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die PAH eine reine Erkrankung der Lunge wäre, neuere Erkenntnisse deuten aber darauf hin, dass die PAH auch systemische Manifestationen an mehreren Organsystemen hat (Nickel et al., 2020). Neben den bereits dargelegten Veränderungen denen PBMC von Patienten mit PAH unterliegen, konnten auch in anderen Zelltypen Veränderungen nachgewiesen werden. So wurden in den Mitochondrien der Skelettmuskulatur von Tieren mit PAH ebenfalls metabolische Veränderungen festgestellt wurden (Paulin & Michelakis, 2014). Hinzukommend gibt es

Anzeichen einer systemischen Myopathie bei Patienten mit einer PAH (Nickel et al., 2020). Auf eine systemische Komponente der PAH deutet außerdem die Tatsache hin, dass in peripheren systemischen Gefäßen von PAH Patienten ebenfalls eine endotheliale Dysfunktion nachgewiesen werden konnte (Nickel et al., 2020). Wie bereits dargelegt spielen inflammatorische Prozesse bei der PAH eine wichtige Rolle. Neben den ausführlich beschriebenen lokalen inflammatorischen Prozessen im Lungengewebe, ließ sich bei Patienten mit einer PAH auch eine erhöhte Konzentration zirkulierender Zytokine nachweisen (Nickel et al., 2020).

Es muss allerdings erwähnt werden, dass die Genese extrapulmonaler Manifestationen der PAH vermutlich meist multifaktoriell bedingt sind und es aktuell noch unklar ist, ob die extrapulmonalen Veränderungen kausale Ursache oder lediglich Symptom der PAH sind (Nickel et al., 2020; Paulin & Michelakis, 2014; Sutendra & Michelakis, 2014).

1.3 Ziel und Fragestellung der Studie

Sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen wurden charakteristische mitochondriale Veränderungen der Mitochondrien in unterschiedlichen pulmonal-vaskulären Zelltypen beschrieben. Außerdem spielen Immunzellen bei der Entstehung der PAH eine wichtige Rolle, und es sind verschiedene Veränderungen von PBMC bei PAH-Patienten bekannt. Aktuell ist unklar, ob PBMC von PAH-Patienten charakteristische mitochondriale Veränderungen, wie z.B. eine veränderte Respiration und mitochondriale Dynamik (Fission/Fusion) aufweisen, und ob diese eine ursächliche Rolle bei der Entstehung der PAH spielt oder sekundäre immunologische Veränderungen widerspiegelt. Da systemische Veränderungen im Zusammenhang mit der PAH diskutiert werden, die ggf. auf genetische Mutationen zurückzuführen sind, wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass PBMC von Patienten mit PAH eine verminderte mitochondriale Respiration, erhöhte Fission und erhöhten oxidativen Stress zeigen. Es wurden daher PBMC von Patienten mit IPAH oder HPAH auf ihre mitochondriale Funktion hin untersucht. Diese Subgruppen der PAH wurden ausgewählt, um Einflüsse zugrundeliegender Erkrankungen bei anderen PAH-Subtypen auszuschließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Respiration der Mitochondrien von PBMC von IPAH und HPAH-Patienten als primärer Zielparameter bestimmt. Weitere Zielparameter waren die Proteinexpression von Markern der mitochondrialen Morphologie (Fission und Fusion), sowie Plasmamarker des oxidativen Stresses.

Durch die Untersuchung der PBMC sollte ein tieferes Verständnis für den Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion in PBMC und der Entwicklung bzw. dem Verlauf einer PAH gewonnen werden. Dazu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Messung der Respiration der PBMC mittels „*high-resolution respirometry*“.
2. Bestimmung der mitochondrialen Dynamik durch Messung der Expression von Proteinen der mitochondrialen Fission und Fusion mittels Western Blots.
3. Messung von Markern des oxidativen Stresses durch „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) sowie entsprechenden Messkits.
4. Analyse der, aus den Patientenakten entnommenen, Blutwerten der Patienten im Kontext des Krankheitsverlaufes bzw. der Schwere der Erkrankung.

Es wurden die erhobenen Daten zwischen einer gesunden Kontrollgruppe und der IPAH/HPAH-Gruppe verglichen. Außerdem wurden die erhobenen Messdaten der IPAH/HPAH-Patienten in Bezug auf eine Korrelation mit den aus der Patientenakte entnommenen klinischen Parametern sowie den im RHK erhobenen PVR als Parameter für die Schwere der Erkrankung untersucht. Ebenfalls wurden die IPAH/HPAH Patienten bei denen eine bekannte Mutation im BMPR2, ENG oder ALK1 Gen vorlag mit den Patienten verglichen, bei denen nachweislich keine dieser Mutationen vorlag.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller, Ort
Abluftbank	<i>Heraeus</i> , Hanau, Deutschland
Analog Vortex Mixer	<i>VWR</i> TM , Radnor, USA
Blockthermostat	<i>HLC</i> , Bovenden, Deutschland
Dewar Isoliergefäß	<i>KGW-Isotherm</i> , Karlsruhe, Deutschland
Eismaschine	<i>Manitowoc Company</i> , Manitowoc, USA
Elektronische Pipette Pipetboy 2	<i>Integra Biosciences</i> , Biebertal, Deutschland
Elektrophorese Stromquelle Consort TM EV 231	<i>Consort</i> TM , Doncaster, Großbritannien
Elektrophoresekammer Mini - PROTEAN TM Tetra Cell	<i>Bio-Rad Laboratories</i> , Hercules, USA
Gefrierschrank (-20°C)	<i>Siemens</i> , München, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	<i>Heraeus</i> , Hanau, Deutschland
Gel Imager Chemidoc XRS+	<i>Bio-Rad Laboratories</i> , Hercules, USA
Inkubator (37°C)	<i>Heraeus</i> , Hanau, Deutschland
Kühlschrank (+4°C)	<i>Siemens</i> , München, Deutschland
Laborwasseraufbereitungsanlage	<i>Merck-Millipor</i> , Burlington, USA
Mikroplate Leser ELx 808	<i>BioTek Instruments, Inc.</i> , Winooski, USA
Mikroskop Axiovert S 100	<i>Zeiss</i> , Jena, Deutschland
Oroboros Oxygraph-2k	<i>Oroboros Instruments</i> , Innsbruck, Österreich
Pipetten (10µl; 100µl, 1000µl)	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland
Plattformschüttler Duomax 1030	<i>Heidolph Instruments</i> , Schwabach, Deutschland
Röntgenentwicklungsmaschine CP1000	<i>Agfa</i> , Mortsel, Belgien
Stickstoffbehälter Apollo®	<i>Cryotherm</i> , Kirchen, Deutschland
Trans-Blot® Turbo TM Transfer System	<i>Bio-Rad Laboratories</i> , Hercules, USA

Zählkammer Neubauer	<i>LO – Laboroptik Ltd, Lancing, Großbritannien</i>
Zentrifuge Mikro 185	<i>Hettich, Tuttlingen, Deutschland</i>
Zentrifuge Mikro 22 R	<i>Hettich, Tuttlingen, Deutschland</i>
Zentrifuge Rotina 46 R	<i>Hettich, Tuttlingen, Deutschland</i>

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
10µl Gastight Syringe	<i>Hamilton Company, Reno USA</i>
Amersham Hyperfilm™ ECL	<i>GE Healthcare, Chicago, USA</i>
EDTA Röhrchen	<i>Sarstedt AG & Co. KG, Sarstedt Deutschland</i>
Gel Saver II Pipettenspitzen (GSII054B)	<i>Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland</i>
Pipettenspitzen (10-100µl; 100-1000µl)	<i>Greiner Bio- One, Kremsmünster, Österreich</i>
Polyesterfolie, unsteril	<i>VWR™, Radnor, USA</i>
PVDF Membranen Western Blot (20180305)	<i>Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA</i>
Reaktionsgefäß (0,5ml; 1,5ml)	<i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
SepMate™ Röhrchen	<i>Stemcell-Technologies, Vancouver, Kanada</i>
Serologische Pipette Cellstar® 10ml	<i>Greiner Bio- One, Kremsmünster, Österreich</i>
Stripwell Microplate	<i>Costar, Kennebunk, USA</i>
Unsterile Einmalhandschuhe Vasco®	<i>B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland</i>
Zentrifugenröhren (15ml; 50ml)	<i>Greiner Bio- One, Kremsmünster, Österreich</i>

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Ort
2- Propanol (M33539)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim Deutschland
2-Mercapto Ethanol (M3148)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim Deutschland
2x Laemmli Sample Buffer (161-0747)	<i>Bio-Rad Laboratories</i> , Hercules, USA
Ammonium Persulfat (A3678)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim Deutschland
Antimycin A (A8674)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) (A7030)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim, Deutschland
Carbonylcyanide-p- trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) (C2920)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim Deutschland
Dithiothreitol (D-9779)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim Deutschland
Ethanol (70%; 99,9%)	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS) (F0804)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim Deutschland
FiColl-Paque™ Plus Endotoxin Tested (17144003)	<i>GE Healthcare Bio-Science</i> , Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich
Flüssiger Stickstoff	<i>Linde AG</i> , München, Deutschland
Glycin Pufferan® ≥99% (3908.2)	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland
Lysepuffer (9803)	<i>Cell Signaling Technology</i> , Danvers, USA
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (T9281)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim Deutschland
Natrium Chlorid ≥99,8% (31434)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim Deutschland
Olygomycin (75351)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim Deutschland

Penicillin-Streptomycin (10.000U/ml,10mg/ml) (P06-07100)	<i>PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland</i>
Phospat-gepufferte Salzlösung (PBS) (8537)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
Pierce™ ECL-Western Blotting Substrat (32106)	<i>ThermoFisher Scientific, Waltham, USA</i>
Pierce™ Phosphatase Inhibitor, mini- Tablets (88667)	<i>ThermoFisher Scientific, Waltham, USA</i>
Protease Inhibitor, cOmplete™ Tablets mini, EDTA free (04693159001)	<i>Roche, Basel, Schweiz</i>
Reagenzverdünnungskonzentrat (DY997)	<i>R&D Systems, Minneapolis, USA</i>
SDS, ultra-pure ≥99,5% (2326.2)	<i>Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (26623)	<i>ThermoFisher Scientific, Waltham, USA</i>
Stopplösung Schwefelsäure (2N H ₂ SO ₄) (X873.1)	<i>Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Trans-Blot® Turbo™ 5x Transfer Buffer (10026938)	<i>Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA</i>
TRIS Pufferan ® ≥99,9% (4855.2)	<i>Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Tween® 20 (P7949)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
Zellmedium RPMI-1640 (P04-16500)	<i>PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland</i>

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Chemikalien

2.1.4 Puffer und Medien

Puffer/Medium	Zusammensetzung
10x TBS (Tris-buffered saline)	24,2g Tris Pufferan ® 80.0g NaCl 1000ml Aqua dest. pH 7,6
Antimycin A (5mM)	5,4mg Antimycin A 2ml 99,9% Ethanol Lagerung des Stocks bei -20°C

Blockpuffer für Western Blot	5% BSA in TBS-T
FCCP (1mM)	1,27mg FCCP 5ml 99,9% Ethanol Lagerung des Stocks bei -20°C
Laufpuffer für Western Blot	15,1g Tris Pufferan® 94g Glycin 50ml 10% SDS 1000ml Aqua dest. Gebrauchslösung: 100ml Laufpuffer plus 400ml Aqua dest.
Lysepuffer	1µl Lysepuffer 9µl H ₂ O 1 Tablette Pierce™ Phosphatase Inhibitor 1 Tablette Protease Inhibitor
Oligomycin (5mM)	4mg Oligomycin 1ml 99,9% Ethanol Lagerung des Stocks bei -20°C
PBMC Medium	5g Penicillin-Streptomycin 25ml Fetal Bovine Serum In 500ml RPMI gelöst
<i>Tris-buffered saline with tween</i> ²⁰ (TBS-T)	100ml 10xTBS 900ml Aqua dest. 1ml TWEEN® 20
Transferpuffer für Western Blot	100ml 5x Transferbuffer 100ml 99,9 % Ethanol 300ml Aqua dest.
Wasch-Puffer für ELISA	0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien

2.1.5 Kits und Assays

Testkit	Bestellnummer	Hersteller, Ort
DC™ Protein Assay Kit I	5000-111	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

ELISA Kit Protein Carbonyl	ALX-850 312 KI01	<i>Enzo life science,</i> Farmingdale, USA
Glutathione Assay Kit	ab102530	<i>ABCam,</i> Cambridge, Vereinigtes Königreich
Superoxid Dismutase Assay Kit	706002	<i>Cayman Chemical,</i> Ann Arbor, USA
TBARS Assay Kit	10009055	<i>Cayman Chemical,</i> Ann Arbor, USA
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12%	161-0185	<i>Bio-Rad Laboratories,</i> Hercules, USA
Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit, LF PVDF	170-4274	<i>Bio-Rad Laboratories,</i> Hercules, USA

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Kits und Assays mit Angabe der Bestellnummer und des Herstellers

2.1.6 Verwendete Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung und Lösungsmittel	Sekundärantikörper gegen
Fis-1 (HPA017430)	<i>Sigma,</i> St. Louis, USA	1/1000 in 5% BSA	Anti-rabbit
Mitofusin-2 (9482)	<i>CellSignaling,</i> Danvers, USA	1/1000 in 5% BSA	Anti-rabbit
anti-rabbit (7074)	<i>CellSignaling,</i> Danvers, USA	1/2000 in 5% BSA	

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper

2.1.7 Software

Software	Entwickler, Ort
Datlab Version 7.2	<i>Oroboros,</i> Innsbruck, Österreich
GraphPad Prism 9.2.0	<i>GraphPad Software,</i> San Diego, USA
Mendeley Desktop Version 1.19	<i>Mendeley Ltd., Elsevier,</i> Amsterdam, Niederlande
ImageLab Version 4.0.1	<i>Bio-Rad Laboratories,</i> Hercules, USA
Microsoft Word für Mac Version 16.49	<i>Microsoft Corporation,</i> Redmond, USA
Microsoft Excel für Mac Version 16.49	<i>Microsoft Corporation,</i> Redmond, USA

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software

2.2 Methodik

2.2.1 Studiendesign

Im Zeitraum von Oktober 2018 bis April 2019 wurden alle Patienten der pneumologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, am Standort Gießen, welche die Kriterien für die Studie erfüllten (siehe Ein- und Ausschlusskriterien 2.2.2) gefragt, ob sie bereit wären, an der Studie teilzunehmen. Es erfolgte eine ausführliche mündliche und schriftliche Aufklärung der Patienten. Bei Einwilligung erfolgten die peripher-venösen Blutentnahmen der Patienten ausschließlich im Rahmen von routinemäßig notwendigen Blutentnahmen. Die Durchführung der Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Aktenzeichen: GI 17/18).

Diese Kohorte (Kohorte 1) wurde im weiteren Verlauf der Studie mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die Kontrollgruppe bestand aus gesunden Freiwilligen. Die zweite Kohorte (Kohorte 2) wurde in demselben Zeitraum aus Patienten, bei denen eine RHK-Untersuchung durchgeführt wurden, rekrutiert (Ein-/Ausschlusskriterien wie Kohorte 1). In dieser Kohorte wurden die hämodynamischen Parameter, die am selben Tag wie die mitochondrialen Parameter erhoben wurden, direkt mit den mitochondrialen Parametern verglichen.

2.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden einwilligungsfähige Patienten über 18 Jahren mit bekannter IPAH oder HPAH (Gruppe 1.1 und 1.2 nach Nizza-Klassifikation), um den Einfluss von Erkrankungen, die mit anderen PAH-Formen assoziiert sind, auszuschließen. Patienten mit klinischen oder laborchemischen Zeichen einer relevanten Entzündung [C-reaktives Protein (CRP) >25 mg/dl] wurden ausgeschlossen.

Es wurde eine Kontrollgruppe von gesunden Probanden angelegt, welche entsprechend des Alters und Geschlechts des Patientenkollektivs ausgewählt wurden. Probanden mit akuten Infekten der Atemwege oder anamnestisch bekannten chronischen Lungenerkrankungen (z.B. Asthma bronchiale) wurden ausgeschlossen.

2.2.3 Probengewinnung

Von jedem Studienteilnehmer wurden 2 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen mit je 7,5ml Blut verwendet. Bei den ambulanten Patienten (Kohorte 1) und den gesunden Probanden wurde das Blut peripher-venös abgenommen, bei den RHK-

Patienten (Kohorte 2) erfolgte eine zentral-venöse Blutentnahme. Die weitere Bearbeitung des Probenmaterials erfolgte direkt nach der Abnahme ohne weitere Verzögerungen.

2.2.4 Aufbereitung der Blutproben und Isolation der PBMC

In ein 50ml fassendes Röhrchen, welches speziell zur Isolation von PBMC konzipiert ist („Sepmate“), wurden 15ml des zur Isolation der PBMC verwendeten Mediums („FiColl“) gegeben. Die 15ml Blut wurden vorsichtig auf das „FiColl“ pipettiert, so dass sich das Blut als Spiegel oberhalb des „FiColls“ befand. Das „Sepmate“ wurde anschließend für 15 Minuten bei 12.000g zentrifugiert. Die Temperatur der Zentrifuge wurde auf 20°C eingestellt. Bei diesem Schritt muss darauf geachtet werden, dass sowohl die Beschleunigung als auch die Verzögerung der Zentrifuge möglichst niedrig zu wählen waren. Nach dem Zentrifugieren waren die PBMC und das Plasma von den restlichen Bestandteilen des Blutes separiert. Die Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des „SepMates“ nach der Zentrifugation.

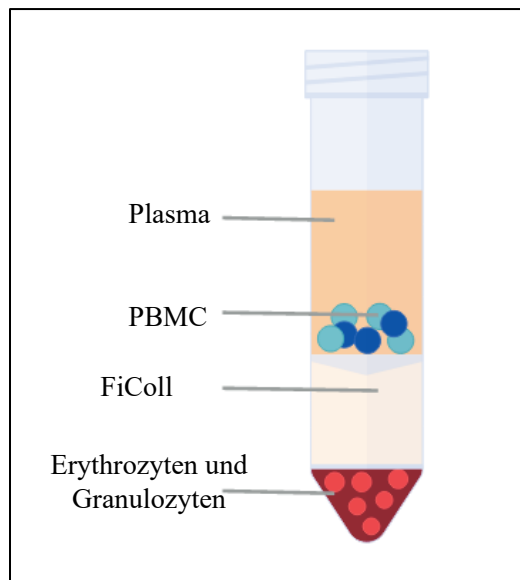


Abbildung 2: „Sepmate“ nach der Zentrifugation, Schematische Darstellung eines „Sepmates“ mit den jeweiligen Bestandteilen nach der ersten Zentrifugation; Abbildung mit freundlicher Genehmigung von „Stemcell™“, mit eigener Beschriftung.

Im Anschluss an die erste Zentrifugation wurden 3x je 1 ml des Plasmas abpipettiert und in drei 1,5ml fassende Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Diese wurden in flüssigem Stickstoff zur späteren weiteren Verarbeitung eingefroren.

Der restliche Überstand des „SepMates“ wurde nun in ein 50ml fassendes Zentrifugenröhrchen überführt. Zu dem Inhalt in dem Röhrchen wurde 20ml PBS gegeben und das Röhrchen für 10 Minuten bei 300g und 20°C zentrifugiert. Nach der

Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit den PBMC in 20ml PBS gelöst. Die Anzahl der PBMC in den 20ml PBS wurde nun bestimmt. Dafür wurden 10µl der Lösung in eine Zählkammer gegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die PBMC auf zwei je 15ml fassende Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. In eines der Zentrifugenröhrchen wurden 5 Millionen Zellen für die Bestimmung der Zellatmung gegeben. In das zweite Zentrifugenröhrchen wurden die restlichen Zellen für die Durchführung der Western Blots gegeben, hierfür wurden mindestens 8 Millionen Zellen benötigt.

Beide Zentrifugenröhrchen mit den PBMC wurden nun erneut mit ca. 5-10ml PBS aufgefüllt und bei 300g und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde erneut aus jedem der beiden Röhrchen der Überstand verworfen. Anschließend wurden die 5 Millionen PBMC für die Zellatmung in ein Reaktionsgefäß in 2,5ml PBMC-Medium, welches vorher auf 37°C aufgewärmt worden war, resuspendiert. Die PBMC wurden nun zur Messung der Zellatmung in den Oxygraphen gegeben (s. 2.2.5).

Die PBMC für den Western Blot wurden in 200µl Lysepuffer lysiert und in ein 1,5ml fassendes Reaktionsgefäß überführt. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde kurz mittels eines Vortex Mixers vermischt und anschließend für 5 Minuten auf Eis gegeben. Nach Ablauf der 5 Minuten auf Eis wurde das Reaktionsgefäß mit den Zellen für den Western Blot bei 14000g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Temperatur der Zentrifuge wurde auf 4°C eingestellt. Nach dem Zentrifugieren wurde 5µl des Überstandes in ein 0,5ml Reaktionsgefäß pipettiert und der restliche Überstand auf zwei 1,5ml fassende Reaktionsgefäße aufgeteilt. Der Inhalt des 0,5ml fassenden Reaktionsgefäßes wurde später zur Bestimmung des Proteingehalts vor der Durchführung der Western Blots verwendet (s. 2.2.8). Mit dem Inhalt der beiden 1,5ml fassenden Reaktionsgefäße wurden die Western Blots durchgeführt. Sowohl das Reaktionsgefäß mit dem verbleibenden Pellet als auch die anderen drei Gefäße wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren. Alle eingefrorenen Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.5 Messung der Zellatmung

Die Zellatmung wurde mittels eines Respirimeters (Oroboros Oxygraph-2k, *Oroboros-Instruments*) gemessen. Das Gerät hat zwei Messkammern, die jeweils 2ml Volumen fassen und durch Verschlusszylinder luftdicht verschlossen werden können. Die beiden Verschlusszylinder besitzen jeweils einen dünnen Kanal, durch dessen Lumen

Substanzen, wie bspw. in unserer Arbeit Inhibitoren oder Entkoppler der Atmungskette, in die Kammern während der Messung gegeben werden können. Außen an den Kammern befindet sich je ein kleines Fenster, durch das man während der Versuche in das Innere der Kammern blicken kann. An beiden Messkammern des Oxygraphen befinden sich polarographische Sauerstoffsensoren (sog. POS-Elektroden). Die POS-Elektroden bestehen aus einer Goldkathode sowie einer Silberanode, beide werden von einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung umgeben. Von der Messkammer sind die POS-Elektroden durch eine sauerstoffdurchlässige Membran getrennt. Durch eine angelegte Polarisationsspannung von 0.8 Volt erfolgt die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser an der Kathode, und es fließt ein Strom. Die gemessene Stromstärke ist proportional zum Sauerstoffpartialdruck in der Kammer (Gnaiger, 2011; Pesta, Gnaiger, Pesta, & Gnaiger, 2012).

Während der Versuche sorgte ein elektromagnetischer Rührer („*Stirrer*“) für eine homogene Vermischung der in der Kammer befindlichen Substanzen, der Messprobe und des Sauerstoffs.

Die Daten wurden mit der Software *Datlab* dargestellt (Vgl. Abbildung 7): Die blaue Kurve stellt den Sauerstoffgehalt über die Zeit in der Kammer dar, die rote Kurve hingegen zeigt die Änderung des Sauerstoffgehalts in der Kammer pro Zeiteinheit (bzw. die 1. Ableitung der Sauerstoffkonzentrationskurve) und somit den Sauerstoffverbrauch durch die Zellen. Dieser kann auf die Anzahl der Zellen bezogen werden und wurde als Sauerstoffverbrauch pro Million Zellen angezeigt .

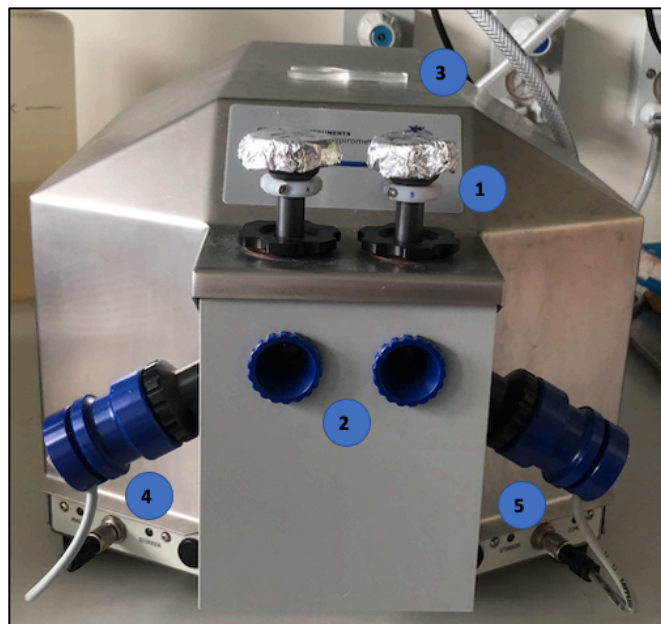


Abbildung 3: Oroboros Oxygraph (Eigene Aufnahme)

(1) Verschlusszylinder und Zugang zu Kammer A und B, (2) Fenster zu Kammer A und B, (3) Abstandshalter zur Raumluftkalibrierung, (4) POS- Messelektrode Kammer A, (5) POS- Messelektrode Kammer B

Reinigung des Oxygraphen

Vor und nach jeder Nutzung des Oxygraphen wurden sowohl die Kammern als auch die Abstandszylinder gereinigt. Dafür wurden Abstandszylinder und Kammern dreimal mit destilliertem Wasser, anschließend dreimal mit 70%igem Alkohol und dann erneut dreimal mit destilliertem Wasser gespült.

Kalibrierung des Oxygraphen

Bevor mit der eigentlichen Messung der Zellatmung begonnen werden konnte, wurde jeden Tag eine Raumluftkalibrierung des Oxygraphen vorgenommen. Zur Kalibrierung wurde auf 37°C vorgewärmtes Medium verwendet. Von dem erwärmten Medium wurden 2,5ml in die zuvor gereinigte Kammer gegeben und in dem Programm *Datlab* die Kalibrierung gestartet. Die Zellkonzentration wurde auf 0 Zellen gestellt und die Temperatur innerhalb der beiden Kammern auf 37°C. Zu Beginn der Kalibrierung wurde der Verschlusszylinder vollständig in die Kammer gesetzt und der Überstand abgesaugt. Nun wurde der Stopfen unter Zuhilfenahme eines Abstandshalter ein Stück aus der Kammer gezogen, so dass eine konusförmige Luftblase in der Kammer zu erkennen war. Nun wurde gewartet, bis sich die Sauerstoffkonzentration im Medium in der Messkammer mit der Sauerstoffkonzentration in der Luftblase äquilibriert hatte. Dieser Bereich der Sauerstoffkonzentrationskurve wurde in der Software markiert. Die Sauerstoffkonzentration wurde durch das Gerät über die Messung des Luftdruckes und des Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff im Medium bestimmt und zur Kalibrierung verwendet.

Messung der Zellatmung

In die zuvor gereinigten und kalibrierten Messkammern des Oxygraphen wurden nun je 5 Millionen in 2,5ml PBS gelösten PBMC gegeben. Die Verschlusszylinder der Messkammern wurden nun, anders als bei der Kalibrierung, vollständig in die Kammer gedrückt, so dass diese luftdicht verschlossen, und ohne sichtbare Luftblasen sein sollten. Um die Messung der Zellatmung zu beginnen, wurde das Programm *Datlab* gestartet. Die Temperatur innerhalb der Kammern wurde auf 37° gestellt, die Frequenz des Rührers wurde auf 750 Umdrehungen pro Minute eingestellt. Nachdem sich die Kurve des Sauerstoffverbrauchs unter basalen Bedingungen („Ruheatmung“) auf einem stabilen

Niveau eingependelt hatte, wurde ein möglichst repräsentativer Bereich der Kurve zur Bestimmung der Ruheatmung (= „endogene Atmung“) markiert (Vgl. Abbildung 4).

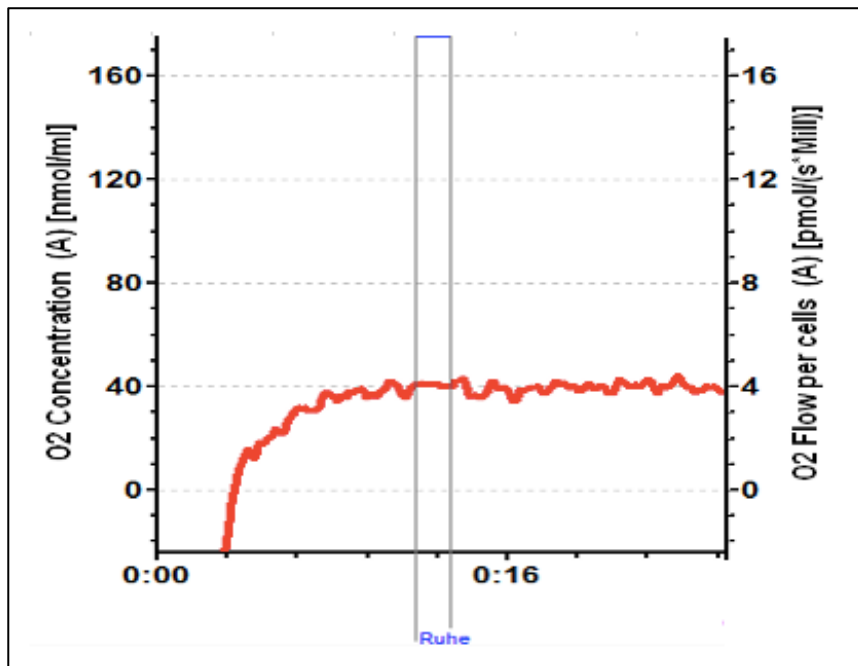


Abbildung 4: Messung der Ruheatmung (Computersoftware *Datlab*)
 Exemplarische Darstellung der Messung der Ruheatmung; rechte Skala: Sauerstoffverbrauch pro Millionen Zellen (rote Messkurve); linke Skala: Sauerstoffkonzentration in der Messkammer (blaue Messkurve, hier nicht dargestellt); O₂: Sauerstoff; nmol: Nanomol; ml: Milliliter; pmol: Pikomol; s: Sekunde; Milli: Millionen, Ruhe: markierter Bereich zur Bestimmung der Ruheatmung.

Anschließend wurde mit einer 10µl Spritze („*Hamilton Company*“) 1µl Oligomycin in die Messkammern gegeben (Endkonzentration 2,5µM). Oligomycin bindet an die F₀-Einheit der ATP-Synthase in der Atmungskette und hemmt so den Protonenfluss durch die innere Membran. Durch die Blockade des Protonenflusses kann der elektrochemische Gradient nicht mehr über die ATP-Synthase abgebaut werden und es verlangsamt sich der Elektronenfluss der Komplexe I-IV und der Sauerstoffverbrauch der Zelle sinkt (Hearne, Chen, Monarchino, & Wiseman, 2020; Linnemann & Kühl, 2003). Ein Anteil der Protonen gelangt allerdings auch unabhängig von der ATP-Synthase zurück in die Matrix der Mitochondrien („Protonen-Leak“). Die Respiration die notwendig ist, um den Protonengradient aufgrund des *Leaks* auszugleichen wird *Leak-Respiration* genannt (Vgl. Abbildung 5). Die gemessene *Leak-Respiration* nach Gabe von Oligomycin ist somit ein indirektes Maß für den „Protonen-Leak“ (Divakaruni & Brand, 2011).

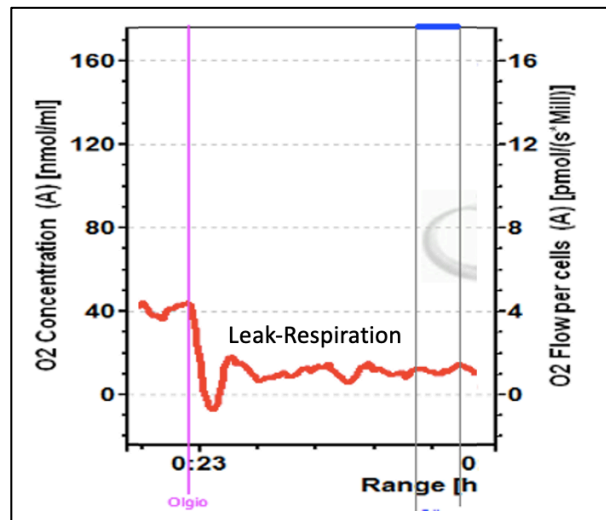


Abbildung 5: Messung der *Leak-Respiration* nach Gabe von Oligomycin (Computersoftware *Datlab*)
 Exemplarische Darstellung der Messung der *Leak-Respiration*; rechte Skala: Sauerstoffverbrauch pro Millionen Zellen (rote Messkurve); linke Skala: Sauerstoffkonzentration in der Messkammer (blaue Messkurve, hier nicht dargestellt); O₂: Sauerstoff, nmol: Nanomol; ml: Milliliter; pmol: Pikomol; s: Sekunde; Mill: Millionen

Als nächstes wurde mit der Titration von je 1 µl FCCP (Carbonylcyanid-4-trifluormethoxyphenylhydrazon) begonnen. Ein Titrationsschritt hat hier eine Konzentrationssteigerung von 0,5µM FCCP in der Kammer zur Folge. FCCP ist ein pharmakologischer Entkoppler der Atmungskette. Mitochondriale Entkoppler erhöhen die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran für Protonen und erlauben somit eine Rückdiffusion von Protonen in die Mitochondrienmatrix unabhängig von der ATP-Synthase. Aufgrund des Wegfalls des Protonengradienten können die einzelnen Komplexe der Atmungskette ihre maximal möglichen Aktivität erreichen, allerdings fällt dadurch der Antrieb der ATP-Synthase weg (siehe 1.2.2) (Kenwood et al., 2014).

Sobald die Messkurve ihr Maximum erreicht hatte, wurde erneut 1 µl FCCP hinzugegeben. Eine Wiederholung dieses Schrittes erfolgte so lange, bis keine weitere Steigerung der Zellatmung erreicht wurden. Es konnte nun die maximale Respiration bestimmt werden und der entsprechende Bereich markiert werden (Vgl. Abbildung 6).

Messkurve des Sauerstoffverbrauchs (gepunktete Linie) in Zusammenhang mit den in diesem Abschnitt erläuterten, der Messkurve zugrundeliegenden Prozessen (Ruheatmung, *Leak-Respiration*, ATP-abhängige Respiration, maximale Respiration sowie nicht mitochondrialen Respiration).

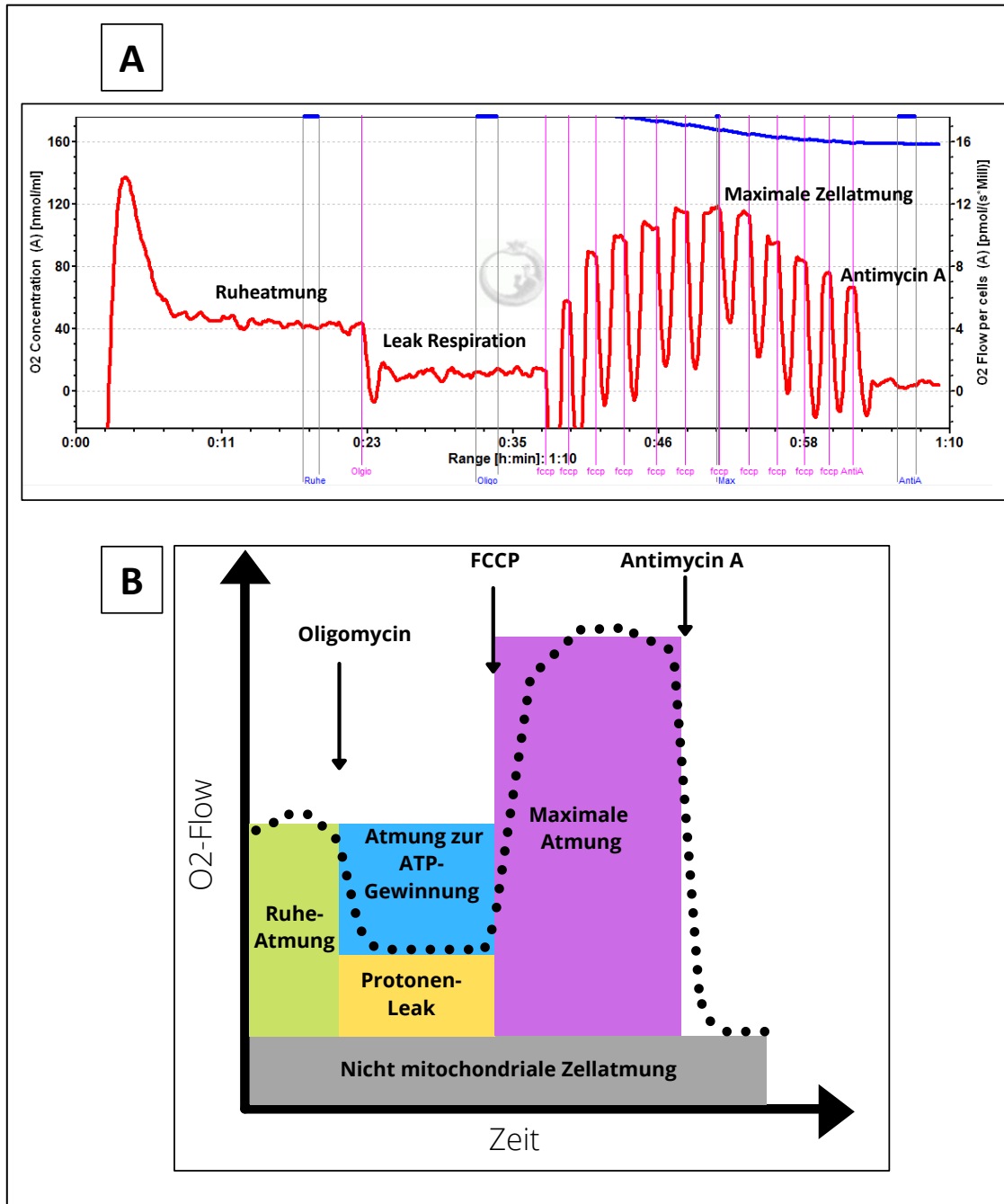


Abbildung 7: Darstellung der vollständigen Messung der Zellatmung
 (A) Vollständige Messung der Zellatmung; die rot dargestellte Messkurve gibt den Sauerstoffverbrauch („O₂-Flow“) pro Millionen Zellen an; die blaue Kurve gibt die Sauerstoff-Konzentration in der Messkammer an; X-Achse: Zeit in Stunden, senkrechte rosa Markierungen: Gabe von Oligomycin, FCCP bzw. Antimycin A FCCP: Carbonylcyanid-4-trifluormethoxyphenylhydrazon
 (B) Schematische Darstellung der Messung der Zellatmung, mit Darstellung den jeweiligen, der Messung zugrunde liegenden Prozessen, eigene Grafik, angelehnt an Rose et al.(2018). FCCP: Carbonylcyanid-4-trifluormethoxyphenylhydrazon,

2.2.6 „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Die Quantifizierung von Carbonylproteinen aus dem Plasma der Studienteilnehmer erfolgte anhand eines entsprechenden ELISA Kits. Die Durchführung erfolgte gemäß des Protokolls des Herstellers (No, 2018).

Der ELISA ist ein Verfahren, zur Detektion von Antigenen. Es gibt hierbei zwei unterschiedliche Vorgehensweisen, bei beiden Verfahren wird eine Mikrotiterplatte mit kleinen Kavitäten („Wells“) verwendet. Entweder wird das zu detektierende Antigen direkt in die Kavitäten gegeben, oder es wird zunächst ein Antikörper („*Capture Antibody*“) in die Kavitäten gegeben, an den in einem zweiten Schritt das zu bestimmende Antigen binden soll. Nach Hinzugabe der Probe mit dem zu bestimmenden Antigen in die Kavitäten, in denen sich bereits der „*Capture Antibody*“ befand, erfolgt eine Inkubation, für 45 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Nach der Inkubation wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der an die Antigene bindet, so dass ein „Antikörper-Antigen-Antikörper Sandwich“ („Sandwich-ELISA“) entsteht (Aydin, 2015). Wir verwendeten das „Sandwich“-Verfahren. Eine Quantifizierung der Anzahl der gebundenen Antigene kann nun zum Beispiel durch Hinzugabe eines dritten Antikörpers, welcher an den zweiten bindet, und eine enzymatische Funktion innehat, durchgeführt werden. Die enzymatische Funktion des dritten Antikörpers katalysiert eine Reaktion, bei der ein Farbstoff entsteht. Die Absorption des Farbstoffes wird vorwiegend bei einer Wellenlänge im Bereich von 400-600nm gemessen (Aydin, 2015).

2.2.7 Weitere Proteinbestimmungen und Quantifizierung von TBARS

TBARS

Die Bestimmung der Konzentration von TBARS aus dem Plasma, erfolgte mit Cayman's TBARS Assay Kit. Bei der Durchführung der Quantifizierung reagiert Malondialdehyde (MDA) zusammen mit den zu bestimmenden TBARS, bei Temperaturen von 90-100°C, zu einem Addukt, welches einen rosafarbenen Farbton hat. Zur Quantifizierung wird die Absorption der Farbe des Adduktes im Anschluss bei 540nm gemessen. Die Durchführung erfolgte gemäß des Protokolls des Herstellers (Cayman Chemical, 2017).

Superoxid-Dismutase-Aktivität (SOD)

Die Bestimmung der Aktivität von SOD in dem Plasma erfolgte mit Cayman's Superoxide-Dismutase Assay Kit. Das Kit verwendet Tetrazolium-Salz, um Superoxid-Radikale zu detektieren. Die Radikale werden durch eine Xanthinoxidase aus Sauerstoff

erzeugt. Das Tetrazolium-Salz reagiert mit den Superoxid-Radikalen zu dem violetten Formazan, welches fotometrisch bei 440-460nm gemessen wird. Die SOD wandelt Superoxid-Radikale zu H₂O₂ und Sauerstoff um. Damit vermindert die SOD das Substrat für die Reaktion des Tetrazolium-Salzes zu einem Formazan und eine Abnahme des fotometrisch gemessenen Signals korreliert mit der Aktivität der SOD. Die Durchführung erfolgte gemäß des Protokolls des Herstellers (Cayman Chemical, 2018).

Glutathion-Peroxidase-Aktivität

Die Quantifizierung der Glutathion-Peroxidase in dem Plasma erfolgte mit Hilfe des ABCam's Glutathione Peroxidase Assay Kits. Bei dem verwendeten Verfahren oxidiert die Glutathion-Peroxidase Glutathion zu Glutathiondisulfid. Eine Glutathion-Reduktase reduziert nun unter Verbrauch von NADPH Glutathiondisulfid wieder zu Glutathion. Der Abfall von NADPH wurde bei 340nm gemessen und ist proportional zur Aktivität der Glutathion-Peroxidase. Die Durchführung ist gemäß des Protokolls des Herstellers erfolgt (ABCAM, 2020).

2.2.8 Western Blot

Zur Vorbereitung der Western Blots wurde zunächst der Proteingehalt der im Abschnitt 2.5 gewonnenen Proben bestimmt. Dies erfolgte anhand des Protein Assay Kit von BioRad. Die Durchführung ist gemäß des Protokolls des Herstellers erfolgt (Bio-Rad Laboratories, 2013). Das Assay beruht auf einer Reaktion der Proteine mit Kupfer, bei der das im Substrat enthaltene Folin, unter Bildung eines blauen Farbstoffes, reduziert wird. Der blaue Farbstoff hat sein Absorptionsmaximum bei 750nm. Die Messung der Absorption erfolgte an einem ELISA-Reader.

Die Herstellung der Gele erfolgte anhand des TGX Stain-Free™ Fast Cast™ Acrylamid Kits von BioRad. Entsprechend den Herstellerangaben wurde den Gelen N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TMED) zum Polymerisieren sowie 10% Ammonium-Persulfat-Lösung als Katalysator hinzugegeben. Das Gießen der Gele erfolgte in dem zuvor zusammengebauten Mini-Protean-Tetra-System von BioRad. Als erstes wurde das unpolymerisierte Trenngel in die Kammer gegossen. Anschließend wurde auf das Trenngel eine Schicht 10%iges 2-Propanol gegeben. Nachdem das Trenngel ca. eine Stunde bei RT ausgehärtet war, wurde die Schicht mit dem 2-Propanol wieder abgekippt und das unpolymerisierte Sammelgel in die Gelkammer gegeben. Um die Taschen für die späteren Proben im Sammelgel zu formen, wurde ein entsprechender Kamm eingesetzt. Das Aushärten erfolgte für 30 Minuten bei RT, im Anschluss konnte der Kamm entfernt

werden. Das fertig vorbereitete Gel wurde nun in die Elektrophorese-Kammer eingespannt. In die Kammer wurde der 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnte Laufpuffer gegeben.

Während des Aushärtens des Gels konnten die Proben weiter vorbereitet werden. Es wurde dafür, entsprechend der Proteinkonzentration, die Menge an Probenmaterial in ein Reaktionsgefäß gegeben, die genau 25µg an Protein enthielt. Anschließend wurden die Proben 1:1 mit Laemmli-Lysepuffer versetzt. Der Laemmli-Lysepuffer wurde vorab mit Dithiothreitol (DTT) nach Angabe des Herstellers angesetzt. Nach Hinzugabe des Lysepuffers wurde die Probe für 10 Minuten bei 95° im Heizblock erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert. Die Proben wurden danach in die Kammern des Gels gegeben. Zur späteren Identifikation der einzelnen Banden entsprechend ihrem Molekulargewicht wurde in die erste Kammer der sog. „Rainbow Marker“ eingefügt. Die Elektrophorese konnte anschließend bei 300 Volt und 100 Milliampere gestartet werden. Das Programm für die Elektrophorese dauerte 30 Minuten.

Während der 30 Minuten konnte damit begonnen werden, die Membran für das Blotting vorzubereiten. Hierzu wurde die Membran für einige Sekunden in 99.9% Ethanol geschwenkt, um anschließend zusammen mit dem beiliegenden Filterpapier im Transferpuffer geschwenkt zu werden.

Nach Ablauf des Elektrophorese-Programms erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf die aktivierte Membran. Hierfür wurde das Trans-Blot®-Turbo™-Blotting System von BioRad verwendet. Entsprechend der Angaben des Herstellers wurde die Kassette mit dem Gel und der vorbereiteten Membran sowie dem Filterpapier bestückt. Es muss dabei darauf geachtet werden, dass keine Lufteinschlüsse zwischen dem Gel und der Membran vorhanden sind. Es wurde nun das Programm *Turbo*, 7 Minuten bei 13 Ampere und 25 Volt, gestartet.

Für den Nachweis der Proteine auf den Membranen wurden immunologische Verfahren angewendet. Zunächst wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit dem Blockpuffer geblockt. Im Anschluss wurde die Membran mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Eine Auflistung der verwendeten primären Antikörper, sowie die entsprechende Konzentration und das verwendete Lösungsmittel ist in Tabelle 9 angegeben. Nach einer Stunde wurde die Membran 3x für 5-10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Es erfolgte die Hinzugabe des sekundären Antikörpers (siehe Tabelle 9) und eine anschließende Inkubation für eine Stunde bei RT. Nachdem erneut dreimal mit TBS-T gewaschen wurde, erfolgte das Verteilen der Pierce™-ECL-Lösung aus dem

entsprechenden Kit auf der Membran. Es erfolgten 60 Sekunden Inkubation des ECLs bei RT. Nachdem das überschüssige ECL entfernt wurde, wurde die Membran in eine Fotokassette gegeben. In einer Dunkelkammer wurden mit einer Röntgenentwicklungsmaschine die Banden auf einen *Amersham Hyperfilm* übertragen. Nach dem Scannen der Filme konnte die Auswertung in dem Programm *ImageLab* erfolgen. Hierbei wurden zunächst die Grenzen der jeweiligen Banden markiert, anschließend bestimmte das Programm die Intensität der einzelnen Banden. Zur weiteren Auswertung wurden die Messwerte der einzelnen Banden sowohl ins Verhältnis zur entsprechenden Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sowie einer internen Kontrolle gesetzt.

Zur graphischen Darstellung wurden, nach Abschluss der statistischen Auswertung dieser Studie, selektiv von repräsentativen Patienten erneut Western Blots erstellt. Die erneut durchgeführten Western Blots wurden in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

2.2.9 Laborwerte

Bei allen Patienten der Kohorte 1 und Kohorte 2 wurden die Laborparameter in Rahmen von Routinekontrollen im Zentrallabor des UKGM am Standort Gießens bestimmt. Für diese Studie wurden die zuletzt erhobenen Laborwerte aus der Patientenakte ausgewertet. Folgende Laborparameter wurden im Rahmen der Studie in die statistische Auswertung mit einbezogen:

- Hämoglobin
- Leukozyten
- Thrombozyten
- Alanin-Aminotransferase (ALT)
- Aspartat-Aminotransferase (AST)
- γ -Glutamyltransferasen (GGT)
- Kreatinin
- Harnstoff
- Harnsäure
- BNP
- CRP

2.2.10 Rechtsherzkatheter

Bei 15 Patienten aus der Kohorte 1, sowie bei 15 Patienten aus der Kohorte 2 lag zum Zeitpunkt der Untersuchung ein Befund aus dem RHK vor. Es wurden folgende Parameter erhoben und in der statistischen Auswertung berücksichtigt:

- mPAP
- Systolischer pulmonal-arterieller Druck (sPAP)
- Herzindex (CI)
- PVR
- „tricuspid annular plane systolic excursion“ (TAPSE)

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit der Software *Prism 9* (Version 9.2.0, *GraphPad Software*).

Aus den Messwerten der einzelnen Gruppen wurden jeweils die Mittelwerte, die Mediane sowie die Standardfehler bestimmt. Die Testung auf Normalverteilung der Daten erfolgte anhand von Q-Q-Plots. Es erfolgte eine Dichotomisierung der Daten anhand des Medians des PVRs. Die respiratorischen Werte der dichotomisierten Daten der Patientengruppen und Kontrollgruppe wurden mittels Two-Way ANOVA verglichen. Zur Korrektur bei multiplem Testen wurde Šidák's Methode verwendet. Die statistische Untersuchung auf signifikante Unterschiede der weiteren erhobenen Daten, abgesehen von den respiratorischen Werten, ist durch die Durchführung des ungepaarten T-Tests erfolgt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgesetzt.

Lag eine ungerade Anzahl von Patienten innerhalb eines Kollektives vor, wurde der Patient, dessen PVR den Median bildete, in der dichotomen Betrachtung ausgeschlossen. Zur Korrelation des PVRs und der jeweiligen Messgröße wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Die Normalverteilung wurde mittels Q-Q-Plot-Analyse geprüft.

Die graphische Darstellung erfolgte anhand von Box-und-Whiskers Blot, welche den Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile darstellen.

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Studienteilnehmer

Die folgende Tabelle gibt die Charakteristika aller Studienteilnehmer wieder. Insgesamt konnten im Studienzeitraum 16 Patienten in die Kohorte 1 und 15 Patienten in die Kohorte 2 eingeschlossen werden. Bei einer Patientin aus der Kohorte 1 lag keine Untersuchung im RHK vor. Die dargestellten Messwerte aus dem RHK (mPAP, PVR, CI, TAPSE und sPAP) sind daher die der verbleibenden 15 Patienten aus der Kohorte 1.

	Kontrolle		Kohorte 1		Kohorte 2	
	<i>Mittelwert</i>	<i>SEM</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>SEM</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>SEM</i>
Anzahl (n)	9		16		15	
Alter <i>(in Jahren)</i>	45,89	5,84	57,06	2,79	60,60	3,76
Geschlecht <i>(weiblich/männlich)</i>	5 4		11 5		7 8	
mPAP <i>(mmHg)</i>			41,13	3,27	45,60	2,99
PVR <i>(dyn/s/cm⁻⁵)</i>			522,53	61,72	600,13	62,76
CI <i>(l/min/m²)</i>			3,01	0,17	2,52	0,67
TAPSE <i>(mm)</i>			2,40	0,91	20,80	0,94
sPAP <i>(mmHg)</i>			56,73	6,83	74,73	4,24
Hb <i>(g/l)</i>			146,50	5,93	142,27	5,12
Thrombozyten <i>(giga/l)</i>			234,69	11,51	181,58	17,49
Leukozyten <i>(giga/l)</i>			7,66	0,70	7,63	0,58
ALT <i>(U/l)</i>			18,97	2,45	21,07	2,53
AST <i>(U/l)</i>			20,62	2,08	22,67	2,56
GGT			30,38	7,04	34,27	6,58

(U/l)						
Kreatinin (mg/dl)			1,08	0,12	1,04	0,08
Harnsäure (mg/dl)			43,50	8,13	6,81	4,30
CRP (mg/dl)			6,26	1,52	5,21	1,73
BNP (pg/ml)			72,81	20,56	128,80	28,16
PH-spezifische Medikation 1-fach			2		5	
PH-spezifische Medikation 2-fach			6		3	
PH-spezifische Medikation 3-fach			6		6	
Keine PH- spezifische Medikation			2		1	

Tabelle 11: Charakteristika des Patientenkollektivs

mPAP: mittlerer pulmonal-arterieller Druck, PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, CI: Herzindex, TAPSE: *tricuspid annular plane systolic excursion*, sPAP: systolischer pulmonal-arterieller Druck, Hb: Hämoglobin, ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, GGT: γ -Glutamyltransferase, CRP: C-reaktives Protein, BNP: B-natriuretisches Peptid; PH-spezifische Medikation: Anzahl unterschiedlicher, zum Studienzeitpunkt, vom Patienten eingenommener PH-spezifischer Medikamente (s.1.1.6); Angabe des Mittelwertes sowie des SEM (Standardfehler des Mittelwertes). In Kohorte 1 lag bei drei Patienten der CRP <0,5mg/dl, bei einem die ALT bei <9U/l und bei einem die GGT bei <6 U/l. In Kohorte 2 lag bei 3 Patienten der CRP bei <0.5mg/dl. Für die statistische Auswertung wurde jeweils die Hälfte des Wertes der Nachweisgrenze verwendet.

3.2 Mitochondriale Respiration der PBMC

Die Zellatmung konnte bei insgesamt 30 Patienten mit PAH, gemessen werden, davon bei 15 Patienten in Kohorte 1 und bei 15 Patienten in Kohorte 2. Bei einem Patienten aus der Kohorte 1 war die Durchführung der Messung der Zellatmung aus technischen Gründen nicht möglich.

	Ambulanz PAH		RHK PAH		Kontrolle Ambulanz	
	<i>pmol O₂/s/10⁶ Zellen</i>		<i>pmol O₂/s/10⁶ Zellen</i>		<i>pmol O₂/s/10⁶ Zellen</i>	
	<i>Mittelwert</i>	<i>SEM</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>SEM</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>SEM</i>
n	15		15		8	
Ruhe korr.	3,26	0,44	2,36	0,28	3,46	0,34
<i>Leak</i> korr.	0,71	0,17	0,41	0,10	0,75	0,18
Max korr.	8,29	0,95	6,51	0,70	8,34	1,10
Antimycin A	0,91	0,23	1,09	0,44	0,69	0,2

Tabelle 12: Darstellung der Messwerte der mitochondrialen Respiration nach Korrektur für nicht-mitochondriale Atmung

Einheit: Picoomol pro Sekunde pro 10⁶ Zellen, PAH: pulmonal-arterielle Hypertonie, RHK: Rechtsherzkatheter, O₂: Sauerstoff; SEM: Standardfehler, Ruhe korr.: Ruheatmung, PAH: pulmonal-arterielle Hypertonie, *Leak* korr.: *Leak*-Respiration nach Gabe von Oligomycin, Max korr.: maximale Respiration nach Gabe von FCCP.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und dazugehöriger Kohorte 1. Die Werte der Kohorte 2 wurden nicht mit der Kontrollgruppe verglichen, da diesen unterschiedliche Abnahmeorte der Blutprobe zugrunde lagen (peripher venös vs. zentral-venös, siehe Methoden). Die Kohorte 2 diente zur direkten Korrelation der Zellatmung mit hämodynamischen Parametern.

Respiration aus Kohorte 1, 2 und gesunder Kontrollgruppe

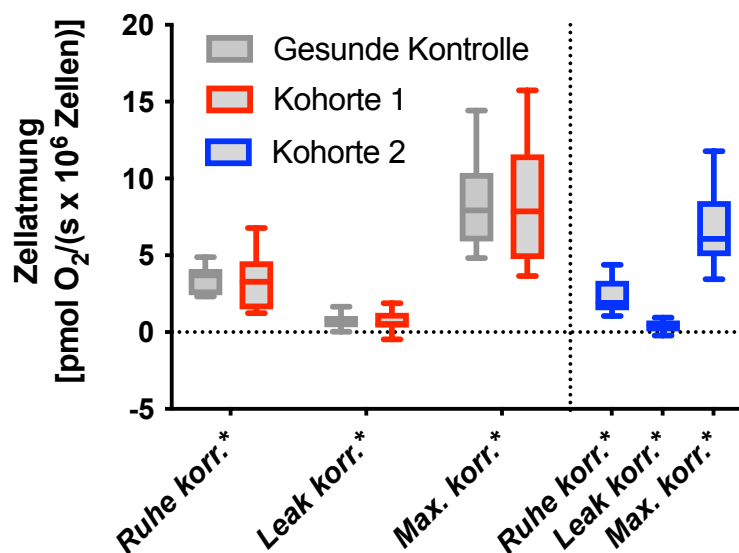


Abbildung 8: Mitochondriale Respiration der Kontrollgruppe, sowie PAH-Kohorte 1 und 2. Darstellung der Respiration als Sauerstoffdurchfluss pro Millionen Zellen in Picomol pro Sekunde. Dargestellt ist die Ruheatmung, die *Leak*-Respiration nach Gabe von Oligomycin, sowie die maximale Respiration nach Gabe von FCCP. Der Vollständigkeit halber wurde ebenfalls die Respiration der Kohorte 2 dargestellt.

RHK: Rechtsherzkatheter, Ruhe kor.: Ruheatmung, *Leak* kor.: *Leak*-Respiration, Max kor.: maximale Respiration. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile; Gesunde Kontrolle: n = 8; Kohorte 1: n = 15; Kohorte 2: n = 15. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Respiration mittels Two-Way ANOVA zwischen der Kontrollgruppe und Kohorte 1 festgestellt werden.

3.2.1 Ergebnisse der Zellatmung der Kohorte 1 nach Stratifikation nach PVR

Um zu untersuchen, ob sich Patienten der Kohorte 1 mit hohem bzw. niedrigem PVR in der Zellatmung unterschieden, wurden die Patienten in zwei Gruppen gemäß ihrem PVR unter- oder oberhalb des Medians der gesamten Gruppe geteilt. Der Median des PVRs der Kohorte 1 lag bei $532 \text{ dyn/s/cm}^{-5}$. Es zeigte sich, dass zwischen der Gruppe mit einem $\text{PVR} < \text{des Medians}$ der gesamten Gruppe und der Gruppe mit einem $\text{PVR} > \text{des Medians}$ der gesamten Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den gemessenen Werten der Ruheatmung nachweisbar waren. Zwischen den Messwerten der *Leak*-Respiration nach Gabe von Oligomycin sowie der maximalen Respiration nach Gabe von FCCP lag ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor. Abbildung 9 zeigt die Messwerte der Respiration der Kohorte 1 aufgeteilt in eine Gruppe mit einem $\text{PVR} < \text{des Medians}$ und einer Gruppe $> \text{des Medians}$. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden außerdem die Messwerte der gesunden Kontrollgruppe sowie der Gesamtkohorte mit dargestellt, wie sie bereits in Abbildung 8 präsentiert werden.

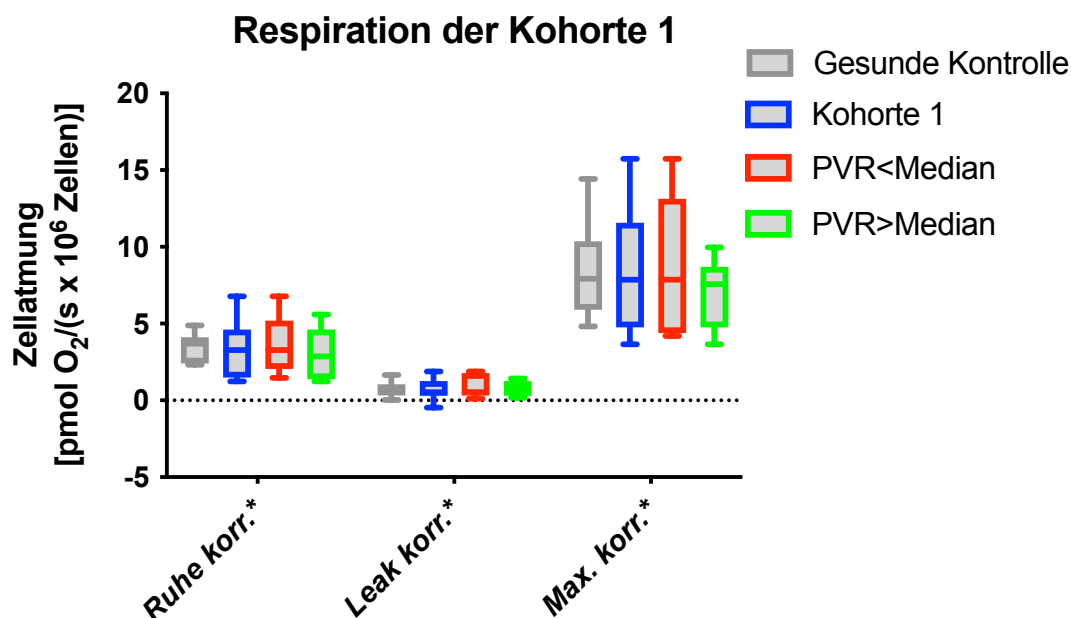


Abbildung 9: Mitochondriale Atmung aus der Kohorte 1 stratifiziert nach dem PVR
Darstellung der Zellatmung, als Sauerstoffdurchfluss pro Millionen Zellen in Picomol pro Sekunde. Dargestellt ist die Ruheatmung, die *Leak*-Respiration nach Gabe von Oligomycin, sowie die maximale Respiration nach Gabe von FCCP. Zur Übersicht ist außerdem die gemessene Respiration der gesunden Kontrolle sowie der vollständigen Kohorte 1 dargestellt, dies sind dieselben Daten wie in Abb. 9. Gesunde Kontrolle: n = 8; Kohorte 1: n = 15; PVR<Median: n = 7; PVR>Median: n = 7; Ruhe kor.: Ruheatmung,

Leak korr.: *Leak*-Respiration, Max korr.: Maximale Respiration, PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median 532 dyn/s/cm⁻⁵. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Respiration zwischen der Gruppe mit niedrigem PVR und der Gruppe mit hohem PVR mittels Two-Way ANOVA festgestellt werden.

Verhältnisse der Respirationsparameter der Kohorte 1

Für eine weitere, genauere und zellzahlunabhängige Analyse der mitochondrialen Eigenschaften, wurden die Werte der Respiration in verschiedene Verhältnisse zueinander gesetzt und somit sog. „*Respiratory Ratios*“ gebildet (Abbildung 10). Es wurde der Anteil der Ruheatmung an der maximalen Respiration bestimmt (Ruhe/Max), als Maß für die Aktivierung der Mitochondrien bzw. den aktuellen ATP-Bedarf der Zelle. Außerdem wurde der Anteil der *Leak*-Respiration an der maximalen Respiration bestimmt (*Leak*/Max), als Maß für die Entkopplung des Sauerstoffverbrauches von der ATP-Produktion des Mitochondriums. Die Differenz zwischen der Ruheatmung und des Protonen-*Leaks* im Verhältnis zur maximalen Respiration wurde ebenfalls bestimmt [(Ruhe-*Leak*)/Max]. Dieses Verhältnis gibt den Anteil der ATP-abhängigen Atmung an der maximalen Respiration wieder.

Abbildung 10 zeigt, dass zwischen der Kohorte 1 und der gesunden Kontrolle in keinem der drei Verhältnisse signifikante Unterschiede der gemessenen Respiration nachgewiesen werden konnten.

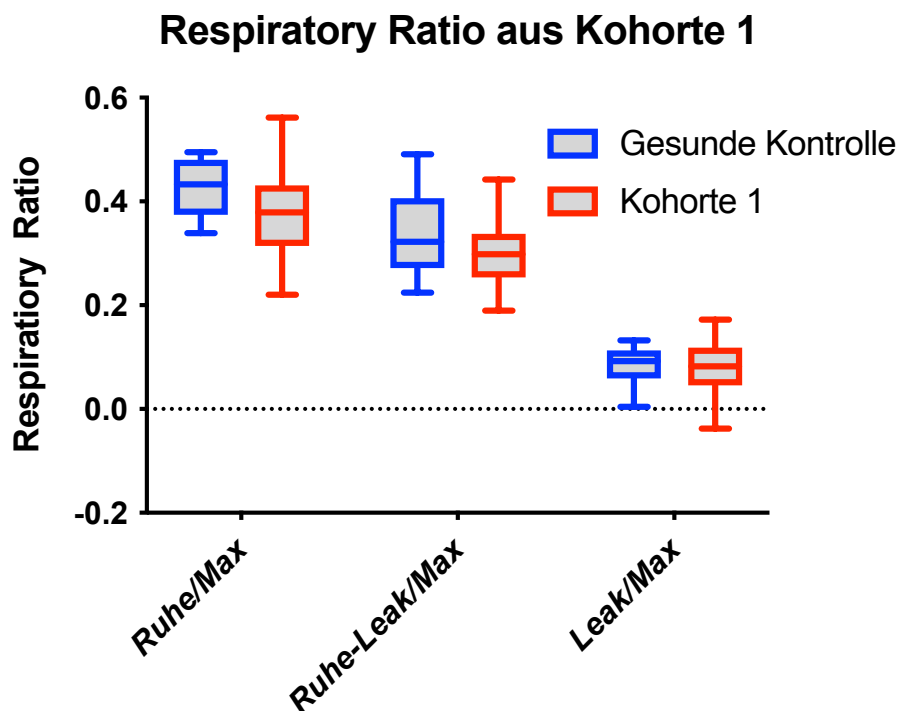


Abbildung 10: Darstellung der *Respiratory Ratios* der Kohorte 1
 Weitere Analyse der gemessenen Ruheatmung („Ruhe“), der *Leak*-Respiration nach Gabe von Oligomycin („*Leak*“) und der maximalen Respiration („Max“) nach Gabe von FCCP durch Bildung von verschiedenen *Respiratory Ratios*, unter Verwendung der korrigierten Messwerte. Gesunde Kontrolle: n = 8; Kohorte 1:

n = 15. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in den *Respiratory Ratios* mittels Two-Way ANOVA festgestellt werden.

3.2.2 Ergebnisse der Zellatmung der Kohorte 2 nach Stratifikation nach PVR

Um zu untersuchen, ob sich Patienten der Kohorte 2 mit hohem bzw. niedrigem PVR in der Zellatmung unterschieden, wurden die Patienten, analog zur Kohorte 1 in zwei Gruppen gemäß ihrem PVR unter- oder oberhalb des Medians der gesamten Gruppe geteilt. Der Median des PVRs der Kohorte 2 lag bei $536 \text{ dyn/s/cm}^{-5}$. Der Patient, dessen PVR den Median der Kohorte 2 bildete, wurde in der dichotomisierten Betrachtung ausgeschlossen. Abbildung 11 zeigt die korrigierte Zellatmung der Patienten aus der Kohorte 2, aufgeteilt in die beschriebenen zwei Gruppen. In der statistischen Analyse konnten zwischen der Gruppe mit niedrigem PVR und der Gruppe mit hohem PVR keine signifikanten Unterschiede der Ruheatmung sowie der *Leak*-Respiration nach Gabe von Oligomycin nachgewiesen werden. Die korrigierte maximale Respiration nach Gabe von FCCP bei den Patienten mit einem $\text{PVR} > \text{Median}$ war im Vergleich zu den Patienten mit einem $\text{PVR} < \text{Median}$ signifikant niedriger ($p = 0,0018$).

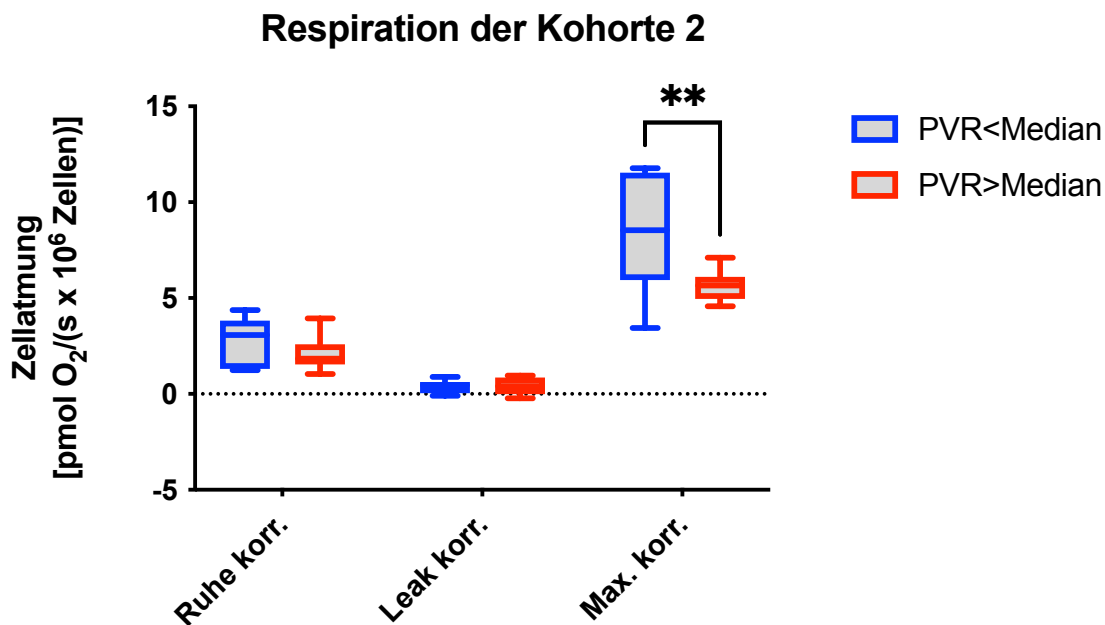


Abbildung 11: Mitochondriale Respiration der Kohorte 2 stratifiziert nach dem PVR
Darstellung der mitochondrialen Atmung als Sauerstoffdurchfluss pro Millionen Zellen in Picomol pro Sekunde. Dargestellt ist die Ruheatmung, die *Leak*-Respiration nach Gabe von Oligomycin, sowie die maximale Respiration nach Gabe von FCCP; Ruhe korr.: Ruheatmung, *Leak* korr.: *Leak*-Respiration, Max korr.: maximale Respiration; $\text{PVR} < \text{Median}$: n = 7; $\text{PVR} > \text{Median}$: n = 7; PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median: $536 \text{ dyn/s/cm}^{-5}$. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil, sowie die 5. und 95. Perzentile, Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Respiration zwischen den beiden Gruppen mittels Two-Way ANOVA zwischen der Ruhe- bzw. der *Leak*-Respiration festgestellt

werden. Mittels Two-Way ANOVA zeigte sich, dass die maximale Respiration der Patienten mit einem $PVR > \text{Median}$ signifikant niedriger war als bei niedrigerem PVR ($p: 0,0018$) (**).

Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Respiration und dem vorliegenden PVR bzw. dem Krankheitsverlauf gab, wurde eine entsprechende Regressionsanalyse durchgeführt (s. Abbildung 12). Es zeigte sich, dass in der Kohorte 2 eine signifikante negative Korrelation zwischen dem PVR und der maximalen Respiration vorlag ($p=0,0405$).

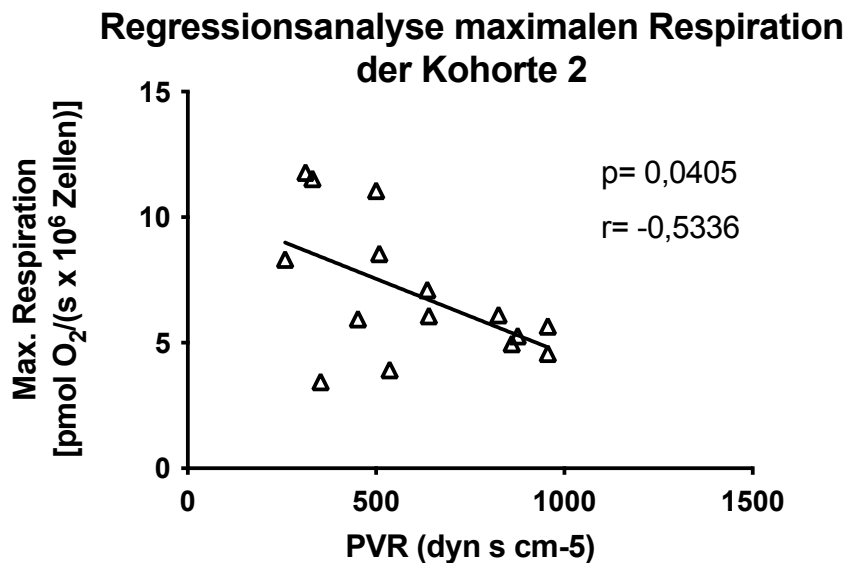


Abbildung 12: Regressionsanalyse der maximalen mitochondrialen Atmung der Kohorte 2
Einheit: Sauerstoffdurchfluss pro Millionen Zellen in Picomol pro Sekunde, Kohorte 2: $n = 15$, PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand. Dargestellt sind die einzelnen korrigierten Messwerte der maximalen Respiration nach Gabe von FCCP (Y-Achse) im Bezug zum jeweiligen PVR (X-Achse). In der Regressionsanalyse zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der maximalen Respiration und dem entsprechenden PVR. Die gebildete Regressionsgrade hat ein r von $-0,05336$ und ein p von 0.0405 .

Verhältnisse der Respirationsparameter der Kohorte 2

Nach Bildung der *Respiratory Ratios* analog zur Kohorte 1, wurde untersucht, ob sich die *Respiratory Ratios* bei Patienten mit PVR oberhalb des Medians von $536 \text{ dyn/s/cm}^{-5}$ und unterhalb des Medians unterschieden. Abbildung 13 zeigt, dass zwischen der Gruppe mit niedrigem PVR und der Gruppe mit hohem PVR in keinem der drei bestimmten *Respiratory Ratios* signifikante Unterschiede der Respiration nachgewiesen werden konnte.

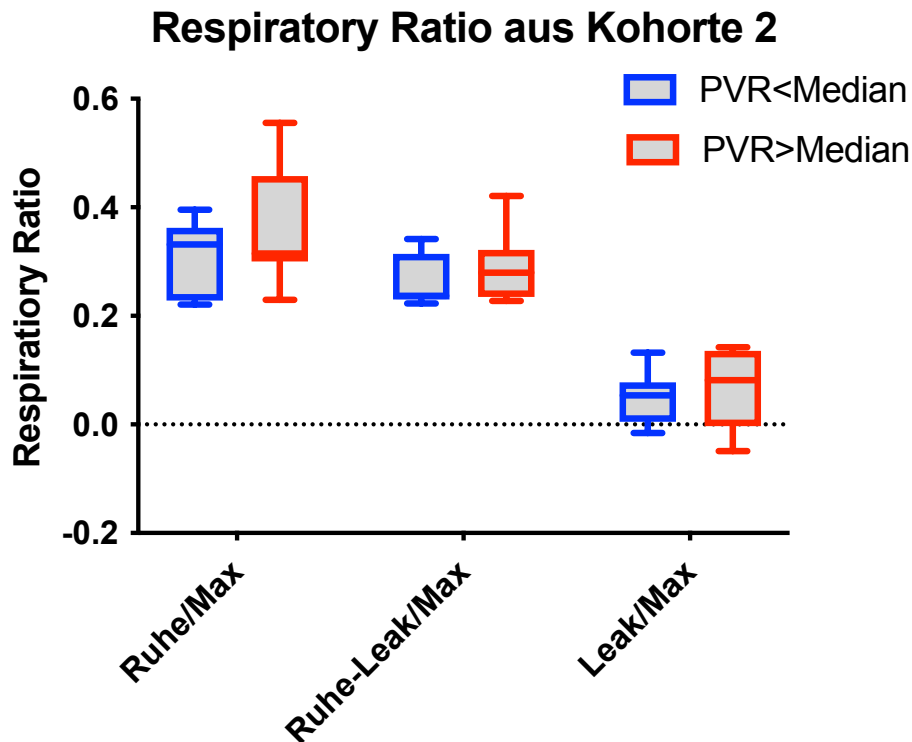


Abbildung 13: Darstellung der *Respiratory Ratios* der Patienten aus der Kohorte 2. Weitere Analyse der gemessenen Ruheatmung („Ruhe“), der *Leak*-Respiration nach Gabe von Oligomycin („*Leak*“) und der maximalen Respiration („Max“) nach Gabe von FCCP durch Bildung von verschiedenen *Respiratory Ratios*. PVR < Median: n = 7; PVR > Median: n = 7; PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median: 536 dyn/s/cm⁵. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil, sowie die 5. und 95. Perzentile. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in den *Respiratory Ratios* mittels Two-Way ANOVA festgestellt werden.

3.2.3 Mitochondriale Respiration in Bezug auf den Mutationsstatus

Bei allen Patienten aus Kohorte 1 und 2 wurde überprüft, ob eine genetische Untersuchung zum Nachweis einer bei HPAH bekannten Mutation (BMPR2- oder ALK1- Gen) in der Vergangenheit durchgeführt wurde. Bei insgesamt 15 der 30 Patienten lag zum Zeitpunkt dieser Studie das Ergebnis einer genetischen Testung vor. Bei vier Patienten lag eine Mutation im BMPR2-Gen, bei einem Patienten eine im ALK1-Gen, vor. Die Patienten mit bekannter Mutation wurden mit den 10 Patienten verglichen, bei denen die genetische Analyse keine Mutation im BMPR2-, bzw. ALK1-Gen nachweisen konnte. Ein signifikanter Unterschied der Ruheatmung, der *Leak*-Respiration nach Gabe von Oligomycin, sowie der maximalen Respiration nach Gabe von FCCP konnte zwischen den Patienten mit und ohne Mutation nicht festgestellt werden (s. Abbildung 14).

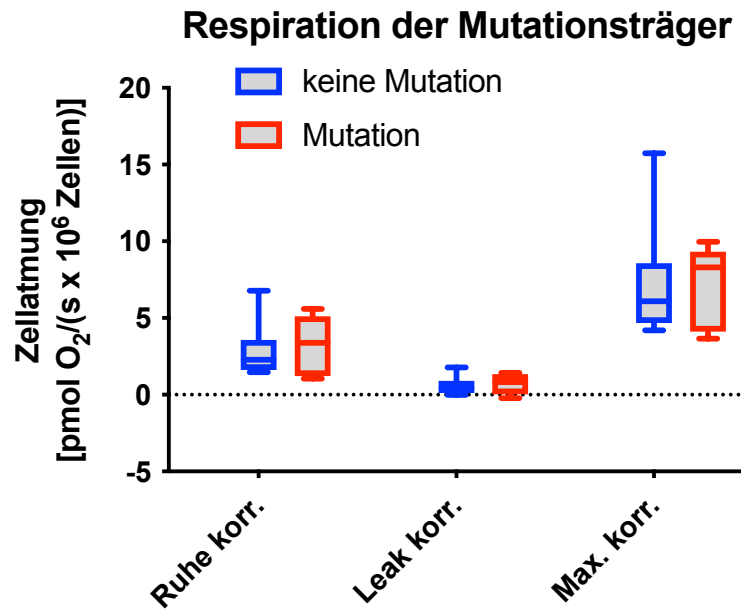


Abbildung 14: Mitochondriale Respiration in Bezug auf den Mutationsstatus
 Darstellung der mitochondrialen Atmung als Sauerstoffdurchfluss pro Millionen Zellen in Picomol pro Sekunde. Darstellung der Ruheatmung, der *Leak*-Respiration nach Gabe von Oligomycin, sowie der maximalen Respiration nach Gabe von FCCP. Ruhe korr.: Ruheatmung, *Leak* korr.: *Leak*-Respiration, Max korr.: maximale Respiration. Keine Mutation: n = 10; Mutation: n = 5; Ruhe korr.: Ruheatmung, *Leak* korr.: *Leak*-Respiration, Max korr.: Maximale Respiration. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile; Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Respiration zwischen den drei Gruppen mittels Two-Way ANOVA festgestellt werden.

3.3 Ergebnisse der Proteinanalysen mittels Western Blots

Bei einem Patienten aus der Ambulanz lagen zu wenige Zellen für die Durchführung der Western Blots vor, daher konnten bei jeweils 15 Patienten aus der Kohorte 1 und 15 Patienten aus der Kohorte 2, sowie 9 Probanden aus der gesunden Kontrollgruppe die Proteinanalysen mittels Western Blots durchgeführt werden. Bei der Auswertung der Filme zur Quantifizierung des MFN2 zeigte sich, dass die Stabilität unserer Proben nicht ausreichend gegeben war, um reproduzierbare Banden des MFN2 dazustellen (s. Abbildung 15 bis 17). In der quantitativen Analyse wurde MFN2 daher aus dieser Studie ausgeschlossen. Die Analyse der Western Blots zeigte für das Protein FIS1 eine Bande auf der erwarteten Höhe bei 17 Kilo Dalton (kDa) (s. Abbildung 15 bis 17).

3.3.1 Ergebnisse der Proteinanalysen der Kohorte 1

Es zeigte sich für die Patienten der Kohorte 1 im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede der Expression des FIS1. Ebenfalls lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe mit niedrigem PVR und der Gruppe mit hohem PVR in der Expression des FIS1 vor.

Proteinanalyse der Kohorte 1

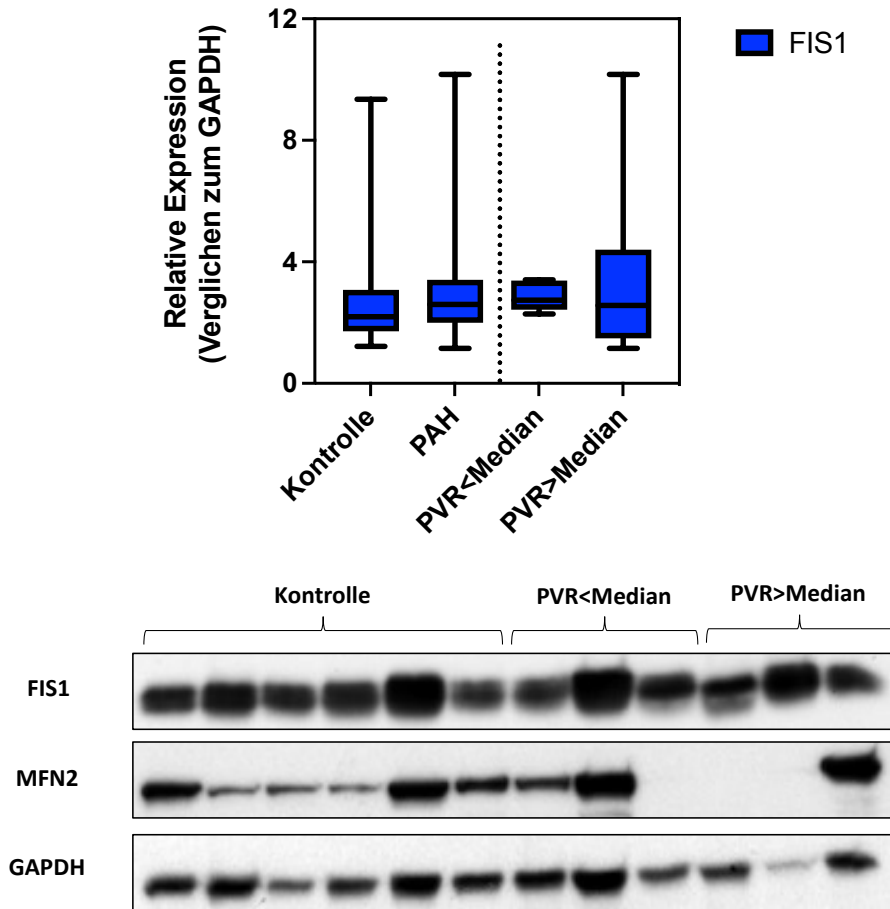


Abbildung 15: Darstellung der Proteinanalyse der Kohorte 1

Einheit: Relative Expression zum GAPDH; Gesunde Kontrolle: n = 9; PAH: n = 15; PVR<Median: n = 7; PVR>Median: n = 7; PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median: 532dyn/s/cm⁻⁵, PAH: pulmonal-arterielle Hypertonie, MFN2: Mitofusin 2, FIS1: mitochondriales Fission 1 Protein, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. In der statistischen Analyse mittels T-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression des FIS1 zwischen den gebildeten Gruppen nachgewiesen werden. Die dargestellten Western Blots sind erneut geplottete Proben von repräsentativen Studienteilnehmern.

3.3.2 Ergebnisse der Proteinanalysen der Kohorte 2

In der statistischen Analyse zeigte sich, dass keine signifikanten Unterschiede der Expression des FIS1 in der Kohorte 2 zwischen der Gruppe mit niedrigem und der Gruppe mit hohem PVR vorlag.

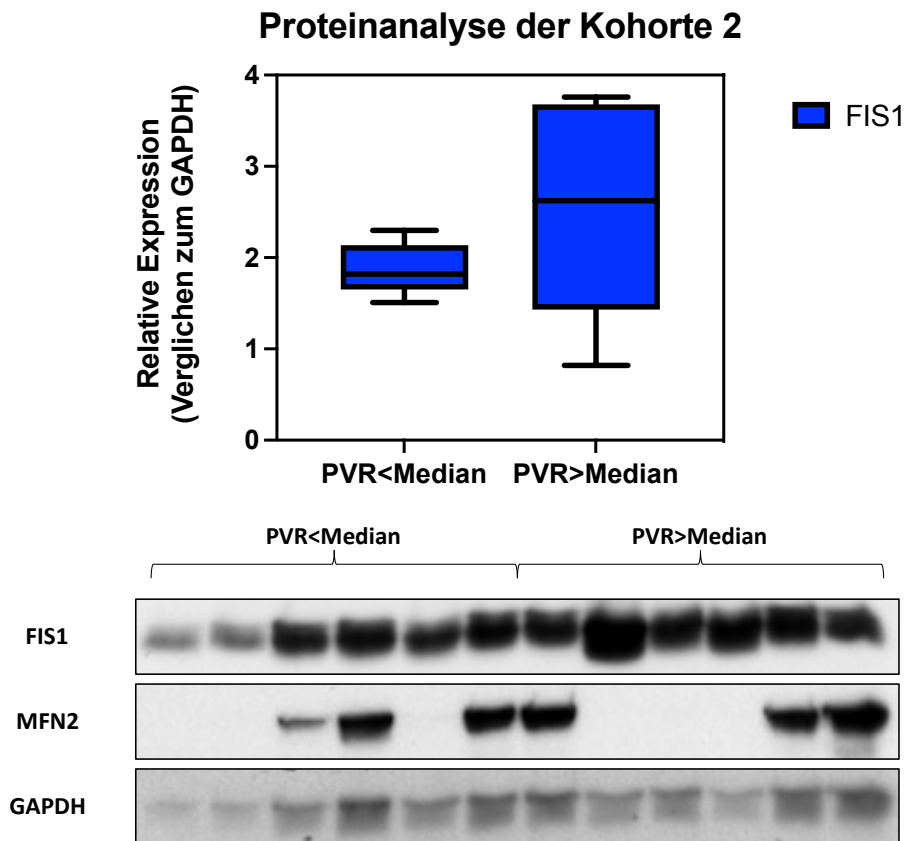


Abbildung 16: Darstellung der Proteinanalyse der Kohorte 2

Einheit: Relative Expression zum GAPDH; PVR < Median: n = 7; PVR > Median: n = 7; PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median 536 dyn/s/cm⁵; MFN2: Mitofusin 2, FIS1: mitochondriales Fission 1 Protein, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. In der statistischen Analyse mittels T-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression des FIS1 zwischen den gebildeten Gruppen nachgewiesen werden. Die dargestellten Western Blots sind erneut geplottete Proben von repräsentativen Studienteilnehmern.

3.3.3 Ergebnisse der Proteinanalysen in Bezug auf den Mutationsstatus

Bei vier Patienten, bei denen eine Proteinbestimmung mittels Western Blot durchgeführt werden konnte, lag der Nachweis einer Mutation im BMPR2- oder ALK1-Gen vor. Diese wurden mit Patienten verglichen, bei denen nachweislich keine Mutation vorlag. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression des FIS1 zwischen den Patienten mit einer Mutation und denen ohne bekannter Mutation.

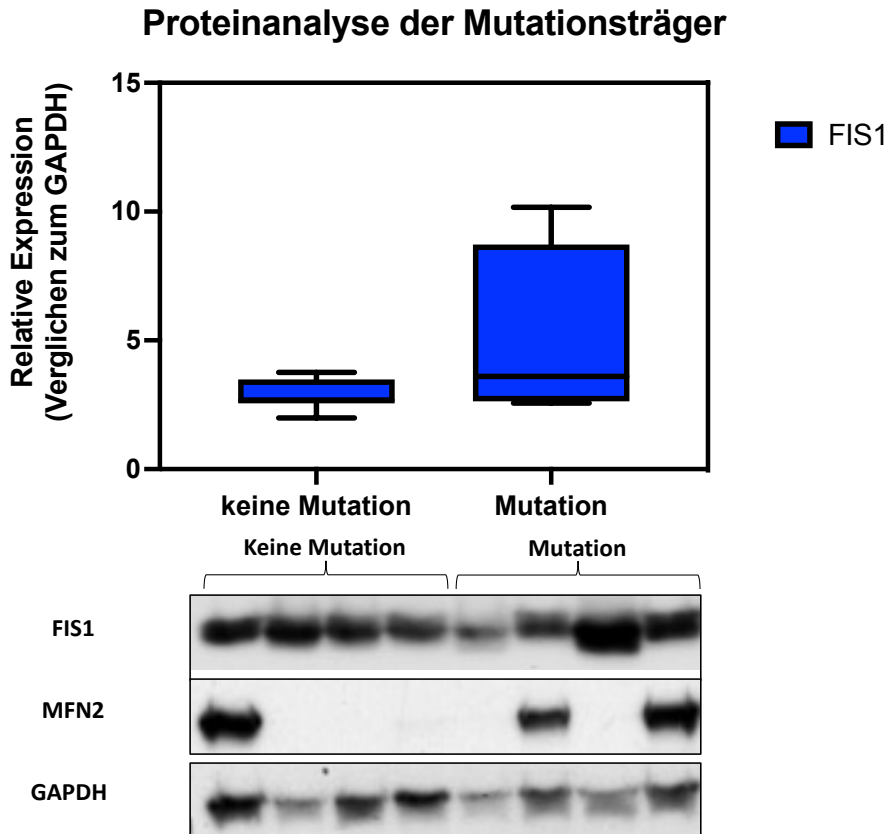


Abbildung 17: Darstellung der Proteinanalyse in Bezug auf den Mutationsstatus
 Einheit: Relative Expression zum GAPDH; keine Mutation: n = 10; Mutation: n = 4; MFN2: Mitofusin 2, FIS1: mitochondriales Fission 1 Protein, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. In der statistischen Analyse mittels T-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression des FIS1 zwischen den gebildeten Gruppen nachgewiesen werden. Die dargestellten Western Blots sind erneut geplottete Proben von repräsentativen Studienteilnehmern.

3.4 Ergebnisse der Bestimmung oxidativer und antioxidativer Marker

Bei allen 16 PAH-Patienten aus der Kohorte 1 sowie bei allen 15 Patienten aus der Kohorte 2, konnten mittels ELISA Proteinbestimmungen von Markern des oxidativen Stresses sowie antioxidativer Marker durchgeführt werden. Die Patienten aus der Kohorte 1 wurden mit der Kontrollgruppe verglichen. Zusätzlich wurden die Patienten der Kohorte 1 und 2 gem. ihres PVRs ober- oder unterhalb des Medians verglichen. Abbildung 18 A zeigt die Ergebnisse der Messung oxidativer und antioxidativer Marker der Kohorte 1, Abbildung 18 B der Kohorte 2. Sowohl bei den Patienten aus der Kohorte 1 als auch bei denen aus der Kohorte 2 konnten in der statistischen Analyse keine signifikanten Unterschiede der oxidativen und antioxidativen Marker zwischen den verschiedenen Gruppen nachgewiesen werden.

Eine gesonderte Betrachtung der Patienten mit bekannter Mutation im BMPR2-Gen bzw. ALK1-Gen in Bezug auf die Level der oxidativen/antioxidativen Marker zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit Mutation und denen ohne bekannter Mutation (Abbildung 19).

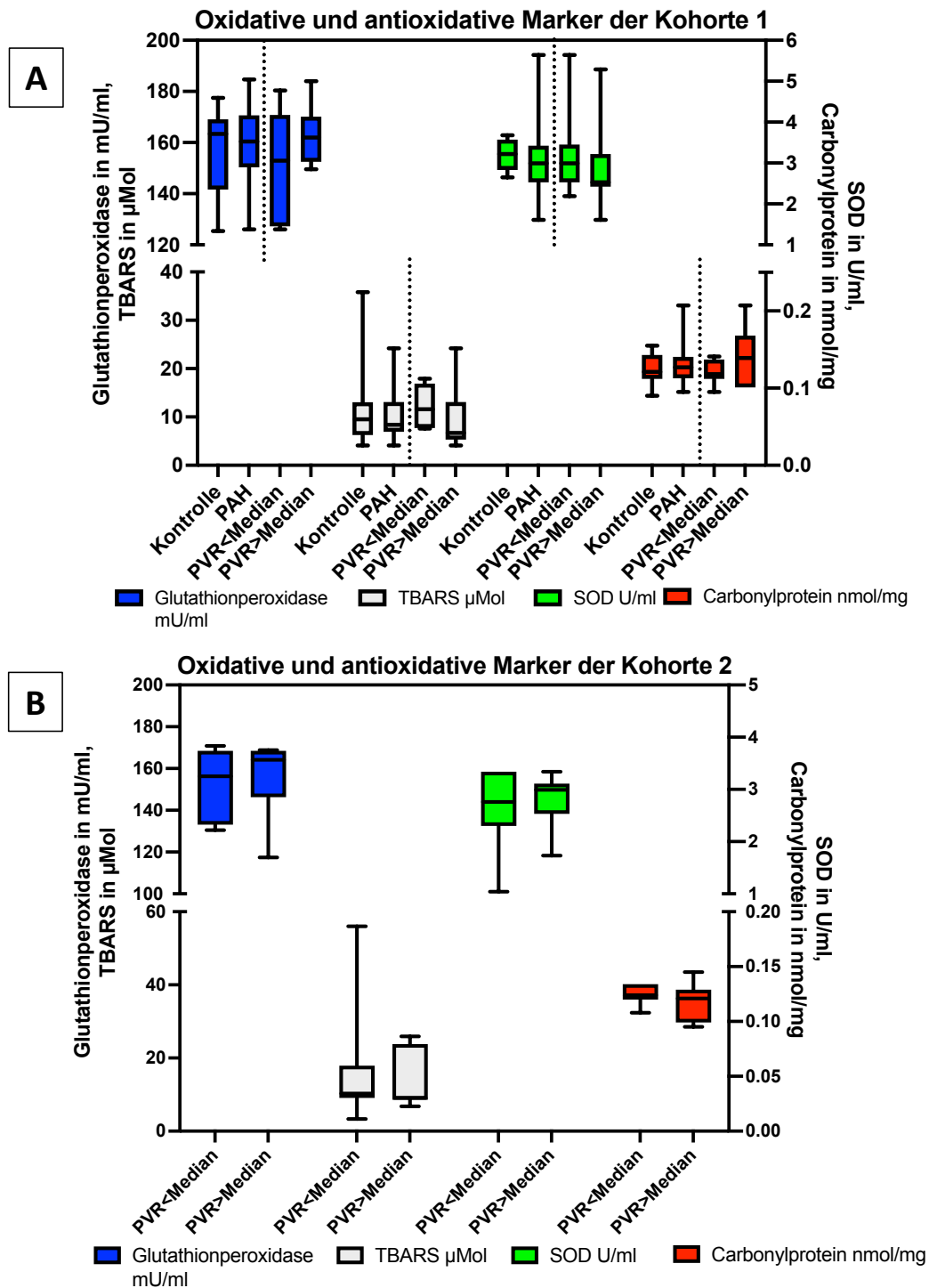


Abbildung 18: Darstellung der oxidativen/antioxidativen Marker aus der Kohorte 1 (A) und der Kohorte 2 (B)

Y-Achse: jeweilige Einheit der dargestellten Marker. TBARS: Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen μMol , SOD: Superoxiddismutase in U/ml ; Glutathionperoxidase in mU/ml ; Carbonylprotein in nmol/mg PAH: pulmonal-arterielle Hypertonie, PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median: $536 \text{ dyn/s/cm}^{-5}$. (A) Darstellung der antioxidativen Marker aus der Ambulanz; gesunde Kontrolle: $n = 9$; PAH: $n = 16$; $\text{PVR} < \text{Median}$: $n = 7$; $\text{PVR} > \text{Median}$: $n = 7$, (B) Darstellung der antioxidativen Marker aus der Kohorte 2, $\text{PVR} < \text{Median}$: $n = 7$; $\text{PVR} > \text{Median}$: $n = 7$. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. In der statistischen Analyse mittels T-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression antioxidativer Marker zwischen den gebildeten Gruppen nachgewiesen werden.

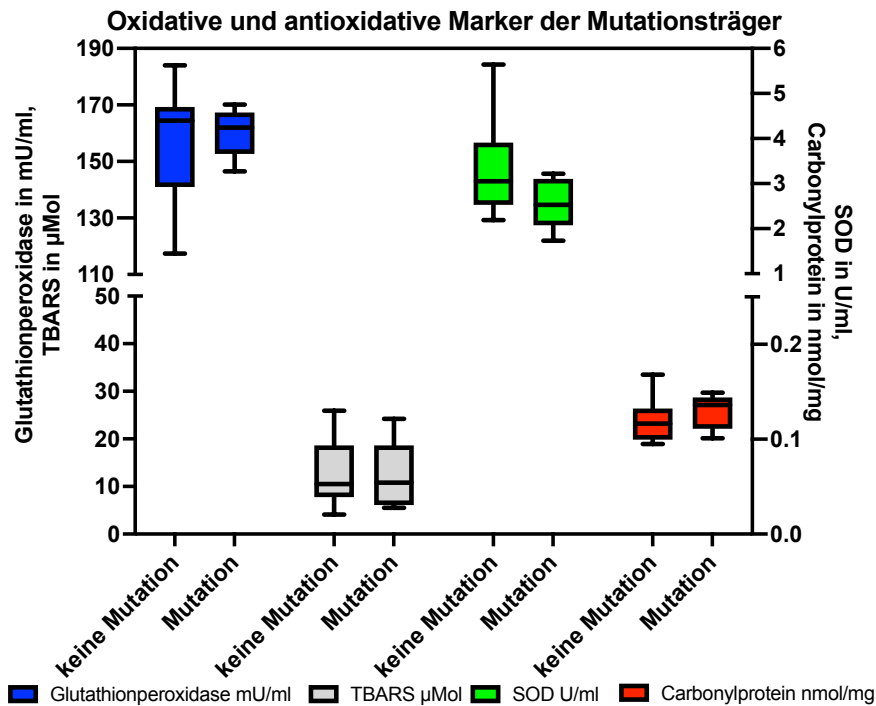


Abbildung 19: Darstellung antioxidativen Marker der Mutationsträger

Y-Achse: jeweilige Einheit der dargestellten Marker: TBARS: Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen in μMol , SOD: Superoxiddismutase in U/ml ; Glutathionperoxidase in mU/ml ; Carbonylprotein in nmol/mg PAH: pulmonal-arterielle Hypertonie, PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median $536 \text{ dyn/s/cm}^{-5}$. (A) Darstellung der antioxidativen Marker der Mutationsträger; Mutation: $n = 5$; keine Mutation: $n = 10$. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. In der statistischen Analyse mittels T-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression antioxidativer Marker zwischen den gebildeten Gruppen nachgewiesen werden.

3.5 Ergebnisse der Analyse der Blutwerte aus den Routinekontrollen

Im Rahmen von klinischen Routinekontrollen wurden, sowohl bei den Patienten der Kohorte 1 als auch den Patienten der Kohorte 2, Biomarker der Leber- und Nierenfunktion sowie hämatologische Parameter bestimmt. Die jeweiligen Blutwerte der Patienten wurden der digitalen Patientenakte entnommen. Bei allen 16 Patienten aus der Kohorte 1 sowie bei allen 15 Patienten aus der Kohorte 2 lagen entsprechende aktuelle Laborwerte vor (s. Tabelle 11). Für die weitere Betrachtung der Blutwerte wurden die Patienten erneut entsprechend dem Median des PVRs in eine Gruppe mit niedrigem und eine mit hohem PVR eingeteilt. Bei einem Patienten aus der Kohorte 1 lagen zum

Zeitpunkt der Studie keine Daten aus dem RHK vor. Sowohl bei den Patienten aus der Kohorte 1 als auch bei denen aus der Kohorte 2, lag der Median des PVRs bei 536 dyn/s/cm⁻⁵.

Die Analyse der Blutwerte der Patienten aus der Kohorte 1 (Abbildung 20 und Abbildung 22) zeigte in der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit niedrigem bzw. hohem PVR. Ebenfalls war in der Kohorte 2 (Abbildung 21 und Abbildung 23) kein signifikanter Unterschied der Blutwerte zwischen den beiden gebildeten Gruppen nachweisbar.

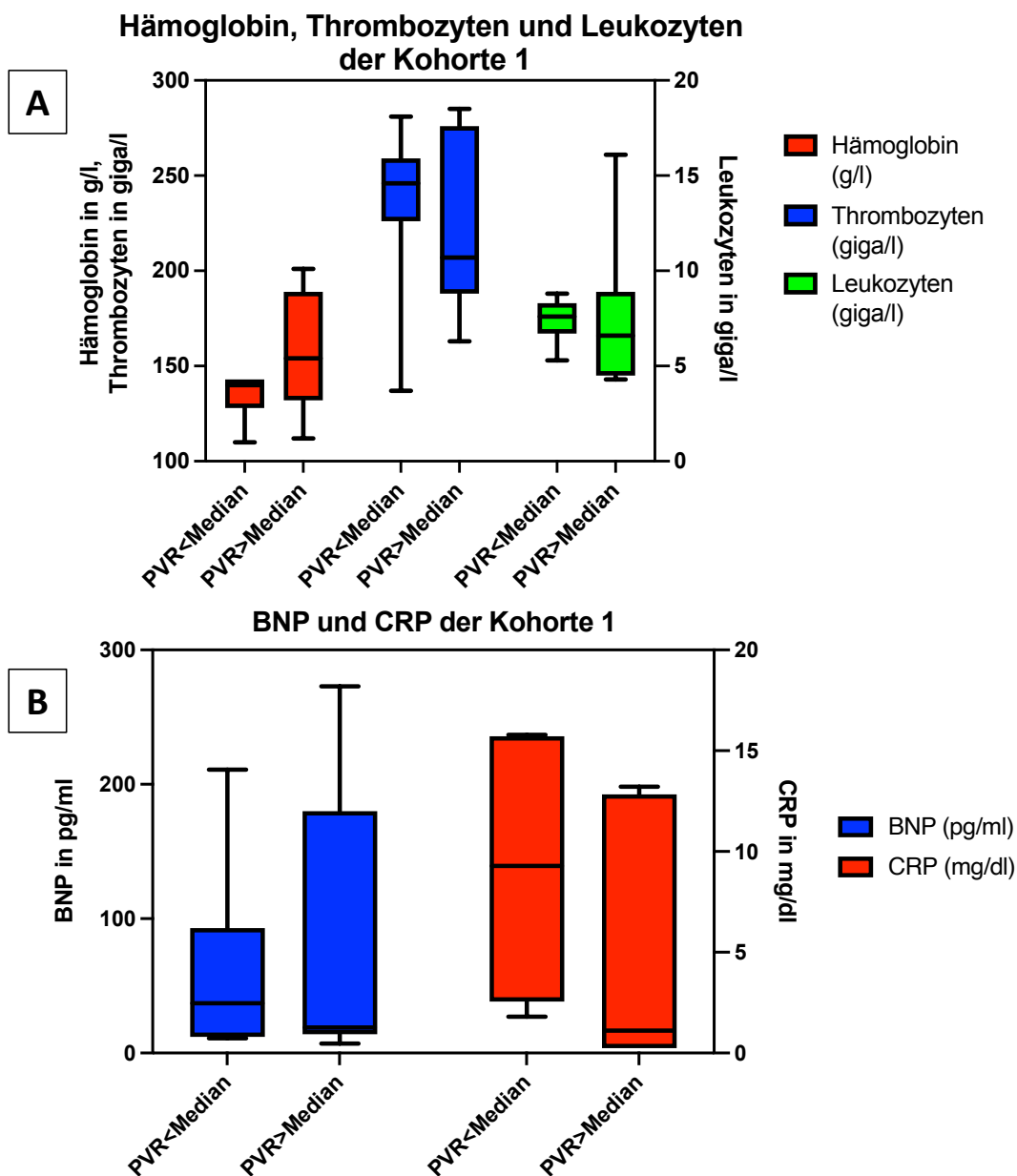


Abbildung 20: Darstellung von Hämoglobin, Thrombozyten und Leukozyten (A) sowie CRP und BNP (B) aus der Kohorte 1

Y-Achsen: jeweilige Einheiten; BNP: B-natriuretisches Peptid, CRP: C-reaktives Protein, PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median 536 dyn/s/cm⁻⁵; PVR<Median: n = 7; PVR>Median: n = 7; n Bei 3 Patienten mit PVR>Median lag der Wert des CRP bei <0,5mg/dl. Für die statistische Auswertung wurde jeweils die Hälfte des Wertes der Nachweisgrenze verwendet. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. In der statistischen Analyse mittels T-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression der Blutwerte zwischen der Gruppe mit niedrigem und der Gruppe mit hohem PVR nachgewiesen werden.

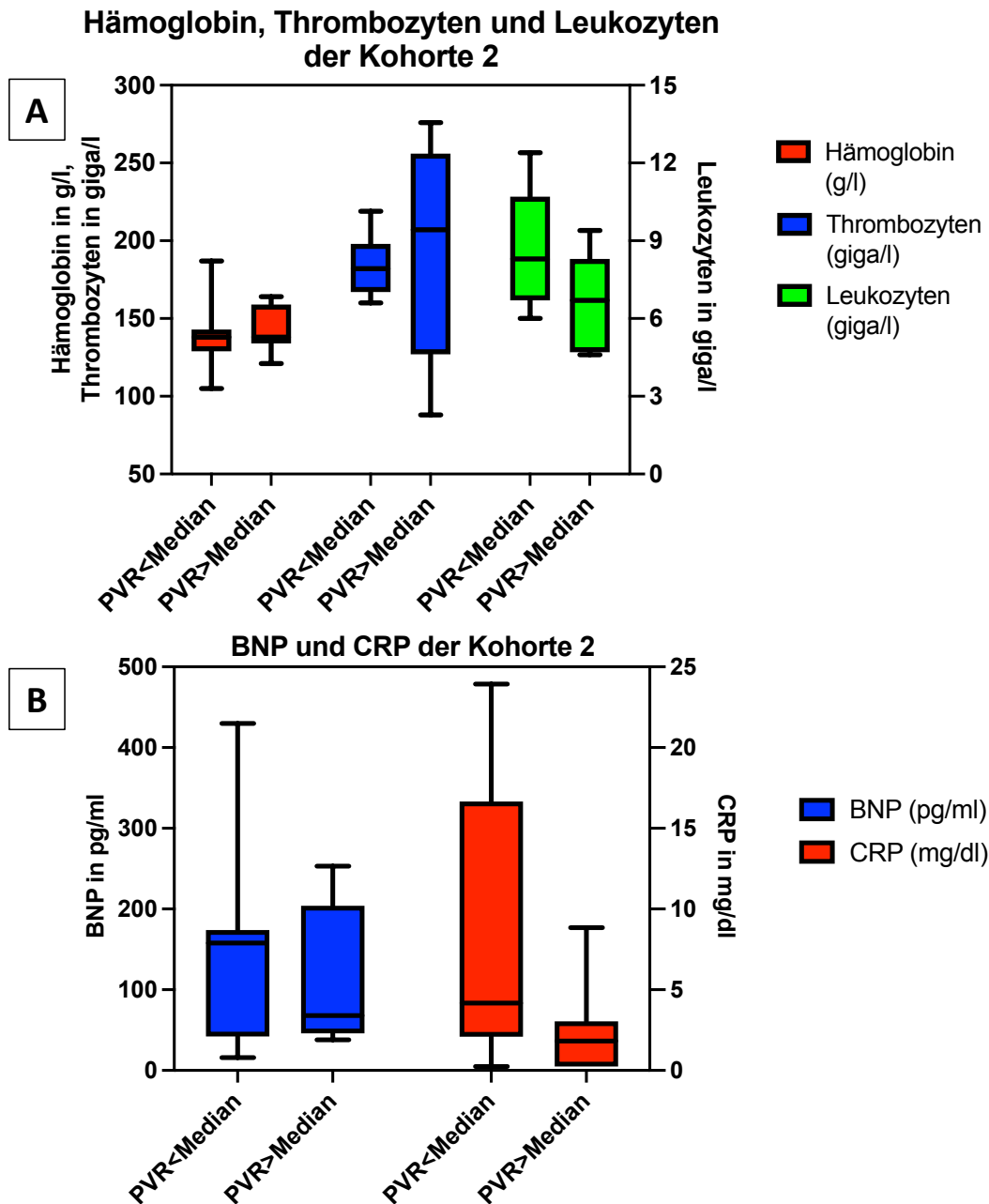


Abbildung 21: Darstellung von Hämoglobin, Thrombozyten und Leukozyten (A) sowie CRP und BNP (B) aus der Kohorte 2

Y-Achsen: jeweilige Einheiten; BNP: B-natriuretisches Peptid, CRP: C-reaktives Protein, PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median 536 dyn/s/cm⁻⁵; PVR<Median: n = 7; PVR>Median: n = 7; Bei einem Patienten mit PVR<Median und zwei Patienten mit PVR >Median lag der Wert des CRP bei <0,5mg/dl. Für die statistische Auswertung wurde jeweils die Hälfte des Wertes der Nachweisgrenze verwendet. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. In der statistischen Analyse mittels T-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression der Blutwerte zwischen der Gruppe mit niedrigem und der Gruppe mit hohem PVR nachgewiesen werden.

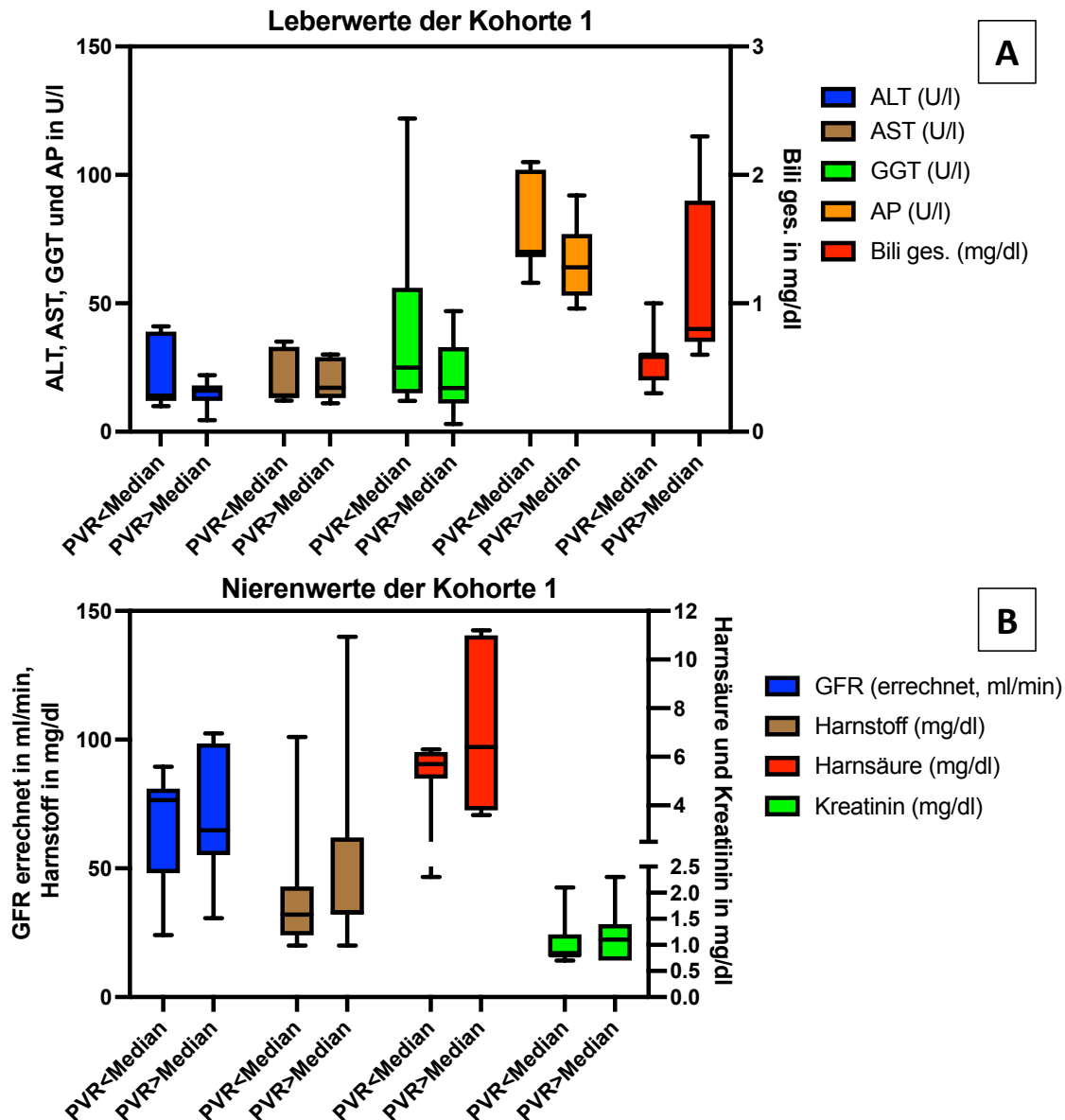


Abbildung 22: Darstellung der Nieren (A) und Leberwerte (B) aus der Kohorte 1
 Y-Achsen: jeweilige Einheiten, GFR: errechnete Glomeruläre Filtrationsrate, ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, GGT: Gamma-Glutamyltransferase, AP: Alkalische Phosphatase, Bili ges.: Bilirubin gesamt, PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median: 536 dyn/s/cm⁻⁵; PVR<Median: n = 7; PVR>Median: n = 7; Bei einem Patienten mit PVR<Median lag der Wert der ALT <9U/l, bei einem Patienten der Wert der GGT bei <6U/l. Für die statistische Auswertung wurde jeweils die Hälfte des Wertes der Nachweisgrenze verwendet. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. In der statistischen Analyse mittels T-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression der Blutwerte zwischen der Gruppe mit niedrigem und der Gruppe mit hohem PVR nachgewiesen werden.

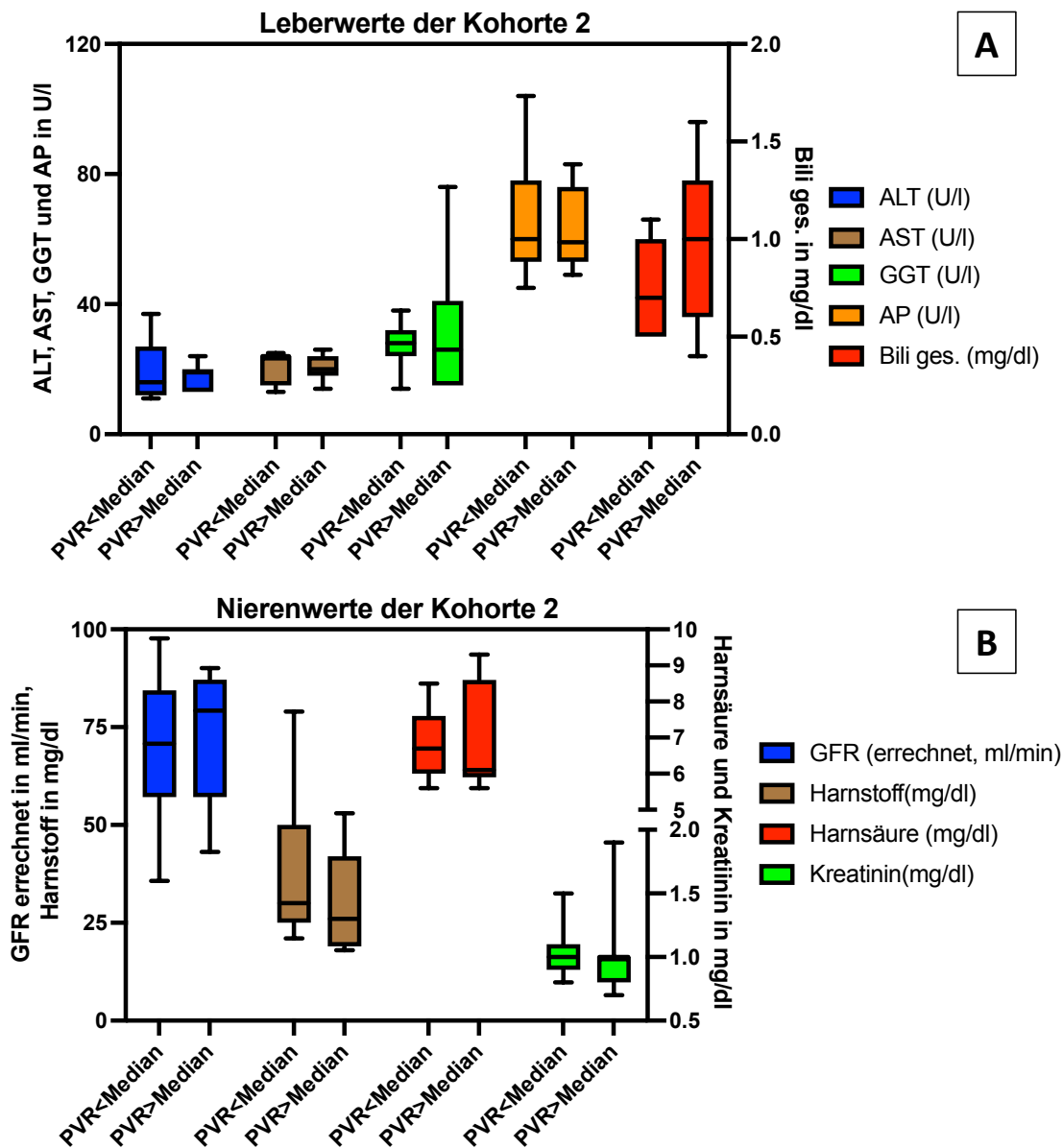


Abbildung 23: Darstellung der Nieren (A) und Leberwerte (B) aus der Kohorte 2
 Y-Achsen: jeweilige Einheiten, GFR: errechnete Glomeruläre Filtrationsrate, ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, GGT: Gamma-Glutamyltransferase, AP: Alkalische Phosphatase, Bili ges.: Bilirubin gesamt, PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, Median: 536 dyn/s/cm⁻⁵; PVR<Median: n= 7; PVR>Median: n = 7. Dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die 5. und 95. Perzentile. In der statistischen Analyse mittels T-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression der Blutwert zwischen der Gruppe mit niedrigem und der Gruppe mit hohem PVR nachgewiesen werden

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Die Ruheatmung, die *Leak*-Respiration, sowie die maximale Respiration der Kohorte 1 unterschieden sich nicht signifikant von den Messwerten der gesunden Kontrolle. Ebenfalls unterschieden sich in der Kohorte 1 die Messwerte der mitochondrialen Atmung der Gruppe mit niedrigem PVR nicht von denen der Gruppe mit hohem PVR.
- Die Ruheatmung und die *Leak*-Respiration der Gruppe mit niedrigem PVR aus der Kohorte 2 unterschied sich nicht signifikant von der entsprechenden Gruppe mit einem hohen PVR.
- Die maximale Respiration der Patienten aus der Kohorte 2 mit einem hohem PVR war signifikant niedriger als die maximale Respiration der Gruppe mit einem niedrigen PVR aus der Kohorte 2 ($p=0,0018$).
- Es lag eine negative Korrelation zwischen dem PVR und der maximalen Respiration bei den Patienten aus der Kohorte 2 vor ($r=-0,05336$, $p=0,0405$).
- Die Ruheatmung, die *Leak*-Respiration, sowie die maximale Respiration der Patienten mit einer bekannten Mutation im *BMPR2*-, bzw. *ALK1*-Gen unterschied sich nicht signifikant von den Messwerten der Patienten, bei denen nachweislich keine der jeweiligen Mutationen vorlag.
- Die Expression von *FIS1* zeigte weder in der Kohorte 1 noch in der Kohorte 2 signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit hohem bzw. niedrigem PVR. Ebenfalls ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kohorte 1 und der Kontrollgruppe bzw. zwischen den Patienten mit bekannter Mutation im *BMPR2*-, bzw. *ALK1*- Gen und den Patienten ohne entsprechender Mutation, in der Expression von *FIS1* nachweisen.
- Sowohl in der Kohorte 1 als auch in der Kohorte 2 ließen sich keine signifikanten Unterschiede der untersuchten Marker des oxidativen Stresses zwischen der jeweiligen Gruppe mit niedrigem PVR und der Gruppe mit hohem PVR nachweisen.
- Sowohl in der Kohorte 1 als auch in der Kohorte 2 ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Blutparametern aus den Laborkontrollen zwischen der Gruppe mit niedrigem PVR und der Gruppe mit hohem PVR nachweisen.

4. Diskussion

4.1 Übersicht

Die PAH ist eine progrediente Erkrankung, deren Pathophysiologie noch nicht vollständig bekannt ist. Die Erkrankung ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht kurativ behandelbar. Bekannt ist, dass Gefäßumbauprozesse in der Lunge, im Sinne eines *Remodeling*, die Entstehung und Progredienz der Erkrankung fördern. Als eine der Ursachen dieser Prozesse wird eine mitochondriale Dysfunktion in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Lunge diskutiert. Es wird davon ausgegangen, dass eine Dysfunktion der Mitochondrien, im Sinne eines veränderten zellulären Metabolismus mit verminderter oxidativer Phosphorylierung sowie anti-apoptotischen und proliferativen Prozessen maßgeblich an der Entstehung und Aufrechthaltung der PAH beteiligt ist. Ähnliche metabolische Zustände wurden in der Vergangenheit bereits in Tumorzellen beschrieben (Culley & Chan, 2018; Dromparis et al., 2010; Paulin & Michelakis, 2014; J. Ryan, Dasgupta, Huston, Chen, & Archer, 2015). Dieser metabolische Zustand wird auch, benannt nach seinem Entdecker Otto Warburg, als Warburg-Effekt beschrieben (Liberti & Locasale, 2016). Ebenfalls ist bekannt, dass in proinflammatorischen Immunzellen vermehrt eine schnelle Energiegewinnung durch die Glykolyse mit entsprechend verringerter mitochondrialer Respiration vorliegt (Y. Wang & McLean, 2022). Außerdem zeigten verschiedene Arbeiten Unterschiede zwischen PBMC von Patienten mit PAH und einer gesunden Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer Gen- und Proteinexpression u.a. für Wachstumsfaktoren, sowie für Onkogene und Tumorsuppressoren (Bull et al., 2004; Hoffmann et al., 2016).

Ziel unserer Studie war es, zirkulierende Blutzellen als relativ einfach zugängliches Probenmaterial bei Patienten mit einer PAH hinsichtlich ihrer mitochondrialen Funktion zu untersuchen und mit dem PAH-Schweregrad zu vergleichen. Da inflammatorische Prozesse ebenfalls eine große Rolle in der Pathophysiologie spielen, wurden in der vorliegenden Studie Mitochondrien von peripheren Immunzellen (PBMC) untersucht.

Als primärer Zielparameter wurde die Respiration der Mitochondrien von PBMC von IPAH und HPAH-Patienten bestimmt und mit hämodynamischen Parametern der Patienten korreliert. Als weiterer Zielparameter wurde die Proteinexpression von exemplarischen Markern der mitochondrialen Morphologie (Fission und Fusion), sowie Plasmamarker des oxidativen Stresses bestimmt.

4.2 Kritische Diskussion der Methodik

Diese Studie hat einige Limitationen, welche im Folgenden aufgezeigt und diskutiert werden sollen. In der gesunden Kontrollgruppe wurden Lungenerkrankungen und systemische Erkrankungen anamnestisch ausgeschlossen. Eine bessere Charakterisierung wäre durch die Durchführung von lungenfunktionellen Untersuchungen und Bluttests möglich gewesen, so dass in dieser Studie pathologische Veränderungen in der Kontrollgruppe nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte. Ebenfalls wäre eine gesunde Kontrollgruppe zum Vergleich der Kohorte 2 wünschenswert gewesen. Dies war aufgrund des Mangels an Patienten mit unauffälligen RHK-Befunden nicht möglich.

Des Weiteren lag zum Zeitpunkt dieser Studie nicht von allen Patienten aus der Kohorte 1 bzw. der Kohorte 2 eine Untersuchung bezüglich einer BMPR-2 bzw. ALK-1 Mutation vor. Es konnten daher einige Patienten nicht in diese Auswertung eingeschlossen werden. Bei 28 von 31 eingeschlossenen Patienten erfolgte zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie mindestens eine einfache PAH-spezifische medikamentöse Therapie (s. Tabelle 11). Aufgrund der geringen Anzahl der Studienteilnehmer wurde in der statistischen Auswertung die medikamentöse Vorbehandlung der Patienten nicht berücksichtigt. Vorherige Arbeiten konnten bereits protektive Eigenschaften verschiedener PAH spezifischer Therapeutika auf die mitochondriale Funktion sowohl in Tier- als auch in Humanen-Versuchen nachweisen (Ding et al., 2021; Jia, Guo, & Yao, 2018; Rutai et al., 2020). Ein möglicher Einfluss der bereits erfolgenden Therapie auf die erhobenen Messergebnisse ist daher nicht auszuschließen.

In der vorliegenden Arbeit wurden PBMC isoliert. Die Gruppe der PBMC umfasst T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Monozyten sowie dendritische Zellen (Grievink, Luisman, Kluft, Moerland, & Malone, 2016). Die genaue Zellzusammensetzung der PBMC wurde in unserer Arbeit nicht bestimmt. Ein möglicher Einfluss von Unterschieden in der Zellzusammensetzung der PBMC zwischen den jeweiligen untersuchten Gruppen bzw. im Krankheitsverlauf kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Die Entnahmeorte des Blutes zwischen der Kohorte 1 (peripher-venös) und der Kohorte 2 (zentral-venös) unterscheiden sich. Ein diesbezüglicher Einfluss auf die Ergebnisse, bei denen eine Auswertung beider Kohorten zusammen erfolgte, kann nicht ausgeschlossen werden. Dies betrifft insbesondere die Analyse der mitochondrialen Respiration bzw. der

Expression von FIS1 und MFS2 in Bezug auf den Mutationsstatus des Patienten, da hierbei Patienten aus beiden Kohorten zusammen untersucht wurden.

4.3 Respiration der Mitochondrien von PBMC bei Patienten mit PAH

Ein wesentliches Ergebnis der Studie war, dass die maximale mitochondriale Respiration von PBMC der Patienten aus der Kohorte 2 mit einem hohem PVR niedriger war, als die der Patienten mit einem niedrigen PVR (s. Abbildung 11). Dazu passend lag eine negative Korrelation bei den Patienten aus der Kohorte 2 zwischen dem PVR und der maximalen Respiration vor. Bei den Patienten aus der Kohorte 1 zeigten sich keine entsprechenden signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen mit hohem bzw. niedrigem PVR. Eine verminderte Respiration bei Patienten mit PAH der Kohorte 1 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe war, ebenso wie ein signifikanter Unterschied in der mitochondrialen Respiration zwischen den Patienten mit Mutation und denen ohne bekannte Mutation, nicht nachweisbar. Die Unterschiede der Kohorten sind möglicherweise durch größere zeitliche Abstände zwischen der Bestimmung hämodynamischer Parameter im RHK und der Messung der mitochondrialen Respiration verursacht.

Insgesamt zeigte sich somit, dass die maximale mitochondriale Respiration negativ mit dem pulmonal-vaskulären Widerstand korreliert, wenn die Respiration zeitnah zu der Hämodynamik erhoben wird. Die maximale Atmung, gemessen nach Hinzugabe eines Entkopplers, beschreibt die maximale respiratorische Elektronentransfer-Kapazität der Mitochondrien und wird daher auch mitochondriale Atmungskettenkapazität genannt (Djafarzadeh & Jakob, 2017).

Dazu passend wurde von Michelakis et al. in verschiedenen Arbeiten beschrieben, dass die Respiration von stationären Zellen der Lunge (Endothelzellen und PASMC) bei PAH niedriger ist, als bei gesunden Kontrollgruppen (Michelakis et al., 2017; Paulin & Michelakis, 2014; Sutendra & Michelakis, 2014). Unterschiedliche weitere Arbeiten kamen zu ähnlichen Ergebnissen bei der Untersuchung humaner Endothelzellen (Xu et al., 2007), sowie bei der Untersuchung von tierischen PASMC (Sommer et al., 2011) im Kontext der PAH.

Außerdem zeigten verschiedene Arbeiten, dass PBMC bei PAH, neben gesteigerten proinflammatorischen Prozessen, auch genetischen und metabolischen Veränderungen unterliegen, ohne allerdings bisher die mitochondriale Atmung im Detail zu untersuchen.

So wurden Veränderungen der Genregulation bzgl. der Stress- und Immunantwort, sowie inflammatorischen Prozessen in PBMC von PAH-Patienten gezeigt (Hoffmann et al., 2016). Diese Veränderungen sind möglicherweise mit einer veränderten mitochondrialen Respiration assoziiert, da Untersuchungen an Monozyten zeigten, dass inflammatorische Prozesse eine verringerte maximale Atmungskapazität der Mitochondrien zur Folge haben können (Hecker et al., 2014). Des Weiteren konnte eine Studie an PBMC die negativen Auswirkungen von inflammatorischen Prozessen, simuliert durch eine Inkubation mit dem Zytokin TNF- α , auf die mitochondriale Atmung zeigen (Hecker et al., 2018). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Belikova et al (2007) bei der Untersuchung der Respiration von PBMC von Patienten mit akuter Sepsis. Neueste Arbeiten zeigen außerdem, dass aktivierte proinflammatorische Immunzellen ihre Energiegewinnung auf vermehrte Glykolyse anstelle der oxidativen Phosphorylierung zur ATP-Produktion umstellen (Wang & McLean, 2022).

Somit könnte die Abnahme der mitochondrialen Atmungskettenkapazität der Mitochondrien der PBMC unter anderem durch die bei der Pathophysiologie der PAH ursächlich beteiligten inflammatorischen Prozesse zustande kommen. Die Tatsache, dass mitochondriale Veränderungen in der aktuellen Studie nur bei hohem PVR nachweisbar waren, deutet daraufhin, dass bei den Patienten mit hohem PVR möglicherweise eine gesteigerte Inflammation vorlag. Allerdings spielen möglicherweise weitere Faktoren eine Rolle, wie Veränderungen im Eisen-Stoffwechsel. Es ist bekannt, dass bei PAH ein Mangel an Eisen im Serum der Patienten bekannt ist und mit einem schwereren Verlauf der Erkrankung korreliert (Quatredeni et al., 2021). Ein Eisenmangel wird mit einer Abnahme der Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase 2 in Verbindung gebracht, und hätte somit eine Abnahme der mitochondrialen Atmung als Folge (Culley & Chan, 2018). Außerdem könnten freie Fettsäuren ein Einflussfaktor auf die Aktivierung und damit möglicherweise auch auf die Respiration der PBMC sein. Brittain et al. (2016) haben nachweisen können, dass freie Fettsäuren im Blut von Patienten mit PAH nahezu um den Faktor zwei, im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle, erhöht waren. Eine Inkubation von PBMC mit verschiedenen freien Fettsäuren konnte, je nach verwendeter Fettsäure, sowohl pro- als auch antiinflammatorische Einflüsse auf die PBMC zeigen (Sureda et al., 2020).

Als weitere mögliche Einflussfaktoren auf die Respiration könnte das Alter, sowie das Geschlecht der Patienten gewirkt haben. Zahlreiche Studien diskutieren einen Zusammenhang zwischen dem Altern und einer mitochondrialen Dysfunktion

(Chistiakov, Sobenin, Revin, Orekhov, & Bobryshev, 2014; Vendelbo & Nair, 2011). Allerdings wird der Einfluss des Alters auf die mitochondriale Respiration kontrovers, abhängig vom untersuchten Gewebe, diskutiert. So konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass Mitochondrien aus zerebralem Gewebe eine verringerte Aktivität der Komplexe II-IV der Atmungskette aufwiesen, gleichwohl traf dies auf Mitochondrien aus kardialem Gewebe nicht zu (Cocco et al., 2005). Eine Untersuchung auf Einflüsse des Alters auf die mitochondriale Funktion von Thrombozyten zeigte eine signifikante Zunahme der Ruheatmung, sowie eine Abnahme der Aktivität des Komplex II der Atmungskette, signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern konnten nicht nachgewiesen werden. (Sjövall et al., 2013). Eine von uns durchgeführte statistische Korrektur für diese Faktoren zeigte, dass die beschriebene Korrelation in der vorliegenden Arbeit signifikant bleibt (Sommer et al., 2022).

Eine Ursache dafür, dass die PBMC, gewonnen von PAH-Patienten aus der Kohorte 1, keine signifikant verminderte mitochondriale Atmungskettenkapazität in der Gruppe der Patienten mit hohem PVR im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit niedrigem PVR aufwiesen, könnte daran liegen, dass bei diesen Patienten die Untersuchung der hämodynamischen Parameter nicht zum gleichen Zeitpunkt erfolgte, wie die Messung der mitochondrialen Atmung. Zwischen diesen beiden Zeitpunkten lagen teilweise Zeiträume von mehreren Monaten.

Interessanterweise zeigte sich auch kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den PAH-Patienten der Kohorte 1. Dies liegt möglicherweise an dem multifaktoriellen Einfluss physiologischer und pathologischer Bedingungen auf die Respiration der PBMC, so dass diese sich nur innerhalb der PAH-Patienten in Abhängigkeit der Schwere der pulmonal-vaskulären Widerstandserhöhung auswirkte.

Im Gegensatz zu der mitochondrialen Atmungskettenkapazität waren die anderen Atmungszustände nicht signifikant unterschiedlich in den verschiedenen Gruppen. Die Ruheatmung beschreibt dabei den Sauerstoffverbrauch der ATP-Gewinnung sowie des Protonen-, „Leaks“ zusammen und ist somit ein Maß für den Sauerstoffbedarf der Zelle unter konstanten Bedingungen (Jang, Greenwood, Spyres, & Eckmann, 2017). Die oxidative Verwertung von Substraten ist nicht zu 100% an die ATP-Synthese gekoppelt. Durch verschiedene Prozesse, z.B. Protonen, die unabhängig von der ATP-Synthese die innere Membran der Mitochondrien passieren, wird die Anzahl der Protonen bzw. der

Protonengradient in dem intermembranösen Raum verändert. Die Atmung nach Inhibierung der ATPase mittels Oligomycin, *Leak*-Respiration, spiegelt die Atmung wieder, die zum Ausgleich dieses Protonenverlustes notwendig ist (Divakaruni & Brand, 2011). Es liegt also die Vermutung nahe, dass zum Zeitpunkt unserer Messung weder ein erhöhter Sauerstoffverbrauch zur ATP-Gewinnung, bzw. ein erhöhter Energiebedarf der PBMC, noch ein gesteigerter Protonenverlust z.B. aufgrund eines Schades der mitochondrialen Membranen oder der Komplexe der Atmungskette vorlag.

Eine weitere Charakterisierung der mitochondrialen Funktion erfolgte über die Berechnung der Verhältnisse der verschiedenen Atmungszustände. Setzt man die Ruheatmung in das Verhältnis zur mitochondrialen Atmungskettenkapazität erhält man eine Aussage über die Aktivierung der Mitochondrien. Eine überproportional erhöhte Ruheatmung würde auf einen hohen ATP-Bedarf bzw. hohe ADP-Spiegel in der Zelle hindeuten; ADP gilt als ein Aktivator der Atmungskette (Pesta et al., 2012; Williams & Chance, 1955). In unserer Studie war das Verhältnis dieser beiden Atmungszustände („Ruhe/Max“), im Vergleich der Gruppen nicht verändert. Als weiteres Charakteristikum wurde das Verhältnis von mitochondrialer Atmungskettenkapazität („Max“) zur Atmung nach Inhibierung der ATPase mittels Oligomycin („Leak“) untersucht. Das Verhältnis der *Leak*-Respiration zur maximalen Atmung („Leak/Max“) ist ein Maß für die Kopplung der Mitochondrien (Pesta et al., 2012). In unserer Studie konnten hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit niedrigem PVR und den Gruppen mit hohem PVR aus der Kohorte 1 bzw. der Kohorte 2 nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung des Anteils der Atmung, die für die ATP-Synthese verwendet wird, an der mitochondrialen Atmungskettenkapazität wurde die Differenz der Ruheatmung und der *Leak*-Respiration ins Verhältnis zur mitochondrialen Atmungskettenkapazität gesetzt („Ruhe-*Leak*/Max“). In unserer Studie konnten hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit niedrigem PVR und den Gruppen mit hohem PVR aus der Kohorte 1 bzw. der Kohorte 2 nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass die mitochondriale Atmungskettenkapazität bei den Patienten der RHK-Gruppe mit hohem PVR erniedrigt war, ohne dass ein Anstieg des Verhältnis „Ruhe/Max“ bzw. „(Ruhe-*Leak*)/Max“ nachweisbar war, deutet darauf hin, dass die untersuchten Zellen nicht verstärkt aktiviert waren, bzw. keinen vergrößerten ATP-Bedarf hatten (Pesta et al., 2012). Eine Erklärung wäre, dass der ATP-Umsatz bei diesen PBMC verringert war. Wahrscheinlicher ist aber, dass die Zellen keinen geringeren ATP-

Bedarf hatten, sondern vermehrt ATP über die Glykolyse anstelle der oxidativen Phosphorylierung bereitstellten. Dies würde den bereits erwähnten Theorien von Michelakis et. al. bezüglich der veränderten Energiegewinnung, gemäß des Warburg-Effekts von stationären Zellen in der Lunge bei PAH-Patienten, entsprechen (Culley & Chan, 2018; Paulin & Michelakis, 2014; Sutendra & Michelakis, 2014).

Nguyen et al. (2017) untersuchten in einer ähnlichen Studie die Respiration von Thrombozyten von PAH-Patienten. Überraschenderweise konnte eine verstärkte maximale Respiration der Thrombozyten von PAH-Patienten bei gleichzeitig verstärkter ATP-Gewinnung mittels Glykolyse, nachgewiesen werden. In dieser Studie lag eine positive Korrelation der maximalen Respiration und hämodynamischen Parametern (mPAP und PVR) vor. Vorherige Arbeiten konnten bereits zeigen, dass bei Patienten mit PAH eine gesteigerte Aktivierung von Thrombozyten vorliegt (Lannan, Phipps, & White, 2014; Vrigkou et al., 2020). Aktivierte Thrombozyten schütten Entzündungsmediatoren aus und fördern somit ein proinflammatorisches Umfeld (Lannan et al., 2014). Somit könnte die erhöhte mitochondriale Atmung in dieser Studie auf einer Aktivierung der Thrombozyten im Rahmen des Krankheitsbildes der PAH zurückzuführen sein. Eine aktuelle Arbeit konnte zeigen, dass die maximale mitochondriale Respiration, gemessen unmittelbar nach Aktivierung der Thrombozyten mittels ADP, signifikant höher war, als bei nicht aktivierten Mitochondrien. Es muss allerdings erwähnt werden, dass die Autoren der Studie zu dem Schluss gekommen sind, dass möglicherweise das Verfahren der Isolation der Thrombozyten einen größeren Einfluss auf die mitochondriale Atmung haben könnte, als die Aktivierung der Mitochondrien mittels ADP (Siewiera, Labieniec-Watala, Wolska, Kassassir, & Watala, 2021). Einen weiteren Einfluss auf die Thrombozytenrespiration üben möglicherweise PAH-spezifische Therapien aus, zu denen Prostacyclinanaloga gehören. Diese gelten als sehr potente Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation (Galiè et al., 2016). Nguyen et al. konnten in ihrer Studie keinen Einfluss der PAH-spezifischen Medikation auf die mitochondriale Respiration der Thrombozyten nachweisen. Sie erwähnen jedoch, dass dies möglicherweise Gegenstand größeren Studien in Zukunft sein sollte (2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PBMC von PAH-Patienten, ähnlich wie bereits für andere Zelltypen bei der PAH gezeigt, eine Abnahme der mitochondrialen Respiration in Abhängigkeit der Schwere der pulmonal-vaskulären Widerstandserhöhung zeigen. Dies ist möglicherweise unter anderem auf inflammatorische Prozesse, welche

mit einer Aktivierung der PBMC einhergehen, zurückzuführen. Es scheinen allerdings noch weitere Prozesse als Ursache der verminderten Respiration in Frage zu kommen, höchstwahrscheinlich ist die Genese multifaktoriell. Es bedarf weiterer Untersuchungen, z.B. die Bestimmung der Zusammensetzung der freien Fettsäuren im Blut von Patienten mit PAH, sowie die Analyse des Eisenstoffwechsels der PAH Patienten um die komplexen Zusammenhänge zu verstehen.

4.4 Expression von Markern der Fission und Fusion

In der vorliegenden Arbeit wurden die PBMC hinsichtlich der Expression exemplarischer Proteine, die bei mitochondrialen Prozessen der Fission und Fusion beteiligt sind, untersucht. Mitochondriale Fission ist charakterisiert durch das Aufteilen eines Mitochondriums in mehrere Mitochondrien. Der Prozess der Fusion beschreibt den umgekehrten Prozess. Physiologisch herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Prozessen der Fission und Fusion (Lee & Yoon, 2016; van der Blik et al., 2013).

Mittlerweile sind zahlreiche Erkrankungen bekannt, bei denen von einem Zusammenhang zwischen deren Pathogenese und der Dysbalance von Prozessen der Fission und Fusion ausgegangen wird (Bose & Beal, 2016; Chandhok, Lazarou, & Neumann, 2018; Rovira-Llopis et al., 2017). Insbesondere wurde einen Zusammenhang zwischen gesteigerter Inflammation und mitochondrialer Fission gezeigt (Forrester et al., 2020; Motori et al., 2013). Bei verschiedenen Erkrankungen konnten bereits Veränderungen der Expression u.a. von FIS1 und MFN2 in peripheren Immunzellen nachgewiesen werden, und diese werden teilweise auch als Marker einiger Erkrankungen diskutiert (Brasanac et al., 2022; Scaini, Mason, Diaz, 2021; Wang, Song, Tan, Albers, & Jia, 2012).

Bzgl. der PAH berichteten Ryan et al. (2013), dass in PASMCM dieser Patienten eine vermehrte Fragmentierung der Mitochondrien aufgrund verminderter Expression von MFN2 bei gleichzeitig erhöhter Expression von DRP1 und FIS1 vorlag. Weitere Arbeiten, sowohl mit humanem Probenmaterial als auch im Tierversuch, von Marsboom et al. (2012), Chen et al.(2018) und Tian et al.(2018) stützen diese Aussage. Außerdem konnten Ryan et al. (2013) zeigen, dass eine Überexpression von MFN2 durch eine entsprechende Gentherapie im Tierversuch eine verminderte Proliferation, verstärkte Apoptose, Abnahme des PVR, sowie eine Verminderung der Dicke pulmonaler Arterien und eine verbesserte Gehstrecke im Laufrad bewirkte. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Parra et al. (2017), die nachweisen konnten, dass eine Inhibierung von DRP1 vor einer

durch Hypoxie ausgelösten Proliferation der PASMC sowie den metabolischen Veränderungen schützte.

In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression von FIS1 in den unterschiedlichen Gruppen der Kohorte 1 und der Kohorte 2, sowie der Patienten mit und ohne bekannter Mutation im BMPR2 bzw. ALK1 Gen, nachgewiesen werden.

MFN2 konnte leider nicht reproduzierbar mittels Western Blot dargestellt werden. Möglicherweise lag dies an einer Degradation des Proteins durch die Probenbehandlung. Es ist bekannt, dass es durch das Einfrieren und Auftauen von Proteinen zur Denaturierung kommen kann (Pikal-Cleland, Rodríguez-Hornedo, Amidon, & Carpenter, 2000). Dies erklärt möglicherweise den fehlenden Nachweis von MFN2 in einigen Proben, die mehrfach aufgetaut und gefroren waren.

Zusammenfassend war aufgrund der Menge und Qualität des Probenmaterials die Untersuchung der Fragestellung bzgl. der Proteinexpression von Fission- und Fusionmarkern nur eingeschränkt möglich. Diese Fragestellung sollte anhand größerer Studien unter Einbezug weiterer Marker der mitochondrialen Fission und Fusion untersucht werden.

4.5 Expression von Markern des oxidativen Stresses bei PAH

Lange Zeit wurden ROS lediglich eine destruktive Rolle im Organismus zugeschrieben. ROS sind in der Lage die Funktion von Proteinen, Fetten und auch DNA einzuschränken. In den letzten 20 Jahren zeigte sich jedoch, dass ROS bei vielfältigen Prozessen als Signalmoleküle mitwirken und auch an der Immunabwehr beteiligt sind (Diebold & Chandel, 2016; Kohchi et al., 2009).

Die schädigende Wirkung von ROS wurden mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht. So wurden unter anderem bei metabolischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, bei zystischer Fibrose und auch im Alterungsprozess erhöhte ROS nachgewiesen (Iqbal, Cawthon, Wideman, & Bottje, 2001). Eine Übersichtsarbeit von Climent et al. (2020) zeigt außerdem, dass in zahlreichen kardialen und pulmonalen Erkrankungen erhöhter oxidativer Stress eine Rolle spielt.

In der vorliegenden Studie wurde die Aktivität von antioxidativ wirkenden Enzymen, sowie die Expression von Proteinen, die durch vermehrten oxidativen Stress entstehen und somit als Marker für oxidativen Stress fungieren, in dem Plasma von PAH-Patienten

untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression entsprechender Marker zwischen den Gruppen festgestellt werden. Zum aktuellen Zeitpunkt wird kontrovers diskutiert, inwieweit auch bei der PH erhöhte ROS eine Rolle spielen. In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass bei PH eine erhöhte mROS Produktion vorliegt (Iqbal et al., 2001; Redout et al., 2007). ROS scheinen die Proliferation von PASMC und damit das vaskuläre *Remodeling* zu fördern (Yu & Chan, 2017). Die Aussagen, dass erhöhter oxidativer Stress die Entwicklung und Progression einer PH fördert, scheint durch Studien, die eine verringerte Aktivität der Superoxid-Dismutase bei PH beschreiben, bestätigt (Fu et al., 2020; Jernigan et al., 2017; Nozik-Grayck et al., 2014; Yu & Chan, 2017). Die Superoxid-Dismutase wirkt antioxidativ und bietet einen Schutz gegen oxidativen Stress (Miao & St. Clair, 2009).

Gleichzeitig wurden aber auch in anderen Studien verminderte ROS-Spiegel im Kontext der PH nachgewiesen. Dies führte ebenfalls zur Aktivierung von proliferativen Faktoren (Bonnet et al., 2006; Paulin & Michelakis, 2014; Sutendra & Michelakis, 2014). Der genaue Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Entwicklung bzw. Aufrechterhaltung einer PH scheint komplex zu sein und weitere Untersuchungen zu bedürfen. Die uneinheitliche Datenlage zu diesem Thema spiegelt auch die hier vorliegende Arbeit wider, in der weder verstärkte, noch verminderte Expressionen der Marker für oxidativen Stress nachgewiesen wurde.

4.6 Weitere Blutwerte im Kontext der PAH

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Laborwerten im Vergleich zwischen Patienten mit hohem und niedrigem PVR.

Laut den aktuellen Leitlinien zur Diagnostik der PH von der europäischen Fachgesellschaft der Kardiologen und der europäischen Gesellschaft für Atemwegserkrankungen (ERC/ERS) gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keine spezifischen Biomarker, die für die Diagnostik der PH geeignet sind. Es gibt jedoch Parameter, die mit einem schweren Verlauf der PH assoziiert sind (Galiè et al., 2016). Da es im Krankheitsverlauf zur verstärkten Belastung des rechten Herzens kommt, besteht ein Zusammenhang zwischen der Progredienz der PH und einem Anstieg von BNP bzw. NT-proBNP. Die Bestimmung von NT-proBNP wird auch in der klinischen Routinediagnostik durchgeführt (Galiè et al., 2016; Hoeper et al., 2017; Leuchte et al., 2007; Matthys et al., 2016; Warwick, Thomas, & Yates, 2008). Leuchte et al. (2007) konnten außerdem eine Korrelation der Mortalität und erhöhten NT-proBNP Werten bei

PH-Patienten nachweisen. NT-proBNP und BNP sind allerdings bei zahlreichen kardialen Erkrankungen erhöht und daher nicht spezifisch für die PH (Galiè et al., 2016). Erhöhte Harnsäure-Spiegel wurden unter anderem bei schweren akuten Erkrankungen, bei Herzinsuffizienz, wie auch Patienten mit einer PH nachgewiesen (Hoepfer, Hohlfeld, & Fabel, 1999; Nagaya et al., 1999; Warwick et al., 2008). Die Spiegel der Harnsäure steigen proportional zur Schwere der PH und sind laut einigen Autoren als ein prognostischer Marker für den Verlauf und die Mortalität der Erkrankung geeignet (Bendayan et al., 2003; Nagaya et al., 1999). Aufgrund der mangelnden Spezifität erhöhter Harnsäure-Werte ist der Nutzen für die Diagnostik einer PH allerdings begrenzt. In der vorliegenden Studie konnte kein Unterschied des BNP oder Harnsäure-Wertes bei Patienten mit unterschiedlich ausgeprägtem PVR festgestellt werden. Dies liegt am ehesten an der hohen Schwankungsbreite dieser Werte und der niedrigen Anzahl der Patienten in der Studie. Eine Korrelation dieser Parameter mit der Respiration wurde deshalb nicht durchgeführt. Unterschiede anderer Parameter, insbesondere der Entzündungswerte konnten ebenfalls nicht festgestellt werden.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein tieferes Verständnis für den Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion in PBMC und der Entwicklung bzw. dem Verlauf einer PAH zu erlangen.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass PBMC von Patienten mit einer PAH und einem hohen PVR eine verringerte mitochondriale Atmungskettenkapazität im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigen PAH aufwiesen. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen Kontrollpatienten und Patienten mit PAH gezeigt werden, so dass möglicherweise nicht die PAH-Erkrankung primär, sondern sekundäre Faktoren, die mit einem erhöhten PVR verbunden sind, für die Veränderungen ursächlich sind.

Weitere signifikante Veränderungen von Markern der mitochondrialen Dynamik der PBMC oder von Markern des oxidativen Stresses, waren in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbar.

Zukünftige Arbeiten sollten daher in größeren Studien weitere Untersuchungen der Mitochondrien von PBMC im Kontext der PAH durchführen und sowohl Ursachen als auch Folgen der mitochondrialen Veränderungen adressieren.

Da die PBMC eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Immunzellen darstellen, sollten weitere Betrachtungen in Zukunft auch zelltypspezifisch erfolgen. Hinzukommend sollte

einem möglichen Einfluss PAH-spezifischer Medikation auf die mitochondriale Funktion der PBMC Beachtung geschenkt werden.

II. Zusammenfassung

Die PAH ist eine progrediente Erkrankung, die mit pathologischen Veränderungen der pulmonalen Gefäße einhergeht. Im Krankheitsverlauf kommt es zu Umbauprozessen der pulmonalen Gefäße, welche insbesondere durch Proliferation glatter Muskelzellen (PASMC), sowie Aktivierung und Migration von Immunzellen gekennzeichnet sind. Es wird davon ausgegangen, dass es im Krankheitsverlauf zu einer metabolischen Umstrukturierung mit Abnahme der Energiegewinnung mittels oxidativer Phosphorylierung hin zu einer gesteigerten Glykolyse der PASMC kommt. Da möglicherweise diese mitochondrialen Veränderungen zum einen systemischer Natur sind, und zum anderen periphere Immunzellen (PBMC), deren Funktion durch Mitochondrien reguliert wird, bei der Entstehung der PAH beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit die mitochondriale Atmung von PBMC von PAH-Patienten untersucht und mit der Krankheitsschwere, charakterisiert durch den pulmonal-vaskulären Widerstand (PVR) verglichen. Zusätzlich wurden exemplarische Marker der mitochondrialen Dynamik (FIS1, MFN2), sowie Marker des oxidativen Stresses analysiert. Die Untersuchungen erfolgten sowohl an einer Kohorte, bei der das Blut während ambulanter Routinekontrollen abgenommen wurde (Kohorte 1) und einer entsprechenden ambulanten gesunden Kontrollgruppe, als auch an einer Kohorte, bei der das Blut im Rahmen von Rechtsherzkatheteruntersuchungen gewonnen wurde (Kohorte 2).

Es konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Atmungskettenkapazität der PBMC, gewonnen während der Rechtsherzkatheteruntersuchung von PAH-Patienten (Kohorte 2) mit dem PVR dieser Patienten korrelierte. Allerdings zeigte sich kein Unterschied der Respiration zwischen Patienten mit hohem und niedrigem PVR der ambulanten PAH-Gruppe, sowie zwischen der ambulanten PAH-Gruppe und einer entsprechenden gesunden Kontrollgruppe. Bei aufgrund limitierter Probenquantität und –qualität eingeschränkter Beurteilbarkeit der Proteinexpressionsanalysen zeigte sich kein Unterschied im Fissionsmarker FIS1 zwischen den untersuchten Gruppen. Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied der (anti-)oxidativen Marker zwischen den Gruppen gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Respiration von PBMC von PAH-Patienten negativ mit dem hämodynamischen Schweregrad der Erkrankung korrelierte, allerdings war kein Unterschied zwischen gesunden Probanden und PAH-Patienten nachweisbar. Anhand größerer Studien mit zelltypisch spezifischer

Untersuchung der peripheren Immunzellen sollten in Zukunft die Ursachen und Folgen dieser mitochondrialen Veränderungen bei PAH-Patienten untersucht werden.

III. Summary

PAH is a progressive disease associated with pathological changes in the pulmonary vasculature. In the course of the disease, remodeling processes of the pulmonary vessels occur, which are characterized in particular by proliferation of smooth muscle cells (PASMC), as well as activation and migration of immune cells. In addition, it is assumed that during the course of the disease there is a metabolic restructuring with a decrease in energy production by means of oxidative phosphorylation to an increased glycolysis of the PASMC. Because it is possible that these mitochondrial changes are systemic in nature, on the one hand, and peripheral immune cells (PBMC), whose function is regulated by mitochondria, are involved in the development of PAH, on the other hand, mitochondrial respiration of PBMC from PAH patients was investigated in this work and compared with disease severity characterized by pulmonary vascular resistance (PVR). In addition, exemplar markers of mitochondrial dynamics (FIS1, MFN2), as well as markers of oxidative stress were analyzed. The studies were performed on both a cohort in which blood was drawn during routine outpatient visits (cohort 1) and a corresponding healthy outpatient control group, and a cohort in which blood was obtained during right heart catheterization (cohort 2).

It was shown that the mitochondrial respiratory chain capacity of PBMC obtained during right heart catheterization of PAH patients (cohort 2) correlated with the PVR of these patients. However, there was no difference in respiration between patients with high and low PVR of the outpatient PAH group, and between the outpatient PAH group and a matched healthy control group. With limited assessability of protein expression analyses due to limited sample quantity and quality, there was no difference in the fission marker FIS1 between the studied groups. Likewise, no significant difference in (anti-)oxidative markers was shown between the groups.

In conclusion, mitochondrial respiration of PBMC from PAH patients was shown to negatively correlate with hemodynamic severity of disease, but no difference was detectable between healthy subjects and PAH patients. Larger studies with cell-type specific examination of peripheral immune cells should be used in the future to investigate the causes and consequences of these mitochondrial alterations in PAH patients.

IV. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALK1	Activin receptor-like kinase 1
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AVDO₂	Sauerstoffsättigungsdifferenz
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor type 2
BNP	B-natriuretisches Peptid
BSA	Bovine Serum Albumin
CI	Cardiac-Index
cGC	cyclische Guanylatzyklase
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CRP	C-Reaktives Protein
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
CVP	Zentral venöser Druck
DLCO	Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRP1	dynamamin-related-protein-1
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENG	Endoglin
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERA	Endothelin-Rezeptor-Antagonisten
ET	Endothelin
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FIS1	mitochondrial-fission-1-protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GGT	Gamma-Glutamyltransferase

GTP	Guanosintriphosphat
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
IL	Interleukin
IPAH	idiopatische pulmonal-arterielle Hypertonie
kDA	Kilo Dalton
NO	Stickstoffmonoxid
MFF	mitochondrial-fission-factor
MID	mitochondrial-dynamic-protein
mPAP	mittlerer pulmonal-arterieller Druck
mROS	mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NT-proBNP	N-terminal pro-B-type natriuretic peptide
NYHA	New-York-Heart-Association
OPA1	optic-athrophy-1
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PASMC	<i>pulmonary-arterial-smooth-muscle-cells</i>
PAWP	mittlerer pulmonal arterieller Verschlussdruck
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	phosphate-buffered-saline
pCO₂	Kohlendioxidpartialdruck
PDE5	Phosphodiesterase-Typ 5
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDGF	platelet-derived growth factor
PH	pulmonale Hypertonie
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
PVR	pulmonal-vaskulärer Widerstand
RHK	Rechtsherzkatheterisierung
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RT	Raumtemperatur
sGC	lösliche Guanylatzyklase

SOD	Superoxid Dismutase
sPAP	Systolischer pulmonal-arterieller Druck
SVR	systolischer pulmonal-arterieller Widerstand
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with tween ²⁰
TFAM	mitochondriale Transkriptionsfaktor-A
TGF	Transforming Growth Factor
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
TIM	translocase-of-the-inner-membrane
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TOM	translocase-of-the-outer-membrane
TTE	Transthorakale Echokardiographie
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
UV	ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
WSPH	World Symposium on Pulmonary Hypertension
WU	Wood Unit

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hämodynamische Definition der PH, nach Simonneau et al. (2019)	2
Tabelle 2: Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie nach Nizza (2018) (Simonneau et al., 2019).....	3
Tabelle 3: Echokardiographische Wahrscheinlichkeit für eine PH, gem. Frost et al.(2019)	8
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte	27
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	29
Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien	30
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Kits und Assays mit Angabe der Bestellnummer und des Herstellers	31

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper.....	31
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software.....	31
Tabelle 11: Charakteristika des Patientenkollektivs aus der Ambulanz,	47
Tabelle 12: Darstellung der Messwerte der Respiration	48

VI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Algorithmus zur Diagnostik bei Verdacht auf eine PH modifiziert nach den ESC/ERS Leitlinien von 2015 (Galiè et al., 2016) und Qi et al. (2020)	10
Abbildung 2: Sepmate nach der Zentrifugation,	33
Abbildung 3: Oroboros Oxygraph (Eigene Aufnahme).....	35
Abbildung 4: Messung der Ruheatmung (Computersoftware <i>Datlab</i>),	37
Abbildung 5: Messung der <i>Leak-Respiration</i> nach Gabe von Oligomycin (Computersoftware <i>Datlab</i>)	38
Abbildung 6: Bestimmung der maximalen Zellatmung (Computersoftware <i>Datlab</i>)	39
Abbildung 7: Darstellung der vollständigen Messung der Zellatmung	40
Abbildung 8: Mitochondriale Atmung aus Kohorte 1, 2 und der gesunden Kontrollgruppe	48
Abbildung 9: Mitochondriale Atmung aus der Kohorte 1 stratifiziert nach dem PVR...49	
Abbildung 10: Darstellung der <i>Respiration Ratios</i> der Kohorte 1	50
Abbildung 11: Mitochondriale Respiration der Kohorte 2 stratifiziert nach dem PVR..51	
Abbildung 12: Regressionsanalyse der maximalen Zellatmung der Kohorte 2.....	52
Abbildung 13: Darstellung der <i>Respiratory Ratios</i> der Patienten aus der Kohorte 2	53
Abbildung 14: Mitochondriale Respiration in Bezug auf den Mutationsstatus	54
Abbildung 15: Darstellung der Proteinanalyse der Kohorte 1	55
Abbildung 16: Darstellung der Proteinanalyse der Kohorte 2	56
Abbildung 17: Darstellung der Proteinanalyse in Bezug auf den Mutationsstatus.....	57
Abbildung 18: Darstellung der antioxidativen Marker aus der Kohorte 1 (A) und der Kohorte 2 (B)	58
Abbildung 19: Darstellung antioxidativen Marker aller Studienteilnehmer (A) sowie gesondert der Mutationsträger (B)	59
Abbildung 20: Darstellung des kleinen Blutbildes (A) sowie CRP und BNP (B) aus der Kohorte 1.....	60

Abbildung 21: Darstellung des kleinen Blutbildes (A) sowie CRP und BNP (B) aus der Kohorte 2.....	61
Abbildung 22: Darstellung der Nieren (A) und Leberwerte (B) aus der Kohorte 1	62
Abbildung 23: Darstellung der Nieren (A) und Leberwerte (B) aus der Kohorte 2	63

VII. Literaturverzeichnis

- ABCAM. (2020). ab102530-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric). Retrieved July 3, 2021, from <https://www.abcam.com/glutathione-peroxidase-assay-kit-colorimetric-ab102530.html>
- Archer, S. L., Gomberg-Maitland, M., Maitland, M. L., Rich, S., Garcia, J. G. N., & Weir, E. K. (2008). Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: A mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 294(2), 570–578. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01324.2007>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Belikova, I., Lukaszewicz, A. C., Faivre, V., Damoiseil, C., Singer, M., & Payen, D. (2007). Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis. *Critical Care Medicine*, 35(12), 2702–2708. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000295593.25106.C4>
- Bendayan, D., Shitrit, D., Ygla, M., Huerta, M., Fink, G., & Kramer, M. R. (2003). Hyperuricemia as a prognostic factor in pulmonary arterial hypertension. *Respiratory Medicine*, 97(2), 130–133. <https://doi.org/10.1053/rmed.2003.1440>
- Bereiter-Hahn and Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells. *Microscopy Res. and Technique.*, 219, 198–219.
- Bio-Rad Laboratories. (2013). DC Protein Assay Instruction Manual. Retrieved July 21, 2021, from <https://www.bio-rad.com/de-de/product/dc-protein-assay?ID=22faf97a-6b8d-4763-8b97-3dc530dcab66>
- Bonnet, S., Michelakis, E. D., Porter, C. J., Andrade-Navarro, M. A., Thébaud, B., Bonnet, S., ... Archer, S. L. (2006). An Abnormal mitochondrial-hypoxia

- inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: Similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, *113*(22), 2630–2641.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008>
- Bose, A., & Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>
- Brasanac, J., Gamradt, S., Otte, C., Milaneschi, Y., Monzel, A. S., Picard, M., & Gold, S. M. (2022). Cellular specificity of mitochondrial and immunometabolic features in major depression. *Molecular Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1038/S41380-022-01473-2>
- Brittain, E. L., Talati, M., Fessel, J. P., Zhu, H., Penner, N., Calcutt, M. W., ... Hemnes, A. R. (2016). Fatty acid metabolic defects and right ventricular lipotoxicity in human pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, *133*(20), 1936–1944.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019351>
- Bull, T. M., Coldren, C. D., Moore, M., Sotto-Santiago, S. M., Pham, D. V., Nana-Sinkam, S. P., ... Geraci, M. W. (2004). Gene microarray analysis of peripheral blood cells in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *170*(8), 911–919.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200312-1686OC>
- Cayman Chemical. (2017). TBARS Assay Kit. Retrieved July 3, 2021, from <https://www.caymanchem.com>
- Cayman Chemical. (2018). Superoxide Dismutase Assay Kit Instructions Superoxide Dismutase Assay Kit. Retrieved July 3, 2021, from <https://www.caymanchem.com/pdfs/706002.pdf>
- Chandhok, G., Lazarou, M., & Neumann, B. (2018). Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. *Biol. Rev*, *93*, 933–949.
<https://doi.org/10.1111/brv.12378>
- Chen, K. H., Dasgupta, A., Lin, J., Potus, F., Bonnet, S., Iremonger, J., ... Archer, S. L. (2018). Epigenetic dysregulation of the dynamin-related protein 1 binding partners MiD49 and MiD51 increases mitotic mitochondrial fission and promotes pulmonary arterial hypertension: Mechanistic and therapeutic implications. *Circulation*, *138*(3), 287–304.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031258>
- Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Revin, V. V., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V.

- (2014). Mitochondrial Aging and Age-Related Dysfunction of Mitochondria. <https://doi.org/10.1155/2014/238463>
- Climent, M., Viggiani, G., Chen, Y. W., Coulis, G., & Castaldi, A. (2020). MicroRNA and ROS crosstalk in cardiac and pulmonary diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21124370>
- Cocco, T., Sgobbo, P., Clemente, M., Lopriore, B., Grattagliano, I., Di Paola, M., & Villani, G. (2005). Tissue-specific changes of mitochondrial functions in aged rats: Effect of a long-term dietary treatment with N-acetylcysteine. *Free Radical Biology and Medicine*, *38*(6), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.034>
- Culley, M. K., & Chan, S. Y. (2018). Mitochondrial metabolism in pulmonary hypertension: Beyond mountains there are mountains. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(9), 3704–3715. <https://doi.org/10.1172/JCI120847>
- Del Dotto, V., Fogazza, M., Carelli, V., Rugolo, M., & Zanna, C. (2018, April 1). Eight human OPA1 isoforms, long and short: What are they for? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.01.005>
- Diebold, L., & Chandel, N. S. (2016). Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *100*, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.198>
- Ding, M., Tolbert, E., Birkenbach, M., Gohh, R., Akhlaghi, F., & Ghonem, N. S. (2021). Treprostinil reduces mitochondrial injury during rat renal ischemia-reperfusion injury. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *141*(June), 111912. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111912>
- Divakaruni, A. S., & Brand, M. D. (2011). The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. *Physiology*, *26*, 192–205. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2010>
- Djafarzadeh, S., & Jakob, S. M. (2017). High-resolution respirometry to assess mitochondrial function in permeabilized and intact cells. *Journal of Visualized Experiments*, *2017*(120), 54985. <https://doi.org/10.3791/54985>
- Dromparis, P., & Michelakis, E. D. (2013). Mitochondria in vascular health and disease. *Annual Review of Physiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183804>
- Dromparis, P., Sutendra, G., & Michelakis, E. D. (2010). The role of mitochondria in

- pulmonary vascular remodeling. *Journal of Molecular Medicine*, 88(10), 1003–1010. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0670-x>
- Faas, M. M., & de Vos, P. (2020). Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(10). <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165845>
- Fernández, A. I., Yotti, R., González-Mansilla, A., Mombiela, T., Gutiérrez-Ibanes, E., Del Villar, C. P., ... Bermejo, J. (2019, December 1). The biological bases of group 2 pulmonary hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20235884>
- Fernando, N., Wickremesinghe, S., Niloofa, R., Rodrigo, C., Karunanayake, L., De Silva, H. J., ... Handunnetti, S. M. (2016). Protein carbonyl as a biomarker of oxidative stress in severe leptospirosis, and its usefulness in differentiating leptospirosis from dengue infections. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0156085>
- Florian, H. (2020). Die gemeinsame Endstrecke Aufnahme der Elektronen in die Atmungskette Die ATP-Synthase. *Biochemie Des Menschen*, 8. Auflage, 262–275.
- Flynn, J. M., & Melov, S. (2013). SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027>
- Forrester, S. J., Preston, K. J., Cooper, H. A., Boyer, M. J., Escoto, K. M., Poltronetti, A. J., ... Eguchi, S. (2020). Mitochondrial Fission Mediates Endothelial Inflammation. *Hypertension*, 76(1), 267–276. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14686>
- Freund-Michel, V., Khoyarattee, N., Savineau, J. P., Muller, B., & Guibert, C. (2014). Mitochondria: Roles in pulmonary hypertension. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 55, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.08.012>
- Freya, T. G., & Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(7), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1)
- Frost, A., Badesch, D., Gibbs, J. S., Gopalan, D., Khanna, D., Manes, A., ... Torbicki, A. (2019). Diagnosis of pulmonary hypertension. In *European Respiratory Journal* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1183/13993003.01904-2018>
- Fu, C., Hao, S., Liu, Z., Xie, L., Wu, X., Wu, X., & Li, S. (2020). SOD2 ameliorates

- pulmonary hypertension in a murine model of sleep apnea via suppressing expression of NLRP3 in CD11b⁺ cells. *Respiratory Research*, 21(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s12931-019-1270-0>
- Galié, N., Badesch, D., Oudiz, R., Simonneau, G., McGoon, M. D., Keogh, A. M., ... Rubin, L. J. (2005). Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(3), 529–535.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.04.050>
- Galié, N., Channick, R. N., Frantz, R. P., Grünig, E., Jing, Z. C., Moiseeva, O., ... McLaughlin, V. V. (2019). Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension. *The European Respiratory Journal*.
<https://doi.org/10.1183/13993003.01889-2018>
- Galié, N., Humbert, M., Vachiery, J. L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., ... Sirenko, Y. (2016). 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal*, 37(1), 67–119.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv317>
- Gnaiger, E. (2011). The Oxygraph for High-Resolution Respirometry (HRR). *Mitochondrial Physiology Network Physiol Network, MiPNet06.0*, 1–18. Retrieved from www.oroboros.at
- Grievink, H. W., Luisman, T., Kluft, C., Moerland, M., & Malone, K. E. (2016). Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and Biobanking*, 14(5), 410–415.
<https://doi.org/10.1089/bio.2015.0104>
- Hearne, A., Chen, H., Monarchino, A., & Wiseman, J. S. (2020). Oligomycin-induced proton uncoupling. *Toxicology in Vitro*, 67(June).
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104907>
- Hecker, M., Sommer, N., Foch, S., Hecker, A., Hackstein, H., Witzenrath, M., ... Mayer, K. (2018). Resolvin E1 and its precursor 18R-HEPE restore mitochondrial function in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(9), 1016–1028.
<https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2018.06.011>
- Hecker, M., Sommer, N., Voigtmann, H., Pak, O., Mohr, A., Wolf, M., ... Mayer, K. (2014). Impact of Short- and Medium-Chain Fatty Acids on Mitochondrial Function in Severe Inflammation. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*,

- 38(5), 587–594. <https://doi.org/10.1177/0148607113489833>
- Hoeper, M. M., Apitz, C., Grünig, E., Halank, M., Ewert, R., Kaemmerer, H., ... Ghofrani, H. A. (2016). Gezielte Therapie der pulmonal arteriellen Hypertonie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. <https://doi.org/10.1055/s-0042-114526>
- Hoeper, M M, Ghofrani, H. A., Gorenflo, M., Grünig, E., Rosenkranz, S., & Schranz, D. (2010). Diagnostik und therapie der pulmonalen hypertonie: Europäische leitlinien 2009. *Kardiologe*. <https://doi.org/10.1007/s12181-010-0269-z>
- Hoeper, M M, Hohlfeld, J. M., & Fabel, H. (1999). Hyperuricaemia in patients with right or left heart failure. *European Respiratory Journal*, 13(3), 682–685. <https://doi.org/10.1183/09031936.99.13368299>
- Hoeper, Marius M., Bogaard, H. J., Condliffe, R., Frantz, R., Khanna, D., Kurzyna, M., ... Badesch, D. B. (2013). Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 62). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.032>
- Hoeper, Marius M., Ghofrani, H. A., Grünig, E., Klose, H., Olschewski, H., & Rosenkranz, S. (2017). Pulmonary hypertension. *Deutsches Arzteblatt International*, 114(5), 73–84. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0073>
- Hoeper, Marius M., Humbert, M., Souza, R., Idrees, M., Kawut, S. M., Sliwa-Hahnle, K., ... Gibbs, J. S. R. (2016). A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet Respiratory Medicine*, 4(4), 306–322. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00543-3)
- Hoeper, Marius M., Huscher, D., & Pittrow, D. (2016). Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *International Journal of Cardiology*, 203, 612–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.11.001>
- Hoeper, Marius M, Ghofrani, H. A., Grünig, E., Klose, H., Olschewski, H., & Rosenkranz, S. (2017). Pulmonary hypertension. *Deutsches Arzteblatt International*, 114(5), 73–84. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0073>
- Hoffmann, J., Wilhelm, J., Olschewski, A., & Kwapiszewska, G. (2016). Microarray analysis in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*. <https://doi.org/10.1183/13993003.02030-2015>
- Huang, L. S., Cobessi, D., Tung, E. Y., & Berry, E. A. (2005). Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc1 complex: A new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *Journal of Molecular Biology*, 351(3), 573–597.

- <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.05.053>
- Hughes, J. M. B. (2016). Hypoxic pulmonary vasoconstriction: Clinical implications. *European Respiratory Journal*, 47(1), 31–34.
<https://doi.org/10.1183/13993003.01753-2015>
- Humbert, M., Guignabert, C., Bonnet, S., Dorfmüller, P., Klinger, J. R., Nicolls, M. R., ... Rabinovitch, M. (2019). Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: State of the art and research perspectives. *European Respiratory Journal*. <https://doi.org/10.1183/13993003.01887-2018>
- Iqbal, M., Cawthon, D., Wideman, R. F., & Bottje, W. G. (2001). Lung mitochondrial dysfunction in pulmonary hypertension syndrome. I. Site-specific defects in the electron transport chain. *Poultry Science*, 80(4), 485–495.
<https://doi.org/10.1093/ps/80.4.485>
- Jang, D. H., Greenwood, J. C., Spyres, M. B., & Eckmann, D. M. (2017). Measurement of Mitochondrial Respiration and Motility in Acute Care. *Journal of Intensive Care Medicine*, 32(1), 86–94. <https://doi.org/10.1177/0885066616658449>
- Jernigan, N. L., Naik, J. S., Weise-Cross, L., Detweiler, N. D., Herbert, L. M., Yellowhair, T. R., & Resta, T. C. (2017). Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *PLoS ONE*, 12(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180455>
- Jia, H., Guo, Z., & Yao, Y. (2018). PDE5 inhibitor protects the mitochondrial function of hypoxic myocardial cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*.
<https://doi.org/10.3892/etm.2018.6951>
- Jiménez-Fernández, S., Gurpegui, | Manuel, Garrote-Rojas, D., Luis Gutiérrez-Rojas, |, Carretero, M. D., & Zucker, B. (2021). Oxidative stress parameters and antioxidants in patients with bipolar disorder: Results from a meta-analysis comparing patients, including stratification by polarity and euthymic status, with healthy controls. *Bipolar Disorders*, 23, 117–129.
<https://doi.org/10.1111/bdi.12980>
- Jonigk, D., Hoeper, M. M., Kreipe, H., & Länger, F. (2012). Histopathologische aspekte der pulmonalen hypertonie. *Pathologe*, 33(3), 183–191.
<https://doi.org/10.1007/s00292-011-1560-x>
- Kang, D., Kim, S. H., & Hamasaki, N. (2007). Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*, 7(1–2), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.11.017>

- Kenwood, B. M., Weaver, J. L., Bajwa, A., Poon, I. K., Byrne, F. L., Murrow, B. A., ...
 Hoehn, K. L. (2014). Identification of a novel mitochondrial uncoupler that does
 not depolarize the plasma membrane. *Molecular Metabolism*, 3(2), 114–123.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.11.005>
- Kim, D., & George, M. P. (2019). Pulmonary Hypertension. *Medical Clinics of North
 America*, 103(3), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.002>
- Klinger, J. R. (2016). Group III Pulmonary Hypertension: Pulmonary Hypertension
 Associated with Lung Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Treatments.
Cardiology Clinics, 34(3), 413–433. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2016.04.003>
- Klopstock, T., & Bender, A. (2008). Mitochondrien: Von der frühen Evolution zu den
 altersassoziierten erkrankungen des Menschen. *Neuroforum*, 14(3), 224–232.
<https://doi.org/10.1515/nf-2008-0304>
- Kohchi, C., Inagawa, H., Nishizawa, T., & Soma, G. I. (2009). ROS and innate
 immunity. *Anticancer Research*, 29(3), 817–822.
- Kondo, T., Okumura, N., Adachi, S., & Murohara, T. (2019). Pulmonary hypertension:
 Diagnosis, management, and treatment. *Nagoya Journal of Medical Science*, 81(1),
 19–30. <https://doi.org/10.18999/nagjms.81.1.19>
- Kraus, F., Roy, K., Pucadyil, T. J., & Ryan, M. T. (2021, February 4). Function and
 regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature*. Nature Research.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03214-x>
- Kwan, W. C., Shavelle, D. M., & Laughrun, D. R. (2019). Pulmonary vascular
 resistance index: Getting the units right and why it matters. *Clinical Cardiology*.
<https://doi.org/10.1002/clc.23151>
- Lannan, K. L., Phipps, R. P., & White, R. J. (2014). Thrombosis, platelets,
 microparticles and PAH: More than a clot. *Drug Discovery Today*, 19(8), 1230–
 1235. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.04.001>
- Lee, H., & Yoon, Y. (2016). Mitochondrial fission and fusion. *Biochemical Society
 Transactions*, 44(6), 1725–1735. <https://doi.org/10.1042/BST20160129>
- Leuchte, H. H., El Nounou, M., Tuerpe, J. C., Hartmann, B., Baumgartner, R. A.,
 Vogeser, M., ... Behr, J. (2007). N-terminal pro-brain natriuretic peptide and renal
 insufficiency as predictors of mortality in pulmonary hypertension. *Chest*, 131(2),
 402–409. <https://doi.org/10.1378/chest.06-1758>
- Lewis, M. R., & Lewis, W. H. (1914). Mitochondria in tissue culture. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.39.1000.330>

- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(3), 211–218.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Linnemann, M., & Kühl, M. (2003). Citratzyklus und Atmungskette. In *Biochemie für Mediziner* (pp. 308–342). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06057-5_8
- Löffler, G. (2013). Der Cytratzkyklus. In *Biochemie und Pathobiochemie* (pp. 519–529). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>
- Lücke, E., Schmeißer, A., & Schreiber, J. (2019). Pulmonale Hypertonie : Diagnostik , Klassifikation und Therapie. *AINS*, 320–333.
- Machado, R. D., Eickelberg, O., Elliott, C. G., Geraci, M. W., Hanaoka, M., Loyd, J. E., ... Chung, W. K. (2009, June 30). Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.015>
- Marsboom, G., Toth, P. T., Ryan, J. J., Hong, Z., Wu, X., Fang, Y. H., ... Archer, S. L. (2012). Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circulation Research*, *110*(11), 1484–1497.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.263848>
- Matsue, H., Edelbaum, D., Shalhevet, D., Mizumoto, N., Yang, C., Mummert, M. E., ... Takashima, A. (2003). Generation and Function of Reactive Oxygen Species in Dendritic Cells During Antigen Presentation. *The Journal of Immunology*, *171*(6), 3010–3018. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.3010>
- Matthys, H., Konietzko, N., Schlehe, H., & Rühle, K. H. (2016). Pulmonale Hypertonie. *Der Anästhesist*, *8*, 635–652. <https://doi.org/10.1007/BF01468289>
- Miao, L., & St. Clair, D. K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*(4), 344–356.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018>
- Michelakis, E. D., Gurtu, V., Webster, L., Barnes, G., Watson, G., Howard, L., ... Wilkins, M. R. (2017). Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves pulmonary arterial hypertension in genetically susceptible patients. *Science Translational Medicine*, *9*(413), 1–13.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao4583>
- Miranda, S., Foncea, R., Guerrero, J., & Leighton, F. (1999). Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted

- HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(1), 44–49. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0580>
- Morrell, N. W., Aldred, M. A., Chung, W. K., Elliott, C. G., Nichols, W. C., Soubrier, F., ... Loyd, J. E. (2019). Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. In *European Respiratory Journal* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1183/13993003.01899-2018>
- Motori, E., Puyal, J., Toni, N., Ghanem, A., Angeloni, C., Malaguti, M., ... Bergami, M. (2013). Inflammation-induced alteration of astrocyte mitochondrial dynamics requires autophagy for mitochondrial network maintenance. *Cell Metabolism*, 18(6), 844–859. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.005>
- Nagaya, N., Uematsu, M., Satoh, T., Kyotani, S., Sakamaki, F., Nakanishi, N., ... Miyatake, K. (1999). Serum uric acid levels correlate with the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(2), 487–492. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.2.9812078>
- Nguyen, Q. L., Corey, C., White, P., Watson, A., Gladwin, M. T., Simon, M. A., & Shiva, S. (2017). Platelets from pulmonary hypertension patients show increased mitochondrial reserve capacity. *JCI Insight*, 2(5). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91415>
- Nickel, N. P., Yuan, K., Dorfmuller, P., Provencher, S., Lai, Y. C., Bonnet, S., ... De Jesus Perez, V. A. (2020). Beyond the lungs: Systemic manifestations of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1164/rccm.201903-0656CI>
- No, C. (2018). Protein Carbonyl ELISA Kit. Retrieved July 3, 2021, from <https://www.enzolifesciences.com>
- Nozik-Grayck, E., Woods, C., Taylor, J. M., Benninger, R. K. P., Johnson, R. D., Villegas, L. R., ... Farrow, K. N. (2014). Selective depletion of vascular EC-SOD augments chronic hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(11), L868–L876. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00096.2014>
- Parra, V., Bravo-Sagua, R., Norambuena-Soto, I., Hernández-Fuentes, C. P., Gómez-Contreras, A. G., Verdejo, H. E., ... Castro, P. F. (2017). Inhibition of mitochondrial fission prevents hypoxia-induced metabolic shift and cellular proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Biochimica et Biophysica*

- Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(11), 2891–2903.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.018>
- Paulin, R., & Michelakis, E. D. (2014). The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. *Circulation Research*, 115(1), 148–164.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.301130>
- Pesta, D., Gnaiger, E., Pesta, D., & Gnaiger, E. (2012). High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. *Methods in Molecular Biology*, 810, 25–58.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3
- Pikal-Cleland, K. A., Rodríguez-Hornedo, N., Amidon, G. L., & Carpenter, J. F. (2000). Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: Monomeric and tetrameric β -galactosidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(2), 398–406. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2088>
- Qi, J., Xing, Y., Zhao, X., Zhu, D., & Zheng, X. (2020). Advanced Diagnosis and Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *Nano LIFE*, 10(01n02), 2040003.
<https://doi.org/10.1142/s1793984420400036>
- Quatredeniens, M., Mendes-Ferreira, P., Santos-Ribeiro, D., Nakhleh, M. K., Ghigna, M.-R., Cohen-Kaminsky, S., ... Chan, S. Y. (2021). cells Iron Deficiency in Pulmonary Arterial Hypertension: A Deep Dive into the Mechanisms.
<https://doi.org/10.3390/cells10020477>
- Rabinovitch, M., Guignabert, C., Humbert, M., & Nicolls, M. R. (2014). Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circulation Research*, 115(1), 165–175. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301141>
- Ranchoux, B., Meloche, J., Paulin, R., Boucherat, O., Provencher, S., & Bonnet, S. (2016, June 22). DNA damage and pulmonary hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17060990>
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2016). Mitochondrien. In *Duale Reihe Biochemie* (4. Auflage, pp. 379–382). George-Thieme Verlag.
https://doi.org/10.1007/978-3-663-06822-8_9
- Redout, E. M., Wagner, M. J., Zuidwijk, M. J., Boer, C., Musters, R. J. P., van Hardeveld, C., ... Simonides, W. S. (2007). Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research*, 75(4), 770–781.
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.05.012>

- Rose, S., Niyazov, D. M., Rossignol, D. A., Goldenthal, M., Kahler, S. G., & Frye, R. E. (2018). Clinical and Molecular Characteristics of Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. *Molecular Diagnosis and Therapy*.
<https://doi.org/10.1007/s40291-018-0352-x>
- Rosenkranz, S., Behr, J., Ewert, R., Ghofrani, H. A., Grnig, E., Halank, M., ... Opitz, C. F. (2011). Rechtsherzkatheter-Untersuchung bei pulmonaler Hypertonie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1292858>
- Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Diaz-Morales, N., Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., & Victor, V. M. (2017, April 1). Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biology*. Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.013>
- Rutai, A., Fejes, R., Juhász, L., Tallósy, S. P., Poles, M. Z., Földesi, I., ... Kaszaki, J. (2020). Endothelin a and B Receptors: Potential Targets for Microcirculatory-Mitochondrial Therapy in Experimental Sepsis. *Shock*, *54*(1), 87–95.
<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001414>
- Ryan, J., Dasgupta, A., Huston, J., Chen, K. H., & Archer, S. L. (2015). Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Molecular Medicine*.
<https://doi.org/10.1007/s00109-015-1263-5>
- Ryan, J. J., Marsboom, G., Fang, Y. H., Toth, P. T., Morrow, E., Luo, N., ... Archer, S. L. (2013). PGC1 α -mediated mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *187*(8), 865–878. <https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1687OC>
- Saki, N., Abroun, S., Soleimani, M., Hajizamani, S., & Shahjahani, M. (2015). Involvement of MicroRNA in AU-Rich.pdf.crdownload, *9*(1).
- Salibe-Filho, W., Araujo, T. L. S., Melo, E. G., Coimbra, L. B. C. T., Lapa, M. S., Acencio, M. M. P., ... Terra-Filho, M. (2020). Shear stress-exposed pulmonary artery endothelial cells fail to upregulate HSP70 in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *PLoS ONE*, *15*(12 December).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0242960>
- Scaini, G., Mason, B.L., Diaz, A. P. et al. (2021). Dysregulation of mitochondrial dynamics, mitophagy and apoptosis in major depressive disorder: Does inflammation play a role? *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01312-w>
- Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., & Grimminger, F. (2011).

- Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology*. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.87>
- Serasinghe, M. N., & Chipuk, J. E. (2017). Mitochondrial fission in human diseases. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 240, pp. 159–188). https://doi.org/10.1007/164_2016_38
- Siewiera, K., Labieniec-Watala, M., Wolska, N., Kassassir, H., & Watala, C. (2021). Sample Preparation as a Critical Aspect of Blood Platelet Mitochondrial Respiration Measurements-The Impact of Platelet Activation on Mitochondrial Respiration. *International Journal of Molecular Sciences Article*. <https://doi.org/10.3390/ijms22179332>
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., ... Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. In *European Respiratory Journal* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
- Simonneau, G., Torbicki, A., Dorfmüller, P., & Kim, N. (2017). The pathophysiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *European Respiratory Review*, 26(143). <https://doi.org/10.1183/16000617.0112-2016>
- Singh, I., Ma, K. C., & Berlin, D. A. (2016). Pathophysiology of Pulmonary Hypertension in Chronic Parenchymal Lung Disease. *American Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.11.026>
- Sjövall, F., Ehinger, J. K. H., Marelsson, S. E., Morota, S., Åsander Frostner, E., Uchino, H., ... Elmér, E. (2013). Mitochondrial respiration in human viable platelets-Methodology and influence of gender, age and storage. *Mitochondrion*, 13(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2012.11.001>
- Sommer, N, Waisbrod, S., Krug, P., Behmanesh, B., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., ... Pak, N. O. (2011). Mitochondrial Alterations Of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells In Pulmonary Hypertension. Retrieved from www.atsjournals.org
- Sommer, Natascha, Strielkov, I., Pak, O., & Weissmann, N. (2016). Oxygen sensing and signal transduction in hypoxia pulmonary vasoconstriction. *European Respiratory Journal*. <https://doi.org/10.1183/13993003.00945-2015>
- Sommer, Natascha, Theine, F. F., Pak, O., Tello, K., Richter, M., Gall, H., ... Hecker, M. (2022). Mitochondrial Respiration in Peripheral Blood Mononuclear Cells Negatively Correlates with Disease Severity in Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of Clinical Medicine*, 11(14). <https://doi.org/10.3390/jcm11144132>

- Suárez-Rivero, J., Villanueva-Paz, M., de la Cruz-Ojeda, P., de la Mata, M., Cotán, D., Oropesa-Ávila, M., ... Sánchez-Alcázar, J. (2016). Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases*, 5(1), 1.
<https://doi.org/10.3390/diseases5010001>
- Sureda, A., Martorell, M., Bibiloni, M. del M., Bouzas, C., Gallardo-Alfaro, L., Mateos, D., ... Pons, A. (2020). Effect of free fatty acids on inflammatory gene expression and hydrogen peroxide production by ex vivo blood mononuclear cells. *Nutrients*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/nu12010146>
- Sutendra, G., & Michelakis, E. D. (2014). The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. *Cell Metabolism*, 19(4), 558–573.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.004>
- Thenappan, T., Chan, S. Y., & Kenneth Weir, E. (2018). Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *REVIEW Extracellular Matrix in Cardiovascular Pathophysiology Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 315, 1322–1331. <https://doi.org/10.1152/ajpheart>
- Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., & Archer, S. L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: Pathogenesis and clinical management. *BMJ (Online)*, 360(fig 1).
<https://doi.org/10.1136/bmj.j5492>
- Tian, L., Potus, F., Wu, D., Dasgupta, A., Chen, K. H., Mewburn, J., ... Archer, S. L. (2018). Increased Drp1-mediated mitochondrial fission promotes proliferation and collagen production by right ventricular fibroblasts in experimental pulmonary arterial hypertension. *Frontiers in Physiology*, 9(JUL).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00828>
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, 62, 341–360.
<https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
- Ulrich, S., Taraseviciene-Stewart, L., Huber, L. C., Speich, R., & Voelkel, N. (2008). Peripheral blood B lymphocytes derived from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension express a different RNA pattern compared with healthy controls: a cross sectional study. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-20>
- van der Blik, A. M., Shen, Q., & Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011072>
- Vendelbo, M. H., & Nair, K. S. (2011). Mitochondrial longevity pathways. *Biochimica*

- et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(4), 634–644.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2011.01.029>
- Vrigkou, E., Tsantes, A. E., Kopterides, P., Orfanos, S. E., Armaganidis, A., Maratou, E., ... Tsangaris, I. (2020). Coagulation profiles of pulmonary arterial hypertension patients, assessed by non-conventional hemostatic tests and markers of platelet activation and endothelial dysfunction. *Diagnostics*, 10(10).
<https://doi.org/10.3390/diagnostics10100758>
- Wang, S., Song, J., Tan, M., Albers, K. M., & Jia, J. (2012). Mitochondrial fission proteins in peripheral blood lymphocytes are potential biomarkers for Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 19(7), 1015–1022.
<https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03670.x>
- Wang, Y., & McLean, A. S. (2022). The Role of Mitochondria in the Immune Response in Critical Illness. *Critical Care*, 26(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13054-022-03908-2>
- Warwick, G., Thomas, P. S., & Yates, D. H. (2008). Biomarkers in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00160307>
- Williams, R., & Chance, B. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *The Journal of Biological Chemistry*, 217(1), 409–427.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)57191-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)57191-5)
- Williams, R., & Chance, B. (1956). The Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (Vol. 17, pp. 65–134). Interscience Publishers.
<https://doi.org/10.1002/9780470122624.ch2>
- Xie, J. H., Li, Y. Y., & Jin, J. (2020). The essential functions of mitochondrial dynamics in immune cells. *Cellular and Molecular Immunology*.
<https://doi.org/10.1038/s41423-020-0480-1>
- Xu, W., Koeck, T., Lara, A. R., Neumann, D., DiFilippo, F. P., Koo, M., ... Erzurum, S. C. (2007). Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), 1342–1347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605080104>
- Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J., & Karakhanova, S. (2013). Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology*, 32(3), 249–270. <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>

- Yu, Q., & Chan, S. Y. (2017). Mitochondrial and metabolic drivers of pulmonary vascular endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 967, pp. 373–383).
https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_24
- Yu, R., Jin, S., Lendahl, U., Nistér, M., & Zhao, J. (2019). Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery. *The EMBO Journal*, 38(8), 1–21. <https://doi.org/10.15252/emj.201899748>
- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, 877(March), 173090.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>
- Zemirli, N., Morel, E., & Molino, D. (2018). Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. *International Journal of Molecular Sciences*.
<https://doi.org/10.3390/ijms19020564>
- Zhang, J., Hao, H., Wu, X., Wang, Q., Chen, M., Feng, Z., & Chen, H. (2020). The functions of glutathione peroxidase in ROS homeostasis and fruiting body development in *Hypsizygus marmoreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(24), 10555–10570. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10981-6>

VIII. Anhang

Anhang 1: Probanden-Information und -Einwilligung zur Teilnahme an der Studie

**Probanden-Information und -Einwilligung
zur Durchführung einer wissenschaftlichen Studie
mit volljährigen einwilligungsfähigen Probanden¹**

Prüfstelle: Uniklinikum Giessen

Prüfartz: Dr. Sommer, PD Dr. M. Hecker, PD Dr. Gall, Dr. Tello, Dr. Richter, Dr. Donescu

Analyse der mitochondrialen Funktion von PBMC bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie fragen, ob Sie bereit sind, an der nachfolgend beschriebenen wissenschaftlichen Studie teilzunehmen.

Wissenschaftliche Studien sind notwendig, um Erkenntnisse über die Wirksamkeit und Verträglichkeit von medizinischen Behandlungsmethoden zu gewinnen oder zu erweitern. Die wissenschaftliche Studie, die wir Ihnen hier vorstellen, wurde von der zuständigen Ethikkommission zustimmend bewertet. Diese wissenschaftliche Prüfung wird in Giessen durchgeführt. Die Studie wird veranlasst, organisiert und finanziert durch das Uniklinikum Giessen, dem Verantwortlichen für diese Studie.

Ihre Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Studie ist freiwillig. Sie werden in diese Prüfung also nur dann einbezogen, wenn Sie dazu schriftlich Ihre Einwilligung erklären. Sofern Sie nicht an der wissenschaftlichen Studie teilnehmen oder später aus ihr ausscheiden möchten, erwachsen Ihnen daraus keine Nachteile.

Sie wurden bereits auf die geplante Studie angesprochen. Der nachfolgende Text soll Ihnen die Ziele und den Ablauf erläutern. Anschließend wird ein Prüfartz das Aufklärungsgespräch mit Ihnen führen. Bitte zögern Sie nicht, alle Punkte anzusprechen, die Ihnen unklar sind. Sie werden danach ausreichend Bedenkzeit erhalten, um über Ihre Teilnahme zu entscheiden.

1. Warum wird diese Studie durchgeführt?

Von der Durchführung der vorgesehenen Studie erhoffen wir uns neue wissenschaftliche Erkenntnisse bezüglich der Entstehung und es Verlaufes der pulmonalen Hypertonie. Eine wichtige Komponente in der Entstehung dieser Erkrankung könnte an einer Fehlfunktion der Mitochondrien, welche für den Energiehaushalt des Körpers entscheidend sind, liegen. Die Auswirkungen dieser Fehlfunktion sind gerade bei der pulmonalen Hypertonie bislang nur unzureichend verstanden und untersucht. In unserer Studie soll daher nach Entnahme von 20 ml Blut die Funktion der Mitochondrien überprüft werden. Durch die Untersuchung erhoffen wir uns, mehr Einblick in die Entstehung und den Verlauf dieser Erkrankung zu erlangen und einen möglichen Einfluss der Mitochondrien besser zu verstehen. Ferner könnte zukünftig die mitochondrialen Fehlfunktion durch Gabe von mitochondrial wirksamen Substanzen modifiziert werden.

¹ Im Rahmen dieses Textes schließt die männliche Bezeichnung stets die weibliche Bezeichnung mit ein.

**Probanden-Information und -Einwilligung
zur Durchführung einer wissenschaftlichen Studie
mit volljährigen einwilligungsfähigen Probanden¹**

Prüfstelle: Uniklinikum Giessen

Prüfarzt: Dr. Sommer, PD Dr. M. Hecker, PD Dr. Gall, Dr. Tello, Dr. Richter, Dr. Donescu

Analyse der mitochondrialen Funktion von PBMC bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie fragen, ob Sie bereit sind, an der nachfolgend beschriebenen wissenschaftlichen Studie teilzunehmen.

Wissenschaftliche Studien sind notwendig, um Erkenntnisse über die Wirksamkeit und Verträglichkeit von medizinischen Behandlungsmethoden zu gewinnen oder zu erweitern. Die wissenschaftliche Studie, die wir Ihnen hier vorstellen, wurde von der zuständigen Ethikkommission zustimmend bewertet. Diese wissenschaftliche Prüfung wird in Giessen durchgeführt. Die Studie wird veranlasst, organisiert und finanziert durch das Uniklinikum Giessen, dem Verantwortlichen für diese Studie.

Ihre Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Studie ist freiwillig. Sie werden in diese Prüfung also nur dann einbezogen, wenn Sie dazu schriftlich Ihre Einwilligung erklären. Sofern Sie nicht an der wissenschaftlichen Studie teilnehmen oder später aus ihr ausscheiden möchten, erwachsen Ihnen daraus keine Nachteile.

Sie wurden bereits auf die geplante Studie angesprochen. Der nachfolgende Text soll Ihnen die Ziele und den Ablauf erläutern. Anschließend wird ein Prüfarzt das Aufklärungsgespräch mit Ihnen führen. Bitte zögern Sie nicht, alle Punkte anzusprechen, die Ihnen unklar sind. Sie werden danach ausreichend Bedenkzeit erhalten, um über Ihre Teilnahme zu entscheiden.

1. Warum wird diese Studie durchgeführt?

Von der Durchführung der vorgesehenen Studie erhoffen wir uns neue wissenschaftliche Erkenntnisse bezüglich der Entstehung und des Verlaufes der pulmonalen Hypertonie. Eine wichtige Komponente in der Entstehung dieser Erkrankung könnte an einer Fehlfunktion der Mitochondrien, welche für den Energiehaushalt des Körpers entscheidend sind, liegen. Die Auswirkungen dieser Fehlfunktion sind gerade bei der pulmonalen Hypertonie bislang nur unzureichend verstanden und untersucht. In unserer Studie soll daher nach Entnahme von 20 ml Blut die Funktion der Mitochondrien überprüft werden. Durch die Untersuchung erhoffen wir uns, mehr Einblick in die Entstehung und den Verlauf dieser Erkrankung zu erlangen und einen möglichen Einfluss der Mitochondrien besser zu verstehen. Ferner könnte zukünftig die mitochondriale Fehlfunktion durch Gabe von mitochondrial wirksamen Substanzen modifiziert werden.

¹ Im Rahmen dieses Textes schließt die männliche Bezeichnung stets die weibliche Bezeichnung mit ein.

2. Wie ist der Ablauf der Studie und was muss ich bei Teilnahme beachten?

Bei einer Routineblutentnahme werden Ihnen zusätzlich zu den klinisch indizierten Proben etwa 20 ml Blut abgenommen. Bei weiteren Routineblutentnahmen können evtl. erneut 20 ml Blut abgenommen werden.

3. Welchen persönlichen Nutzen habe ich von der Teilnahme an der Studie?

Sie werden durch die Teilnahme an dieser Studie keinen persönlichen Gesundheitsnutzen haben. Die Ergebnisse der Studie können aber möglicherweise dazu beitragen, die Behandlung von pulmonaler Hypertonie zukünftig zu verbessern/besser beurteilen zu können.

4. Welche Risiken sind mit der Teilnahme an der Studie verbunden?

Eine Blutentnahme kann zu unerwünschten Wirkungen oder Beschwerden führen. Die bislang beobachteten unerwünschten Wirkungen und Beschwerden umfassen:

- Schmerz
- Nachblutung
- Infektion
- Irreversible Nervenschädigungen
- Verletzung von Gewebe
- Thrombosierung des Gefäßes
- Kreislaufreaktionen

Bitte teilen Sie den Mitarbeitern der Prüfstelle *alle* Beschwerden, Erkrankungen oder Verletzungen mit, die im Verlauf der wissenschaftlichen Studie auftreten. Falls diese schwerwiegend sind, teilen Sie den Mitarbeitern der Prüfstelle diese bitte umgehend mit, ggf. telefonisch.

5. Wer darf an dieser wissenschaftlichen Studie nicht teilnehmen?

Patienten ohne gültige Einwilligungserklärung.

6. Entstehen für mich Kosten durch die Teilnahme an der wissenschaftlichen Studie? Erhalte ich eine Aufwandsentschädigung?

Durch Ihre Teilnahme an dieser klinischen Studie entstehen für Sie keine zusätzlichen Kosten. Für Ihre Teilnahme an dieser klinischen Studie erhalten Sie keine Aufwandsentschädigung.

7. Bin ich während der wissenschaftlichen Prüfung versichert?

Bei der wissenschaftlichen Studie sind Sie gemäß der Betriebshaftpflichtversicherung des Klinikums versichert.

Bei der Aufklärung der Ursache oder des Umfangs eines Schadens müssen Sie mitwirken und alles unternehmen, um den Schaden abzuwenden und zu mindern.

Auf Wunsch erhalten Sie ein Exemplar der Versicherungsbedingungen.

Wir weisen Sie ferner darauf hin, dass Sie auf dem Weg von und zur Prüfstelle nicht unfallversichert sind/in folgender Weise versichert sind.

8. Werden mir neue Erkenntnisse während der wissenschaftlichen Studie mitgeteilt?

Sie werden über neue Erkenntnisse, die in Bezug auf diese wissenschaftliche Studie bekannt werden und die für Ihre Bereitschaft zur weiteren Teilnahme wesentlich sein können, informiert. Auf dieser Basis können Sie dann Ihre Entscheidung zur weiteren Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Prüfung überdenken.

9. Wer entscheidet, ob ich aus der wissenschaftlichen Studie ausscheide?

Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahme beenden, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile entstehen.

10. Was geschieht mit meinen Daten?

Während der wissenschaftlichen Studie werden medizinische Befunde und persönliche Informationen von Ihnen erhoben und in der Prüfstelle in Ihrer persönlichen Akte niedergeschrieben oder elektronisch gespeichert. Die für die wissenschaftliche Studie wichtigen Daten werden zusätzlich in pseudonymisierter Form gespeichert, ausgewertet und gegebenenfalls weitergegeben. Pseudonymisiert bedeutet, dass keine Angaben von Namen oder Initialen verwendet werden, sondern nur ein Nummern- und/oder Buchstabencode, evtl. mit Angabe des Geburtsjahres.

Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Eine Entschlüsselung erfolgt nur unter den vom Gesetz vorgeschriebenen Voraussetzungen. Einzelheiten entnehmen Sie bitte der Einwilligungserklärung, die im Anschluss an diese Probandeninformation abgedruckt ist.

11. Was geschieht mit meinen Blutproben / Gewebeproben / Aufnahmen mit bildgebenden Verfahren (an die jeweilige Studie anpassen)?

Die Blutproben werden ausschließlich für diese wissenschaftliche Studie verwendet. Etwas Restmaterial wird bei Abschluss der Prüfung vernichtet.

12. An wen wende ich mich bei weiteren Fragen?

Beratungsgespräche an der Prüfstelle

Sie haben stets die Gelegenheit zu weiteren Beratungsgesprächen mit dem auf Seite 1 genannten oder einem anderen Prüfarzt.

Prüfstelle: Uniklinikum Giessen

Prüfarzt: Dr. Sommer, PD Dr. M. Hecker, PD Dr. Gall, Dr. Tello, Dr. Richter, Dr. Donescu

Analyse der mitochondrialen Funktion von PBMC bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie

Einwilligungserklärung

.....
Name des Probanden in Druckbuchstaben

geb. am Teilnehmer-Nr.

Ich bin in einem persönlichen Gespräch durch den Prüfarzt

.....
Name der Ärztin/des Arztes

ausführlich und verständlich über die zu prüfende Behandlungsmethode und die Vergleichsmethode sowie über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der wissenschaftlichen Studie aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text der Probandeninformation sowie die hier nachfolgend abgedruckte Datenschutzerklärung gelesen und verstanden. Ich hatte die Gelegenheit, mit dem Prüfarzt über die Durchführung der wissenschaftlichen Prüfung zu sprechen. Alle meine Fragen wurden zufrieden stellend beantwortet.

Möglichkeit zur Dokumentation zusätzlicher Fragen seitens des Probanden oder sonstiger Aspekte des Aufklärungsgesprächs:

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden.

Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Prüfung zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir irgendwelche Nachteile entstehen.

Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei dieser wissenschaftlichen Prüfung personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der wissenschaftlichen Prüfung folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, das heißt ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der wissenschaftlichen Prüfung teilnehmen.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser wissenschaftlichen Studie personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, über mich erhoben und in Papierform sowie auf elektronischen Datenträgern im Uniklinikum Giessen aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden an Dr. Sommer, den Verantwortlichen oder eine von diesem beauftragte Stelle zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung.
2. Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte des Verantwortlichen sowie die zuständigen Überwachungsbehörden in meine beim Prüfarzt vorhandenen personenbezogenen Daten, insbesondere meine Gesundheitsdaten, Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfarzt von der ärztlichen Schweigepflicht.
3. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der wissenschaftlichen Prüfung beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden. Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen, die meine personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten, gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten zu dem vorgenannten Zweck noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.
4. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie zehn Jahre aufbewahrt werden. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen (*vertraglich vereinbarte Fristen müssen hier genannt werden*).
6. Ich bin damit einverstanden, dass mein Hausarzt

.....
Name

über meine Teilnahme an der wissenschaftlichen Studie informiert wird (falls nicht gewünscht, bitte streichen).

IX. Publikationsverzeichnis

Mitochondrial Respiration in Peripheral Blood Mononuclear Cells Negatively Correlates with Disease Severity in Pulmonary Arterial Hypertension

Sommer, Natascha, Theine, F. F., Pak, O., Tello, K., Richter, M., Gall, H., ... Hecker, M. (2022). Mitochondrial Respiration in Peripheral Blood Mononuclear Cells Negatively Correlates with Disease Severity in Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of Clinical Medicine*, 11(14). <https://doi.org/10.3390/jcm11144132>

X. Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

XI. Danksagung

Meine größte Dankbarkeit möchte ich zuallererst Frau Dr. Natascha Sommer sowie Herrn Prof. Dr. Matthias Hecker aussprechen. Sie beide haben mir diese Arbeit erst ermöglichen können und mich über die komplette Zeit hervorragend begleitet, mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mit motivierenden Worten neuen Elan verliehen.

Ganz besonderen Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe. Besonders hervorheben möchte ich hier Andrea Mohr sowie Katharina Kopsch, ohne deren Wissen, Hilfe, sowie aufmunternden Worte bei Rückschlägen, die Durchführung der meisten Experimente sowie das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte außerdem meinen Eltern danken, die mir das Studium ermöglicht haben und mich auf dem langen Wege des Studiums, sowie bei der Erstellung dieser Arbeit immer unterstützt haben. Sie haben mit mir all die kleinen und größeren Erfolge zusammen gefeiert und mir in den schwierigeren Phasen immer zur Seite gestanden.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Schwester bedanken, die ebenfalls immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hatte und unterstützend hinter mir stand.