

**Beteiligung der Lunge bei einer extremen
Rechtsherzhypertrophie in spontan hypertensiven Ratten**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Langer, Alicia Victoria

Aus Gießen

Gießen 2025

**Beteiligung der Lunge bei einer extremen
Rechtsherzhypertrophie in spontan hypertensiven Ratten**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Langer, Alicia Victoria

Aus Gießen

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Physiologisches Institut

Gutachter/in: Prof. Dr. Schlüter, Klaus-Dieter

Gutachter/in: Prof. Dr. Tello, Khodr

Tag der Disputation: 04.12.2025

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| 1 Abkürzungsverzeichnis | 4 |
| 2 Einleitung | 10 |
| 2.1 Die Physiologie des rechten Ventrikels | 10 |
| 2.2 Rechtsherzhypertrophie und Rechtsherzinsuffizienz | 11 |
| 2.3 Pulmonale Hypertonie als Risikofaktor für Rechtsherzhypertrophie | 13 |
| 2.4 Die Lunge als Trigger einer Rechtsherzhypertrophie | 15 |
| 2.4.1 Das Endothelin-System in der Lunge und PH | 15 |
| 2.4.2 Parathormon verwandtes Peptid (PTHLP) in der Lunge und PH | 16 |
| 2.4.3 Das Endothelin-System im rechten Ventrikel und Rechtsherzhypertrophie | |
| 16 | |
| 2.4.4 Hypoxie-assoziierte Gene im Zusammenspiel mit der Entstehung einer | |
| Rechtsherzhypertrophie..... | 17 |
| 2.5 Spontan hypertensive Ratten (SHR) als Tiermodell | 18 |
| 2.6 Zusammenfassung und Fragestellung des Projekts | 19 |
| 3 Material | 21 |
| 3.1 Geräte und Labormaterial | 21 |
| 3.1.1 Allgemein verwendete Geräte..... | 21 |
| 3.1.2 Computerprogramme | 21 |
| 3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 21 |
| 3.1.4 Western Blot..... | 22 |
| 3.1.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 22 |
| 3.2 Verbrauchsmaterial | 23 |
| 3.3 Chemikalien und Substanzen | 23 |
| 3.4 Primer | 25 |
| 3.5 Antikörper | 28 |
| 3.5.1 Primäre Antikörper..... | 28 |
| 3.5.2 Sekundäre Antikörper | 29 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.6 | Tierkollektiv und Gewebe | 29 |
| 3.6.1 | Die funktionelle Einschränkung der Rechtsherzhypertrophie in SHR-RVH | |
| | 31 | |
| 4 | Methoden..... | 33 |
| 4.1 | Aufbau des Projekts | 33 |
| 4.2 | RT-PCR..... | 34 |
| 4.2.1 | Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation | 34 |
| 4.2.2 | RNA-Quantifizierung/ NanoDrop..... | 35 |
| 4.2.3 | cDNA-Synthese..... | 36 |
| 4.2.4 | DNA-Amplifikation | 37 |
| 4.3 | Gelelektrophoretischer Proteinnachweis | 38 |
| 4.3.1 | Aufbereitung der Probe/Proteinisolation..... | 38 |
| 4.3.2 | Proteinnormierung..... | 38 |
| 4.3.3 | Gelelektrophorese..... | 39 |
| 4.3.4 | Western-Blot | 40 |
| 4.3.5 | Proteinnachweis | 40 |
| 4.4 | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)..... | 41 |
| 4.4.1 | Aufbereitung der Probe | 41 |
| 4.4.2 | Durchführung des ELISAs | 42 |
| 4.5 | Statistik..... | 43 |
| 5 | Ergebnisse | 44 |
| 5.1 | Transkriptionelle Genalterationen in der Lunge von SHR-RVH vs. SHR | 44 |
| 5.2 | Das Endothelin-System in der Lunge von SHR-RVH auf den | |
| | verschiedenen Ebenen..... | 46 |
| 5.2.1 | Die Genexpression des Endothelin-Systems..... | 46 |
| 5.2.2 | Der Einfluss der Genexpression auf die Konzentration von ET-1 | 48 |
| 5.3 | PTHLP in der Lunge von SHR-RVH..... | 48 |
| 5.4 | Transkriptionelle Genalterationen im rechten Ventrikel von SHR-RVH | |
| | vs. SHR..... | 49 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.5 | Das Endothelin-System im rechten Ventrikel von SHR-RVH..... | 53 |
| 5.6 | Die Expression Hypoxie-assoziiierter Gene in der Niere der SHR-RVH.. | 55 |
| 6 | Diskussion der Erkenntnisse | 56 |
| 6.1 | Hauptbefunde der Arbeit | 56 |
| 6.2 | Diskussion der Ergebnisse | 57 |
| 6.2.1 | Molekulargenetische Veränderungen der Lunge von SHR-RVH..... | 57 |
| 6.2.2 | Molekulargenetische Veränderungen des rechten Ventrikels von SHR-RVH | 60 |
| 6.3 | Einordnung der Ergebnisse in den Gesamtzusammenhang | 61 |
| 6.4 | Schlussfolgerungen der Arbeit..... | 62 |
| 7 | Zusammenfassung..... | 63 |
| 8 | Summary..... | 64 |
| 9 | Abbildungs-und Tabellenverzeichnis | 65 |
| 1 | Literaturverzeichnis..... | 65 |
| 10 | Publikationsverzeichnis | 70 |
| 11 | Erklärung zur Dissertation | 71 |
| 12 | Danksagung..... | 72 |

1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| α | Alpha |
| β | Beta |
| γ | Gamma |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celsius |
| μl | Mikroliter |
| & | Und |
| % | Prozent |
| ® | Eingetragenes Warenzeichen |
| < | Kleiner als |
| = | Ist gleich |
| > | Größer als |
| Abb. | Abbildung |
| ACTA2 | Alpha-Aktin-2 |
| ACTC1 | Alpha-Aktin-1 |
| ADRB1 | Beta-1-Adrenozeptor |
| ADRB2 | Beta-2-Adrenozeptor |
| ADRP | Perilipin-2 |
| AG | Aktiengesellschaft |
| ARG1/2 | Arginase |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATP2A2 | Calcium-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums |
| B2M | Beta-2-Mikroglobulin |
| BGN | Biglycan |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BW | Body weight/ Körpergewicht |
| Bzw. | Beziehungsweise |
| Ca. | Circa |
| CASR | Calciumsensitiver Rezeptor |
| CCL2 | Chemokin-Ligand-2 |

| | |
|------------|--|
| CCN2 | Cellular communication network factor 2 |
| CDH5 | Cadherin 5 |
| cDNA | Komplementäre Desoxyribonucleinsäure |
| cGMP | Cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat |
| CILP | Cartilage intermediate layer protein 1 |
| Co. KG | Compagnie Kommanditgesellschaft |
| COL1A1 | Typ 1 Kollagen |
| COL3A1 | Typ 3 Kollagen |
| CRYAB | Alpha-B-Crystallin |
| CTEPH | Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thromboembolien |
| CXCL12 | Motif-Chemokine-12 |
| CXCR4 | Chemokin-Rezeptor-Typ 4 |
| CYBA | Cytochrom B-245 Alphakette |
| CYBB | Cytochrom B-245 Betakette |
| d | Wanddicke |
| DCN | Decorin |
| DES | Desmin |
| Dest. | Destilliert |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNMIL | Dynamin 1-like Protein |
| dNTP's | Desoxynukleotidtriphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECE-1 | Endothelin-Converting-Enzym |
| EDN1/ ET-1 | Endothelin-1 |
| EDNRA/ET-a | Endothelin-Rezeptor-Typ A |
| EDNRB/ET-b | Endothelin-Rezeptor-Typ B |
| EFHD2 | EF-Hand Domain Family Member D2 |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| ELN | Elastin |
| EPO | Erythropoetin |
| FGF2 | Fibroblast growth factor 2 |
| FS | First Strand Buffer |

| | |
|------------------|---|
| FW | Forward/ Vorwärts |
| g | Gramm |
| GaB | Goat-Anti-Rabbit |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GATA4 | GATA-Binding Protein 4 |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| HADHA | Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA Thiolase/Enoyl-CoA Hydratase |
| HIF2 α | Hypoxie-induzierter Faktor 2 Alpha |
| HPRT | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1 |
| HRPA | Horseradish Peroxidase Avidin |
| IL6 | Interleukin-6 |
| IL6R | Interleukin-6-Rezeptor |
| iNOS | Stickstoffmonoxid-Synthase |
| JLU | Justus-Liebig-Universität |
| K | Wandspannung |
| KHK | Koronare Herzerkrankung |
| KI | Konfidenzintervall |
| LOX | Lysyloxidase |
| M-MLV-RT | M-MLV Reverse Transkriptase |
| MEF2C | Myocyte-specific enhancer factor 2C |
| mg | Milligramm |
| Min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| MMP12 | Matrix-Metalloproteinase-12 |
| MMP2 | Matrix-Metalloproteinase-2 |
| MMP9 | Matrix-Metalloproteinase-9 |

| | |
|---------------|---|
| MOPS | 3-Morpholino-Propansulfonsäure |
| mPAP | Pulmonalarterieller Mitteldruck |
| mRNA | Messenger-Ribonukleinsäure |
| MW | Mittelwert |
| MYH6 | Schwerketten-Alpha-myosin |
| MYH7 | Schwerketten-Beta-myosin |
| MYO6 | Myosin VI |
| n | Stichprobengröße |
| NCBI-Referenz | National Center for Biotechnology Information-Referenz |
| NCF1 | Neutrophil cytosolic factor 1 |
| NCF2 | Neutrophil cytosolic factor 2 |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS2/3 | Nitric Oxide Synthase NOS2 |
| NPPA | Atriales natriuretisches Peptid |
| NPPB | Brain natriuretic Peptide |
| NRF2 | Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 |
| ODC | Ornithin Decarboxylase |
| Oligo dt | Oligo-desoxy-Thymidin |
| OSM | Onkostatine M |
| OSMR | Onkostatine-M-Rezeptor |
| PAH | Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie |
| PAWP | Pulmonalarterieller Wedge-Druck |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PCSK9 | Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 |
| PH | Pulmonale Hypertonie |
| PMFS | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PPAR γ | Peroxisom-Proliferator-aktivierender Rezeptor Gamma |

| | |
|----------|--|
| PPARGC1A | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha |
| PTH1R | Parathormon-1-Rezeptor |
| PTHLP | Parathormon verwandtes Peptid |
| Ptm | Transmuraler Druck |
| PVR | Pulmonalvaskulärer Widerstand |
| QTL | Quantitative Trait Loci |
| r | Innenradius |
| Rat | Ratte |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Rounds per minute |
| RT-PCR | Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion |
| RV | Rechter Ventrikel |
| RW | Reverse/ Rückwärts |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| s | Sekunden |
| SHR | Spontan hypertensive Ratten |
| SHR-RVH | Spontan hypertensive Ratten mit Rechtssherzhypertrophie |
| SLC2A1 | Solute Carrier Family 2 Member 1 |
| SLC2A4 | Solute Carrier Family 2 Member 4 |
| SLC8A1 | Solute Carrier Family 8 Member A1 |
| SOD1/2/3 | Superoxiddismutase |
| SST | Somatostatin |
| Tab. | Tabelle |
| TAPSE | Tricuspid annular plane systolic excursion |
| TBS | Tris-buffered saline |
| Temp | Temperatur |
| TGFβ-1 | Transforming Growth Factor Beta 1 |
| TL | Tibiallänge |
| TM | Warenzeichen |

| | |
|--------|------------------------------------|
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| UCP2/3 | Uncoupling Protein |
| USA | United States of America |
| V | Volt |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| Vs. | Versus |
| VSD | Ventrikelseptumdefekt |
| vWF | Von Willebrand Faktor |
| WE | Wood-Einheiten |
| WIS | WISTAR-Ratte |
| WR | Working Reagent |
| x | Mal |
| xg | Relative Zentrifugalkraft |
| z.B. | Zum Beispiel |

2 Einleitung

2.1 Die Physiologie des rechten Ventrikels

Das physiologische Verständnis über die Funktionsweise des rechten Ventrikels und die pathophysiologischen Konzepte, die zu einer Rechtsherzinsuffizienz führen können, sind heute gut bekannt und Gegenstand der Standardlehrbücher (1,41). Zur Einleitung werden diese Erkenntnisse im Folgenden zusammengefasst.

Das menschliche Herz besteht funktionell-physiologisch aus zwei getrennten Pumpsystemen, dem linken und dem rechten Ventrikel, die durch das Ventrikelseptum getrennt sind. Beiden Ventrikeln ist jeweils ein Atrium vorgeschaltet, welche durch das Vorhofseptum voneinander getrennt sind. Der linke Ventrikel pumpt das Blut in den Körperkreislauf, wohingegen der rechte Ventrikel das Blut in die Lungenstrombahn befördert (41).

Während der Embryonalentwicklung entsteht die Herzanlage in der kardiogenen Zone und entwickelt sich durch die kraniokaudale und laterale Abfaltung des Embryos zunächst zum Herzschauch und dann zur Herzschleife. Durch nachfolgende Septierungsprozesse des Atrioventrikularkanal, der Atrien, der Ventrikel und der Ein- und Ausstrombahn entsteht nach ca. 6 Entwicklungswochen das Vierkammer-Herz (1). Physiologisch besitzt das pränatale Kreislaufsystem Unterschiede zum postnatalen Kreislauf. Besonders wichtig ist, dass der Lungenkreislauf pränatal über das Foramen ovale zwischen den beiden Vorhöfen, sowie den Ductus arteriosus zwischen Pulmonalarterie und Aorta, umgangen werden muss. Der rechte Ventrikel weist pränatal höhere Drücke auf, die sich postnatal mit Beginn der Lungenatmung, ebenso wie die Umgehungskreisläufe, anpassen (1).

Das sauerstoffarme Blut gelangt im Herz-Kreislaufsystem des adulten Menschen aus der Peripherie über die Vena cava superior und inferior zunächst in den rechten Vorhof und von dort über die Trikuspidalklappe (Segelklappe) in den muskelarmen rechten Ventrikel. Die Aufgabe des rechten Ventrikels ist es, das Blut während der systolischen Auswurfphase über die Pulmonalklappe (Taschenklappe) in den Truncus pulmonalis auszuwerfen. Dieser teilt sich in die beiden Arteriae pulmonalis dexter und sinister, die letztendlich das Blut zum Gasaustausch in die Lunge befördern (1).

Die Füllung des rechten Ventrikels beruht maßgeblich auf drei Mechanismen: dem Ventilebenenmechanismus, der Druckdifferenz zwischen rechtem Atrium und Ventrikel, sowie der enddiastolischen Kontraktion des Atriums (41).

Der Auswurf beruht auf der geleisteten Druck-Volumen-Arbeit und der Beschleunigungsarbeit, welche im rechten Ventrikel bis zu 10 % beträgt. Der Auswurf des rechten Ventrikels erfolgt synchron mit dem des linken Ventrikels und beruht auf der rhythmischen Abfolge von Systole und Diastole. Der rechte Ventrikel ist muskelärmer als der linke Ventrikel, da dieser das Blut lediglich gegen den im Truncus pulmonalis herrschenden Druck von ca. 20 mmHg auswerfen muss. Im rechten Ventrikel herrschen Drücke von ca. 5 mmHg enddiastolisch und ca. 20-25 mmHg systolisch (41).

2.2 Rechtsherzhypertrophie und Rechtsherzinsuffizienz

Eine über lange Zeit andauernde gesteigerte Arbeitsbelastung des Herzens führt physiologisch zu einer Herzhypertrophie infolge der strukturellen Anpassungsmechanismen.

Ursächlich für eine Rechtsherzhypertrophie sind Druck- und Volumenbelastung des rechten Ventrikels. Hier können beispielsweise eine pulmonale Hypertonie (PH), angeborene und erworbene Herzklappenvitien, wie die Fallot'sche Tetralogie, die Pulmonalstenose oder ein Ventrikelseptumdefekt (VSD), eine Linksherzinsuffizienz und eine Lungenfibrose zu Grunde liegen (33). Lassen sich die oben genannten Ursachen beseitigen, handelt es sich bei der Rechtsherzhypertrophie prinzipiell um einen reversiblen Prozess. Ab einem fibrotischen Umbau der Ventrikelmuskulatur ist der Prozess jedoch irreversibel. Bei der Rechtsherzhypertrophie kommt es nicht zu einer Zunahme der Zahl an Kardiomyozyten, sondern zu einer Vergrößerung ihrer Länge und Dicke, die wiederum in einer Dickenzunahme der Ventrikelmuskulatur resultiert.

Bei der Entstehung der Rechtsherzhypertrophie lassen sich drei Stadien unterscheiden:

- 1. Eine Rechtsherzhypertrophie entsteht, wenn die Arbeitsbelastung (Druck- und Volumenbelastung) die Herzarbeit des rechten Ventrikels überschreitet.

- 2. Phase der Kompensation: Hier ist das Verhältnis der vergrößerten Herzmuskelmasse zur Herzarbeit ausgeglichen (konzentrische Hypertrophie).
- 3. Phase der Dekompensation (Herzversagen): Es kommt zur progredienten Dilatation des Ventrikels (exzentrische Hypertrophie), die dadurch kein ausreichendes Herz-Zeit-Volumen mehr aufrechterhalten kann (41).

Unter anderem erklärend für diesen Prozess gilt das Gesetz nach Laplace nach dem französischen Naturwissenschaftler Pierre-Simon Marquis de Laplace (1749-1827):

$$K = P_{tm} \frac{r}{2d}$$

Hier wird davon ausgegangen, dass das Herz eine Kugel mit Innenradius (r), Wanddicke (d) und transmuralen Druck (P_{tm}) sei. Es gilt eine Proportionalität zwischen der Wandspannung (K) mit dem Innendruck (P_{tm}) und dem Innenradius (r), die die Entstehung der Rechtsherzhypertrophie physikalisch erklärt. Der erhöhte Druck im Gefäßsystem, z.B. bei PH, führt zu einer erhöhten Wandspannung im rechten Ventrikel, die wiederum zu einer Hypertrophie, sprich zur Zunahme der Muskelmasse des Ventrikels, führt. Zunächst verdickt die Muskelmasse bei unverändertem Innenradius, was zu einer konzentrischen Hypertrophie führt. Kommt es beispielsweise durch Volumenbelastung zusätzlich zu einer Dilatation und damit zu einer Zunahme des Innendurchmessers des Ventrikels, resultiert eine exzentrische Hypertrophie und eine Herzinsuffizienz (41).

Bei der Entstehung der Rechtsherzinsuffizienz aus der kompensierten Hypertrophie spielen weitere Faktoren eine wichtige Rolle. Durch die bereits erwähnte Dickenzunahme der Kardiomyozyten entsteht ein ungünstiges Verhältnis zwischen Muskelmasse und Durchblutung mit verlängerter Sauerstoffdiffusionsstrecke. Ferner tragen die interstitielle Fibrose mit Zunahme des Kollagengehalts im Gewebe, sowie die so genannte Abnahme der Koronarreserve zur Entstehung der Rechtsherzinsuffizienz bei (41). Letztendlich resultiert daraus eine unzureichende Pumpleistung des rechten Ventrikels und damit ein Rechtsherzversagen bzw. eine Rechtsherzinsuffizienz, die mit typischen klinischen Symptomen einhergeht. Durch die verminderte Pumpleistung des rechten Ventrikels kommt es zu einem Rückstau des Blutes in die großen Körpervenen, was sich klinisch in

gestauten Halsvenen, Stauung der Viszeral Organe (Stauungsleber mit portaler Hypertension, Splenomegalie, Stauungsgastritis und Stauungsnieren), Pleuraerguss, Aszites und peripheren Ödemen äußern kann. Außerdem wird weniger Blut Richtung Lunge gepumpt, was zu Dyspnoe und Zyanose führen kann (21,41).

2.3 Pulmonale Hypertonie als Risikofaktor für Rechtsherzhypertrophie

PH bezeichnet eine Gruppe von Erkrankungen, die sich durch eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Gefäßwiderstands und somit des pulmonalarteriellen Blutdrucks auszeichnen. Die Inzidenz der PH beträgt 1 % der Weltbevölkerung und ca. 10 % der über 65-Jährigen. Per Definition beträgt der invasiv über einen Rechtsherzkatheter gemessene pulmonalarterielle Mitteldruck (mPAP) mehr als 20 mmHg. Der pulmonalarterielle Wedge-Druck (PAWP) ist auf 15 mmHg zur Unterscheidung einer prä- und postkapillären PH festgelegt. Bei der präkapillären PH beträgt der pulmonalvaskuläre Widerstand (PVR) > 2 WE (Wood- Einheiten) (21).

Die PH wird anhand der WHO-Klassifikation (2013) in fünf Hauptgruppen eingeteilt:

- 1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
- 2. PH bei Erkrankungen des linken Herzens
- 3. PH bei Lungenerkrankungen oder Hypoxie
- 4. PH aufgrund chronischer Thromboembolien (CTEPH)
- 5. PH mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen

Weiterhin kann zwischen primärer und sekundärer PH unterschieden werden. Bei der primären PH handelt es sich um die idiopathische Form mit einer Inzidenz von etwa 1:1.000.000 (21). Interessanterweise wird bei Patienten mit primärer PH eine erhöhte Ausschüttung an vasoaktiven Hormone wie Endothelin-1 (ET-1) und Thromboxan beobachtet (9,17), die zu einer Vasokonstriktion der Lungengefäße führen. Des Weiteren weisen Patienten eine verminderte Ausschüttung von vasodilatatorisch wirkenden Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin auf (8).

Bei der sekundären PH handelt es sich um eine PH auftretend als Folge einer Grunderkrankung (21).

Pathophysiologisch kommt es akut zu einer Kontraktion der Gefäßmuskulatur, wohingegen chronisch strukturelle Umbauprozesse der Gefäßwände im Vordergrund stehen. Zum einen kommt es zur Zunahme der Muskulatur an sich und zum anderem zum bindegewebigen Umbau dieser, woraus eine verminderte Flexibilität der Gefäße resultiert. Schlussendlich haben die oben genannten strukturellen Umbauprozesse der Lungengefäße hämodynamische Auswirkungen auf den rechten Ventrikel (21).

Die wichtigste Funktionseinheit der glatten Muskulatur ist der kontraktile Apparat, bestehend aus Aktin und Myosin, wobei das in der glatten Muskulatur vorkommende Aktin durch das Gen Alpha-Aktin-2 (*ACTA2*) auf Chromosom 10 (51) und Myosin durch Myosin 11 (*MYH11*) auf Chromosom 16 (14) kodiert wird. *ACTA2* kann unter anderem strukturelle Veränderungen der pulmonalen Gefäße mitbeeinflussen (10). In einzelnen Beschreibungen wird sogar davon gesprochen, dass eine Mutation im *ACTA2*-Gen in der Lunge zu PH führen kann (34).

Weitere pathophysiologische Veränderungen bei der PH betreffen das Endothelin-System, welches in einem eigenen Abschnitt genauer thematisiert wird (siehe 2.4.1.), und das adrenerge System, bestehend aus dem Beta-1-Adrenozeptor (*ADRB1*) und Beta-2-Adrenozeptor (*ADRB2*), die bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie der PH, verändert sein können (54). *ADRB1* vermittelt hauptsächlich kardiale Effekte, während *ADRB2* eine Relaxation der glatten Muskulatur vermittelt (32,41). *ACTA2*, *ADRB1* und *ADRB2* werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit aufgrund ihrer Funktion als gefäßabhängige Gene bezeichnet.

Die PH ist ein typischer Risikofaktor für die Entstehung einer Rechtsherzhypertrophie, welche in diesem Fall auch als Cor pulmonale bezeichnet wird. Der erhöhte Druck im pulmonalarteriellen Gefäßsystem bei PH führt zu einer erhöhten Wandspannung im rechten Ventrikel, was wiederum zu einer Rechtsherzhypertrophie führt. Zunächst verdickt sich die Muskelmasse, der Innenradius bleibt jedoch unverändert. Endstrecke dieser Veränderungen ist die Rechtsherzinsuffizienz (21).

Therapeutisch sollte im besten Falle die Grunderkrankung vor Eintritt einer PH behandelt werden. Bei einer PH stehen verschiedene medikamentöse Maßnahmen zur Verfügung, die den pulmonalvaskulären Gefäßwiderstand senken. Hierbei handelt es sich um Endothelin-Rezeptorantagonisten (Bosentan, Ambrisentan, Macitentan),

Calciumantagonisten (Nifedipin), Prostazyklinderivate (Iloprost), Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (Sildenafil, Tadalafil) und lösliche Guanylatzyklase-Stimulatoren (Riociguat). Weiterhin sollte eine Sauerstofflangzeittherapie zur Symptomlinderung und eine Antikoagulation zur Risikominimierung begonnen werden. Als Ultima Ratio der irreversiblen strukturellen Umbauprozesse bei PH bleibt die Transplantation von Herz und/oder Lunge (21).

2.4 Die Lunge als Trigger einer Rechtsherzhypertrophie

2.4.1 Das Endothelin-System in der Lunge und PH

Das Endothelin-System, bestehend aus Endothelin-1 (*EDNI/ET-1*) sowie seinen beiden Rezeptoren, dem Endothelin-Rezeptor-Typ A (*EDNRA/ETa*) und dem Endothelin-Rezeptor-Typ B (*EDNRB/ETb*) und dem Endothelin-Converting-Enzym (*ECE1*), hat weitreichende Funktionen innerhalb der Lungenstrombahn.

Bei ET-1 handelt es sich um ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, das 2 weitere Isoformen (ET-2 und ET-3) besitzt. ET-1 wird durch ECE1 aus seinem Vorläuferprotein Big-ET-1 geschnitten (13). ET-1 wird hauptsächlich transkriptionell reguliert, beispielsweise durch *NF κ B* und *HIF-1*. ET-1 beeinflusst die Organdurchblutung und ist einer der potentesten Vasokonstriktoren und somit Blutdruckregulatoren (38). Außerdem scheint es eine Rolle bei der Tumorentstehung zu spielen, hier vor allem als Induktor der Angiogenese (13). ET-1 regt außerdem pulmonalarterielle Muskelzellen zu deren Vermehrung an, führt also zu strukturellen Veränderungen in den Lungengefäßen. ET-1 entfaltet seine Wirkung mit Hilfe der beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ETa und ETb. Der überwiegend auf glatten Muskelzellen exprimierte Rezeptor ETa vermittelt eine starke Vasokonstriktion. Der hauptsächlich am Endothel, aber auch an der glatten Muskelzelle, vorkommende Rezeptor ETb, führt über Stickstoffmonoxid-Freisetzung (NO) und Bildung von cyclischem Guanosin-3',5'- Monophosphat (cGMP) zur Vasodilatation (13). Außerdem vermittelt der ETb-Rezeptor die Clearance von ET-1 (15).

Aus der physiologischen Funktion des Endothelin-Systems lässt sich ableiten, dass ein überaktives System früher oder später zur Vasokonstriktion der Lungengefäße und strukturellen Umbauprozessen dieser führt. Die Vasokonstriktion hat somit Anteil an der

Entstehung eines pulmonalen Hochdrucks, der sekundär zu Rechtsherzhypertrophie und Rechtsherzinsuffizienz führen kann.

Endothelin-Rezeptor-Antagonisten werden bei der Behandlung der PH eingesetzt, da bei der PH das Endothelin-System überaktiv ist (16).

2.4.2 Parathormon verwandtes Peptid (*PTHLP*) in der Lunge und PH

PTHLP ist ein ubiquitär exprimiertes Peptidhormon. *PTHLP* spielt eine Rolle im Kalziumhaushalt, wo es über die Aktivierung des klassischen Parathormon-Rezeptors am Knochen und an den Nieren zu Hyperkalzämie führt. Des Weiteren spielt es eine Rolle während der embryonalen Organentwicklung, besitzt verschiedene gewebespezifische para-, intra- und autokrine Wirkungen und kann im Rahmen von Tumorerkrankungen vermehrt gebildet werden (paraneoplastisches Syndrom). In der Lunge ist es an der Lungendifferenzierung während der Embryonalentwicklung und an der Surfactant-Bildung beteiligt (50). *PTHLP* ist ein vasodilatatorisch wirkendes Hormon. Studien begründen diese vasodilatatorische Wirkung unter anderem mit dem hemmenden Effekt von *PTHLP* auf die Expression und Produktion von ET-1. Diese Wirkung wird über NO und cGMP in Endothelzellen vermittelt. Somit besteht eine interessante Beziehung zwischen *PTHLP* und dem Endothelin-System (26).

2.4.3 Das Endothelin-System im rechten Ventrikel und Rechtsherzhypertrophie

ET-1 hat als potenter Vasokonstriktor aufgrund der gesteigerten Druckbelastung indirekten Einfluss auf die Arbeitsleistung des rechten Herzens und kann in der Folge zu einer Rechtsherzhypertrophie führen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass ET-1 häufig im Rahmen von Herz-Kreislaufkrankungen, wie Herzinsuffizienz, Arteriosklerose und Koronarer Herzkrankheit (KHK) erhöht ist (52). Erhöhte ET-1-Spiegel beeinflussen vor allem die Kontraktilität und den Rhythmus des Herzens. Der durch ET-1 vermittelte Stress kann zu strukturellen Umbauprozessen am Herzen führen, welche in einer Hypertrophie resultieren. Diese Wirkungen werden über die ETa-Rezeptoren am Sympathikus vermittelt, indem die Noradrenalin-Wiederaufnahme in die sympathischen Nervenzellen gehemmt wird, was z.B. an Mäusen gezeigt werden konnte (13). Protektiv gegenüber

erhöhten ET-1-Spiegeln könnte eine verminderte Expression und Konzentration des ETa am Herzen bzw. am rechten Ventrikel sein. Dieser wirkt als sogenannter Resistance-Rezeptor, wobei es zwar durch die ET-1-Effekte zu Umbauprozessen und Hypertrophie, aber nicht zu einer relevanten Insuffizienz kommen würde. ETa spielt eine wichtige Rolle bei Prozessen des kardialen Remodelings (31).

2.4.4 Hypoxie-assoziierte Gene im Zusammenspiel mit der Entstehung einer Rechtsherzhypertrophie

Zu den sogenannten Hypoxie-assoziierten Genen zählen Erythropoetin (*EPO*), Hypoxie induzierter Faktor 2 Alpha (*HIF2 α*), Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*NRF2*) und Vascular endothelial growth factor (*VEGF*), die funktionell als System zusammenarbeiten. Die Expression dieser Gene findet vor allem in den Nieren statt. Stärkster Trigger für die Expression ist die Hypoxie, sprich eine verminderte Sauerstoffsättigung im Blut bzw. in der Arteria renalis. Kommt es aufgrund kardialer und pulmonaler Insuffizienz zur Hypoxie, ist eine Hochregulation dieses Systems mit vermehrter Expression der Hypoxie-assoziierten Gene zu beobachten (41).

In der Niere findet unter anderem die Bildung des Glykoproteins EPO statt, das die Erythropoese im Knochenmark steuert (41). Tritt eine Hypoxie im Rahmen von kardiopulmonalen Erkrankungen auf, so führt dies zur vermehrten EPO-Bildung und zur sekundären Polyglobulie. Die Synthese von EPO wird Hypoxie-gesteuert via HIF2 α reguliert. HIF2 α ist eine der drei Isoformen von HIF. Bei HIF2 α handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der bei Hypoxie aktiviert wird. Er liegt als Heterodimer (α - und β -Untereinheit) im Zytoplasma der Zellen vor, wobei die α -Untereinheit bei Normoxie an zwei Prolinresten hydroxyliert wird, wodurch es dem Abbau im Proteasom zugefügt wird. Bei Hypoxie wird die Hydroxylierung von HIF2 α gehemmt, was seinen Abbau verhindert und seine Wirkungsentfaltung im Zellkern ermöglicht (19). Der Transkriptionsfaktor aktiviert nun für die Hypoxie-Anpassung relevante Signalwege: EPO-Synthese, VEGF-Synthese und Synthese der Enzyme der anaeroben Glykolyse (46). VEGF bezeichnet eine Gruppe an Proteinen, die ihre Aufgaben vor allem im Rahmen der Angiogenese über sogenannte Tyrosinkinase-Rezeptoren erfüllen (37). Hierbei stimuliert VEGF die Migration und Teilung neuer Endothelzellen und somit die Bildung neuen Epithels. VEGF wird vor allem in Phasen gebildet, in denen eine Angiogenese notwendig

ist, wie beispielsweise bei der Wundheilung, bei Entzündungen, bei Erkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration oder auch bei bestimmten Tumorerkrankungen (48). Es spielt auch in der Vaskulogenese während der Embryonalzeit eine große Rolle. Außerdem wird es bei vorliegender Hypoxie vermehrt in den Nieren exprimiert. NRF2 ist ein Leucin-Zipper-Protein, das die Regulation von antioxidativ wirkenden Proteinen steuert und somit gegen oxidative Zellschädigung wie z.B. bei Entzündungen wirkt. Ähnlich wie HIF2 α wird es unter Normoxie abgebaut und unter oxidativem Stress entfaltet es seine Wirkung durch Wanderung in den Zellkern und Steigerung der Expression von antioxidativen Genen und Proteinen (2).

2.5 Spontan hypertensive Ratten (SHR) als Tiermodell

SHR sind ein etabliertes Tiermodell zur experimentellen Forschung an der essentiellen arteriellen Hypertonie und den daraus resultierenden Endorganschäden. Das Tiermodell ist in den 1960er Jahren von Akamato und Aoki an der Kyoto-School of Medicine, Japan entwickelt worden (36). SHR sind aus der selektiven Züchtung von normotensiven Wistar/Kyoto-Ratten (WIS) entstanden, welche von Natur aus einem erhöhten Blutdruck im Gegensatz zu den anderen Tieren aufwiesen. Anschließend erfolgte eine konsequente Ausselektion der Nachkommen mit erhöhtem Blutdruck. Dementsprechend wird heute die normotensive WIS-Ratte als etabliertes Vergleichsmodell zu den SHR eingesetzt (39). Die SHR-Tiere entwickeln eine arterielle Hypertonie zwischen Lebenswoche 8 und 12, diese bleibt lebenslang bestehen und führt bei erwachsenen Ratten zu kardiovaskulären Endorganschäden, wie Linksherzhypertrophie und -insuffizienz, Schlaganfall sowie Nierenschäden. Im Erwachsenenalter entstehen systolische Blutdruckwerte zwischen 180 und 200 mmHg, teils auch über 200 mmHg, wobei männliche Ratten höhere Spitzenblutdruckwerte aufweisen als weibliche Ratten (39). Für die Entstehung der Hypertonie in SHR werden sogenannte Quantitative Trait Loci (QTL) auf den Chromosomen 1 und 10 verantwortlich gemacht (20,25,30). QTL sind Orte auf dem Genom, die ein oder mehrere Gene enthalten, welche wiederum für die Ausprägung eines bestimmten Merkmals, in diesem Falle des spontanen Hypertonus der SHR, verantwortlich sind (44). Außerdem scheint der Niere eine große Rolle in der Entstehung der Hypertonie in SHR zuzukommen (49).

2.6 Zusammenfassung und Fragestellung des Projekts

SHR sind ein etabliertes Tiermodell zur experimentellen Forschung an der essentiellen arteriellen Hypertonie und den daraus resultierenden Endorganschäden. In den vergangenen 40 Jahren haben Untersuchungen an SHR-Tieren viel zum Verständnis der arteriellen Hypertonie, der hypertensiven Herzerkrankung, sowie weiteren Endorganschäden und deren Therapie beitragen können. In der Arbeitsgruppe Schlüter werden SHR-Ratten vor allem hinsichtlich der Interaktion zwischen körperlicher Aktivität im Sinne einer physiologischen Präkonditionierung und dem daraus resultierendem Schutz gegen Endorganschäden verwendet. Obwohl SHR-Tiere im Allgemeinen weder eine pulmonale Druckbelastung zeigen, noch eine Rechtsherzhypertrophie aufweisen, zeigen sie doch eine Hyperaktivität gegenüber Reizen, die eine PH auslösen können. In der Arbeitsgruppe wurde ein SHR-Stamm identifiziert, der eine massive Rechtsherzhypertrophie in etwa 7 % aller Tiere entwickelt. Dieser Befund hat zwei interessante Aspekte: Zum einen ist die Rechtsherzhypertrophie auch bei 10 Monate alten Tieren nur mit einem echokardiographisch moderaten messbaren Funktionsverlust ohne schweren Phänotyp einhergehend, zum anderen ist der Auslöser unklar, da nur 7 % der Population diese Hypertrophie entwickeln. In der molekularbiologischen Detailanalyse zeigen sich keine Unterschiede im druckbelasteten linken Ventrikel zwischen betroffenen und nicht betroffenen Tieren. Im rechten Ventrikel sind Standardparameter zwischen betroffenen und nicht betroffenen Tieren auffällig, die mit einer Hypertrophie assoziiert sind, wie das Brain natriuretic Peptide (*NPPB*) oder mit einer Dysfunktion, wie die Calcium-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums (*ATP2A2*) oder das Cartilage intermediate layer protein 1 (*CILP*), wobei *NPPB* und *CILP* in SHR-RVH erhöht und *ATP2A2* vermindert exprimiert werden. Ebenso zeigen betroffene Tiere Anzeichen einer proinflammatorischen Reaktion, z.B. im Sinne einer Erhöhung von Matrixmetalloproteinase-12 (*MMP12*) und Interleukin-6 (*IL-6*). All dies führt zu der Fragestellung, ob molekulargenetische Veränderungen in der Lunge sekundär auf das rechte Herz wirken und so möglicherweise die Rechtsherzhypertrophie des weiblichen SHR-Stamms triggern.

Es ist seit langem unklar, warum der rechte Ventrikel, z.B. beim hypoplastischen Linksherzsyndrom jahrelang systemischen Drücken standhalten kann, aber kleine Druckzunahmen beim Adulten zur Progression einer Rechtsherzinsuffizienz führen. Die

Untersuchung dieses Modells könnte neue molekulare Ansatzpunkte für dieses Verständnis erbringen. Des Weiteren kann die Untersuchung zum Verständnis der Interaktion zwischen Lunge und rechtem Ventrikel, im Rahmen der PH und zum besseren allgemeinen Verständnis des Tiermodells SHR beitragen.

In dieser Arbeit wird die Hypothese getestet, dass für die Entstehung einer extremen Rechtsherzhypertrophie in weiblichen SHR-Tieren molekulargenetische Prozesse in der Lunge, mit folgender Nachlasterrhöhung für das rechte Herz, verantwortlich sind.

3 Material

3.1 Geräte und Labormaterial

3.1.1 Allgemein verwendete Geräte

| | |
|-------------------------------------|--|
| Allegra™ 25R Centrifuge | Beckman Coulter, Brea Kalifornien USA |
| Eismaschine MF26 | Scotsman Ice Systems, Milan Italien |
| Microfuge®18 Centrifuge | Beckman Coulter, Brea Kalifornien USA |
| MS2 Minishaker | IKA®, Wilmington North Carolina USA |
| MS3 basic | IKA®, Wilmington North Carolina USA |
| Pipetten | Eppendorf AG, Hamburg |
| Precellys 24 lysis & homogenization | peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Zentrifuge 1-16K | Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz |

3.1.2 Computerprogramme

| | |
|-------------------------|--|
| Bio-Rad CFX Maestro 1.1 | Bio-Rad, Hercules Kalifornien USA |
| Chemi-Capt | Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell |
| Tecan Maglan 6 | Tecan® Group, Männedorf Schweiz |
| Tecan I-Control | Tecan® Group, Männedorf Schweiz |
| Quantity One | Bio-Rad, Hercules Kalifornien USA |
| Microsoft Office | Microsoft Corporation, Redmond Washington USA |
| ND-1000 V3.5.1 | peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |

3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

| | |
|--|-----------------------------------|
| iCycler CFX Connect™ Real-Time System | Bio-Rad, Hercules Kalifornien USA |
|--|-----------------------------------|

| | |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| Nano-Drop® ND-1000 Spectrometer | peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Thermal Cycler | Techne, Duxford Cambridge |

3.1.4 Western Blot

| | |
|--|--|
| Blot-Reader | peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| DRI-BLOCK™ DB-2D | Techne, Wiesbaden |
| Hamilton-Spritze | Hamilton-Bonaduz AG, Bonaduz Schweiz |
| Laborwaage | Kern®, Balingen |
| Netzgerät | Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA |
| Novex® Mini-Cell Gelkammer | Invitrogen™, Waltham Massachusetts USA |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Katalognummer 23227) | Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA |
| Pre-Diluent Protein Assay Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set | Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA |
| Rocking Platform | Biometra, Göttingen |
| Ultraschall Prozessor UP100H | Hielscher Ultrasound Technology, Teltow |
| XCell II Blot™ Module | Invitrogen™, Waltham Massachusetts USA |

3.1.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

| | |
|--|---------------------------------------|
| ELISA-Reader: infinite M200 | Tecan® Group, Männedorf Schweiz |
| Inkubator | Memmert GmbH & Co. + KG, Schwabach |
| Laborwaage | Acculab sartorius group |
| Rat Endothelin-1 (ET-1) ELISA Kit (Katalognummer CSB-E06979r) | CUSABIO®, Houston Texas USA |

3.2 Verbrauchsmaterial

| | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| Cellstar® Serological Pipette 10ml | Greiner bio-one, Solingen |
| Cellstar® Tubes 15ml | Greiner bio-one, Solingen |
| Cellstar® Tubes 50ml | Greiner bio-one, Solingen |
| Einmal-Wägeschalen | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe |
| Einweg-Skalpell | Feather, Osaka Japan |
| Micro-Touch Nitra-Tex® | Ansell, Brüssel Belgien |
| Multiply®-µStripPro LP, Clear | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht |
| Multiply®-µStripPro LP, trans | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht |
| Pierce 96-Well Plates | Greiner bio-one, Solingen |
| Pipettenspitzen | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht |
| Precell-Röhrchen | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht |
| PROTAN® 0,2µm Nitrocellulose | Whatman® GmbH, Dassel |
| Transfer Membrane | |
| Reagiergefäß 1,5ml | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht |
| SafeSeal Reagiergefäß 0,5ml | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht |
| Saugpapier | Biotec-Fisher GmbH, Reiskirchen |

3.3 Chemikalien und Substanzen

| | |
|---|---|
| 5x First Strand Buffer (FS) | Invitrogen™, Waltham Massachusetts USA |
| Albumin Fraktion V | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe |
| Aqua 1000ml | B/Braun, Melsungen |
| Cell Lysis Buffer (10x) | Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main |
| Chloroform | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe |
| Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP's/N): | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe |
| Destilliertes Wasser | VITLAB® GmbH, Großostheim |
| Dithiothreitol (0.1M DTT) | Invitrogen™, Waltham Massachusetts USA |
| Ethanol 70% | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe |

| | |
|--|--|
| iQ SYBR® Green Supermix | Bio-Rad, Hercules Kalifornien USA |
| Isopropanol | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe |
| Laemmli 2x concentrate sample puffer | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| M-MLV-Reverse Transkriptase | Invitrogen™, Waltham Massachusetts USA |
| Methanol | Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri USA |
| Milchpulver | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe |
| NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) | Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA |
| NuPAGE® Transfer Buffer (20x) | Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA |
| NuPAGE™® Antioxidant | Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA |
| NuPAGE™ 10% Bis-Tris Gel | Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA |
| Oligo-desoxy-Thymidin (Oligo dt) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS) | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe |
| RNAsin® Plus RNase Inhibitor | Progema, Madison Wisconsin USA |
| Roti®fair PBST 7.7 | Carl-Roth GmbH, Karlsruhe |
| Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Marker) | Thermo Scientific, Waltham Massachusetts USA |
| SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate | Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA |
| TBS (Tris-buffered saline, 20X) Powder | AppliChem, Darmstadt |
| TRItidy G™ | AppliChem GmbH, |
| Tween® 20 for molecular biology | AppliChem GmbH, Darmstadt |

3.4 Primer

| Gen | Spe- zies | National Center for Biotechnology Information (NCBI)- Referenz | Basen- paare | Sequenz |
|---------------|--------------|---|-----------------|--|
| <i>ACTA2</i> | Ratte | NM_001170325.1 | 183 | Forward (FW): AGTGCCAGCTGGAGATCAAC Reverse (RW): AGCGCTCCAGTCTTCGAATC |
| <i>ADRB1</i> | Ratte | NM_012701.2 | 145 | FW: GCGCTCATCGTGCTGCTCA RW: AGGCACCACCAGCAGTCCCA |
| <i>ADRB2</i> | Ratte | NM_012492.2 | 161 | FW: GCTTCTGTGCCTTCGCCGGT RW: AGCCTTCCATGCCAGGGGCT |
| <i>ADRP</i> | Ratte | NM_017238.1 | 111 | FW: GCCCGAGTCACAACCCACG RW: AGAGTCGACAGCCGCTCGGT |
| <i>B2M</i> | Ratte | NM_012512.2 | 117 | FW: GCCGTCGTGCTTGCCATTC RW: CTGAGGTGGGTGGAAGTACTGAGAC |
| <i>CASR</i> | Ratte | NM_016996.1 | 193 | FW: AAGTGCCCGGATGACTTCTG RW: GGTTGGTGGCCTTGACGATA |
| <i>COL1A1</i> | Ratte | NM_053304 | 154 | FW: GCGAACAAGGTGACAGAG RW: CCAGGAGAACCAGCAGAG |
| <i>COL3A1</i> | Ratte | NM_032085 | 184 | FW: TGGAGTCGGAGGAATG |

| | | | | |
|--------------------------------|-------|-----------------------|-----|--|
| <i>CYBA</i> | Ratte | NM_024160.1 | 183 | RW: GCCAGATGGACCAATAG FW: CCTCCACTTACTGCTGTCCG RW: GTAGGTGGCTGCTTGATGGT |
| <i>CYBB</i> | Ratte | NM_023965.1 | 101 | FW: GTTTGCCGGAAACCCTCCTA RW: CCTTCTGCTGAGATCGCAA |
| <i>ECE1</i> | Ratte | NM_053596.2 | 171 | FW: TCTGGCCAACATCACCATCC RW: TAGACCACGATGGGCTCAGA |
| <i>ELN</i> | Ratte | NM_012722 | 140 | FW: TGCTACTGCTTGGTGGAGAATG RW: CGTGGCTGCTGCTGTCTG |
| <i>EPO</i> | Ratte | NM_017001.1 | 120 | FW: GGGGTGCCCGAACGTC RV: GTACCTCTCCAGAACGCGAC |
| <i>EDNI</i> | Ratte | NM_012548.2 | 167 | FW: CCGTATGGACTAGGAAGCCC RW: TGCATGGTACTTTGGGCTCG |
| <i>EDNRA</i> | Ratte | NM_012550.2 | 124 | FW: ATTTGGCCCTGCCTAGCAAT RW: CCCACCATTCCCACGATGAA |
| <i>EDNRB</i> | Ratte | NM_017333.1 | 118 | FW: GCTAGCCATCACTGCGATCT RW: TGTCTTGGCCACTTCTCGTC |
| <i>GAPDH</i> | Ratte | NM_017008.4 | 176 | FW: CTTCTCTTGTGACAAAGTGGACA RW: CTCGCTCCTGGAAGATGGTG |
| <i>HIF2α</i> | Ratte | <u>NM_001004083.1</u> | 189 | FW: GGGTACGTGAGGCATGTTGA RW: CCGTCGGTCAGACCAGAAAA |

| | | | | |
|--------------|-------|----------------|-----|---|
| <i>HPRT</i> | Ratte | NM_012583 | 132 | FW: CCAGCGTCGTGATTAGTG AT RW: CAAGTCTTTCAGTCCTGTCC |
| <i>IL6</i> | Ratte | NM_012589.2 | 114 | FW: CACTTCACAAGTCGGAGGCT RW: TCTGACAGTGCATCATCGCT |
| <i>iNOS</i> | Ratte | NM_012611 | 126 | FW: AAGAGACGCACAGGCAGAG RW: CAGCAGGCACACGCAATG |
| <i>MMP12</i> | Ratte | NM_053963 | 150 | FW: TGCAGCTGTCTTTGATCCAC RW: GCATCAATTTTTGGCCTGAT |
| <i>MMP2</i> | Ratte | NM_031054.2 | 110 | FW: ACAACAGCTGTACCACCGAG RW: GGACATAGCAGTCTCTGGGC |
| <i>MMP9</i> | Ratte | NM_031055 | 200 | FW: CAATCCTTGCAATGTGGATG RW: AAATCTTCTTGGA CTGCGGA |
| <i>NCF1</i> | Ratte | NM_053437.2 | 114 | FW: GCACCACCTCGCAGGTCGAC RW: GCGCTGCTGCAGGAATCGGA |
| <i>NCF2</i> | Ratte | NM_001100984.1 | 149 | FW: ATGGTGCCAACAGCTCGGCC RW: GCTGGCTGTAGGGGAGGCCA |
| <i>NRF2</i> | Ratte | NM_031789.2 | 156 | FW: TTGTAGATGACCATGAGTCGC RW: GCCAAACTTGCTCCATGTCC |
| <i>ODC</i> | Ratte | NM_012615 | 304 | FW: GAAGATGAGTCAAACGAGCA |

| | | | | |
|--------------------------------|-------|----------------|-----|--------------------------|
| | | | | RW: |
| | | | | AGTAGATGTTTGGCCTCTGG |
| <i>PPARγ</i> | Ratte | NM_022708 | 130 | FW: GCCGCACGGACGCACATTG |
| | | | | RW: |
| | | | | GCCTCACACGACCCGGTACC |
| <i>PTH1R</i> | Ratte | NM_020073.2 | 120 | FW: |
| | | | | GTGAGGTGCAGGCAGAGATT |
| | | | | RW: |
| | | | | TCGTGTGAGACACCATTGGG |
| <i>PTHLP</i> | Ratte | NM_012636.1 | 182 | FW: |
| | | | | GCTTGGTCGCAGGCTAAAAC |
| | | | | RW: |
| | | | | TTTTGGTGTGGGAGCAGGT |
| <i>TGFβ-1</i> | Ratte | NM_021578 | 117 | FW: ATTCCTGGCGTTACCTTGG |
| | | | | RW: CCTGTATTCCGTCTCCTTGG |
| <i>VEGF</i> | Ratte | XM_032900653.1 | 474 | FW: |
| | | | | TGCCCCTAATGCGGTGTGCG |
| | | | | RW: |
| | | | | GGCTCACAGTGAACGCTCCAGG |

Alle Primer werden von Invitrogen (by Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA) bezogen. Die Primer werden folgendermaßen angesetzt:

15 μ l FW (100 μ M) + 15 μ l RW (100 μ M) + 270 μ l Aqua.

3.5 Antikörper

3.5.1 Primäre Antikörper

| Antikörper | Host | Verhältnis | Katalognummer | Hersteller |
|------------|-------|------------|---------------|--------------------------------------|
| Anti-EDN1 | Ratte | 1:1000 | MBS2540132 | Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, |

| | | | | |
|----------------|-------|--------|------------|--|
| Anti-ETa | Ratte | 1:1000 | MBS9702013 | Eching Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching |
| Anti-ETb | Ratte | 1:1000 | BS-4198R | Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching |
| Anti- GAPDH | Maus | 1:4000 | CB1001 | Calbiochem®, Darmstadt |
| Anti- PTHLP | Ratte | 1:100 | PC09 | Calbiochem®, Darmstadt |

3.5.2 Sekundäre Antikörper

| | | | | |
|----------------------|-----------|--------|-----------|---|
| Goat-Anti- Rabbit | Kaninchen | 1:2000 | P044801-1 | Agilent, Santa Clara Kalifornien USA |
| Goat-Anti- Mouse | Maus | 1:2000 | P044701-2 | Agilent, Santa Clara Kalifornien USA |

Für alle Antikörper setzt sich die Antikörperlösung wie folgt zusammen:

Tris-buffered saline 1X (TBS) mit 0,1 % Tween20

5 % Bovines Serumalbumin (BSA)

+ Antikörper im jeweiligen Verhältnis nach Angaben des Herstellers.

3.6 Tierkollektiv und Gewebe

Die bei diesem Projekt verwendeten Gewebeproben (Lunge, rechter Ventrikel, Niere und Plasma) stammen aus einem Tierkollektiv von 76 7,5-11,5 Monate alten weiblichen SHR-Ratten (Stamm SHR/NHsd) und normotensiven WIS-Ratten. Dabei entstammen die Gewebeproben den folgenden vorangegangenen Versuchsserien:

Tierversuchsgenehmigungsnummer V54-19 c 20 15 h 01 GI Nr. 76/2014 und V54-19 c 20 15 h 01 GI 20/1 Nr. 77/2014.

Die in dieser Studie untersuchten Unterschiede zwischen den Tieren SHR mit Rechtsherzhypertrophie (SHR-RVH) und SHR ohne Rechtsherzhypertrophie (SHR) und normotensiven WIS-Ratten beruht auf der post mortem identifizierten Rechtsherzhypertrophie der Versuchstiere, die einen ungewöhnlichen Phänotyp für diese Tiere darstellt. Die Rechtsherzhypertrophie ist unabhängig vom Alter der Versuchstiere und die Inzidenz beträgt 7 %. Die Inzidenz der Linksherzhypertrophie beträgt sowohl in SHR als auch in SHR-RVH 100 %. Die Rechtsherzhypertrophie ist definiert als mehr als die zweite Standardabweichung (SD) des Gewichts des rechten Ventrikels zur Tibiallänge in Milligramm pro Millimeter (RV/TL in mg/mm). Das Gewicht des rechten Ventrikels wird ohne Septum gemessen. Zur besseren Übersicht sind die für die Gruppeneinteilung relevanten Unterschiede hier benannt (Tabelle (Tab.) 1 und 2).

Tab. 1: Gruppeneinteilung und Gruppenunterschiede der Versuchstiere

| Gruppe | Bezeichnung | RV/BW (mg/g) | RV/TL (mg/mm) |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| SHR | KS-6M1 | 0,46 | 27,12 |
| | KS-6M2 | 0,43 | 23,68 |
| | KS-6M3 | 0,47 | 26,76 |
| | KS-6M4 | 0,51 | 31,51 |
| | KS-6M6 | 0,47 | 28,17 |
| | KS-10M1 | 0,44 | 26,03 |
| | KS-10M2 | 0,50 | 30,14 |
| | KS-10M3 | 0,46 | 27,12 |
| | KS-10M6 | 0,45 | 30,81 |
| | <i>SHR-RVH</i> | <i>KS-6M5</i> | <i>1,62</i> |
| <i>KS-10M5</i> | | <i>1,27</i> | <i>84,93</i> |
| <i>KS-6M-Sp4</i> | | <i>1,24</i> | <i>77,78</i> |
| <i>El-8 Run</i> | | <i>0,83</i> | <i>61,50</i> |
| WIS | KW-6M1 | 0,41 | 32,10 |
| | KW-6M2 | 0,36 | 28,21 |

| | | | |
|--|--------|------|-------|
| | KW-6M3 | 0,39 | 31,33 |
| | KW-6M4 | 0,42 | 37,33 |
| | KW-6M5 | 0,36 | 28,06 |
| | KW-6M6 | 0,42 | 35,00 |

Tab. 1: Gruppeneinteilung und Gruppenunterschiede der Versuchstiere. Dargestellt werden die drei Versuchsgruppen SHR (n=9), SHR-RVH (n=4) und WIS (n=6) mit den Bezeichnungen der einzelnen Versuchstiere. Die Rechtsherzhypertrophie wird anhand des Gewichts des rechten Ventrikels (RV) bezogen auf das Body Weight (BW) in mg/g angegeben, als auch der RV bezogen auf die Tibialänge (TL) in mg/mm.

Tab. 2: Gruppenunterschiede der Versuchstiere

| Gruppe | RV/BW (mg/g) - MW | RV/BW (mg/g) - SD | RV/TL (mg/mm) - MW | RV/TL (mg/mm) - SD |
|----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| SHR | 0,46 | 0,04 | 27,6 | 2,45 |
| SHR-RVH | 1,24 | 0,28 | 80,02 | 12,49 |
| WIS | 0,39 | 0,03 | 32,0 | 3,36 |

Tab. 2: Gruppenunterschiede der Versuchstiere normiert auf Mittelwert (MW) und SD. MW und SD von RV/BW und RV/TL der jeweiligen Gruppen (SHR, SHR-RVH, WIS) werden zur besseren Darstellung der Daten bestimmt.

3.6.1 Die funktionelle Einschränkung der Rechtsherzhypertrophie in SHR-RVH

Die hier genannten Funktionsdaten charakterisieren die verwendeten Tiere und dienen der Gruppeneinteilung, sind aber nicht Gegenstand der in dieser Arbeit weiterführenden Analysen.

Das rechtsventrikuläre Gewicht der SHR-RVH beträgt 80 ± 1 mg/mm und ist somit im Gegensatz zu den SHR und den WIS-Ratten deutlich erhöht (28 ± 2 mg/mm und 32 ± 3 mg/mm). Trotz des rechtsventrikulären Gewichts besteht kein Unterschied im Körpergewicht von SHR vs. SHR-RVH. Außerdem ist das Lebernassgewicht der SHR-RVH vs. SHR leicht erhöht ($2.31 \pm 0.$ mg/mm vs. 2.03 ± 0.13 mg/mm). Das Lebernassgewicht gilt als unabhängiger Indikator für Rechtsherzinsuffizienz (45). Weiterhin wurde als Teil der vorangegangenen Studien bei einem der SHR-RVH mit 7 Monaten eine Echokardiographie zur Überprüfung der links- und rechtsventrikulären Funktion durchgeführt. Gleiches wurde bei drei Tieren aus der SHR-Gruppe

durchgeführt. Diese Untersuchung zeigt, dass das besagte SHR-RVH-Tier sowohl eine verminderte rechtsventrikuläre „free area“ (RV FA), als auch eine verminderte „tricuspid annular plane systolic excursion“ (TAPSE) aufweist. Interessanterweise hatte dieses Tier auch die geringste Aktivität auf dem Laufrad, zu dem es uneingeschränkten Zugang hatte. Die SHR-RVH sind zu Lebzeiten nicht durch auffällige funktionelle Parameter, wie z.B. deren Laufradaktivität, aufgefallen. Zusammenfassend kann aufgrund der Daten (Organgewichte, Echokardiographie und Laufradaktivität) von einer Rechtsherzhypertrophie mit milder funktioneller Einschränkung der SHR-RVH ausgegangen werden.

4 Methoden

4.1 Aufbau des Projekts

Für das Projekt „**Beteiligung der Lunge bei der Entstehung einer extremen Rechtsherzhypertrophie in spontan hypertensiven Ratten**“ wurden auf der Grundlage der bestehenden Datenlage aus vorangegangenen Studien die folgenden drei Versuchsgruppen definiert:

SHR (n=9)

SHR-RVH (n=4)

WIS (n=6)

In dieser Arbeit geht es darum herauszufinden, ob sich die beobachtete spontane Entstehung einer starken, aber funktionell geringgradig relevanten Rechtsherzhypertrophie einiger Versuchstiere durch molekulare Anpassungsmechanismen in der Lunge erklären lassen. Dazu wird in der Lunge die Messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression von Genen untersucht, die eine Inflammation anzeigen, z.B. Stickstoffmonoxid-Synthase (*iNOS*), *IL-6* oder *MMP12*. Als Marker für oxidativen Stress gelten vor allem Cytochrom B-245 Alphakette (*CYBA*), Cytochrom B-245 Betakette (*CYBB*), Neutrophil cytosolic factor 1 (*NCF1*) und Neutrophil cytosolic factor 2 (*NCF2*); als Marker für Fibrose werden der Transforming growth factor beta 1 (*TGFβ1*), Typ1- und Typ 3 Kollagen (*COL1A1*, *COL3A1*), Elastin (*ELN*), Matrixmetalloproteinasen (*MMP2*, *MMP9* und *MMP12*) herangezogen; als Modulatoren des pulmonalen Gefäßwiderstandes gelten hier unter anderem *EDNI*, *ECE1*, *EDNRA*, *EDNRB*, *PTHLP*, *ACTA2*, *ADRB1* und *ADRB2* und als Marker der Lungenfunktion und Wachstumsregulation sind Perlipin-2 (*ADRP*) und die Ornithin Decarboxylase (*ODC*) wichtige Angriffspunkte. Eine mögliche Beeinträchtigung der Lungenfunktion (Oxygenierung des Blutes) wird indirekt über die Expression von Hypoxie-abhängigen Genen in der Niere (*EPO*, *VEGF*, *HIF2a*) überprüft. Zusätzlich wird die Expression des Endothelin-Systems im rechten Ventrikel untersucht. Im Rahmen der umfassenden Genexpressions-Analyse des Gewebes der Versuchstiere für das Projekt wird die Real-Time (RT)-PCR in vier großen Serien durchgeführt:

PCR-Serien 1 und 2 umfassen die Analyse der Genexpression des Lungengewebes der SHR-Ratten.

PCR-Serie 3 dient der Analyse der Genexpression im Nierengewebe der Versuchstiere.

PCR-Serie 4 beinhaltet die Analyse der Genexpression des rechten Ventrikels der SHR-Tiere.

Schlüsselbefunde der PCR werden anhand von Proteinexpression (Western-Blot, ELISA) im Gewebe und Plasma validiert. Sprich sowohl der gelelektrophoretische Proteinnachweis, als auch der antikörperbasierte Proteinnachweis unterstützen die Aussagen der Messdaten der PCR. Es werden verschiedene Western-Blots mit verschiedenen Antikörpern (siehe 2.5.1.) sowohl von der Lunge, als auch vom rechten Ventrikel der Versuchstiere angefertigt. Plasma und Lunge der Versuchstiere sind Ziel der Untersuchungen beim ELISA.

Die in den folgenden Abschnitten beschriebene Methodik orientiert sich an Standardprotokollen unseres Labors („Standard operating procedure“ (SOP) zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Befunde).

4.2 RT-PCR

4.2.1 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation

Die Analyse der aktuellen Genexpression (mRNA) von Zellen umfasst mehrere Schritte, angefangen mit der RNA-Isolierung des zu untersuchenden Gewebes mittels 1-Schritt RNA-Extraktionsverfahren.

Zunächst wird das zu untersuchende Gewebe in ein Precell-Röhrchen gegeben und je Probe unter dem Abzug mit 1 ml Trizol versetzt. Dieser Schritt dient der Lyse der Zellen und der Inaktivierung von RNAsen. Anschließend erfolgt die Homogenisierung der Proben mittels Precellys 24, wodurch ein gleichmäßig hoher Mischungszustand erzielt wird. Die Einstellung des Geräts umfasst 5000 rpm für 20 s.

Die Proben inkubieren 5 min, anschließend werden je 200 µl Chloroform pro Probe pipettiert. Es erfolgt das Vortexen der Proben bei ca. 1500 pro s, wodurch diese milchig werden. Die Proben inkubieren nun 10 min, bevor sie 15 min bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert werden.

Nun sind in den Proben drei Phasen zu erkennen, wobei die untere Phase aus Protein besteht, die Grenzphase aus Desoxyribonukleinsäure (DNA) und die obere Phase aus RNA. 500 µl der oberen Phase werden in ein neues Reagiergefäß pipettiert, mit je 500 µl Isopropanol versetzt, gevortext und 1 h bei -20 °C weggefroren. Anschließend werden die Proben erneut bei oben genannter Einstellung zentrifugiert.

Nun muss der Überstand abgeschüttet werden, sodass bloß das Pellet im Reagiergefäß verbleibt. 1ml 70-%-igen Ethanol werden je Gefäß pipettiert und gevortext, bis sich das Pellet vom Rand des Reagiergefäßes löst. Die Proben werden nun erneut bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Im Anschluss wird der Überstand abermals abgeschüttet, sodass die Proben nun 1 h trocknen können.

Zuletzt werden je Probe 50 µl Aqua dest. pipettiert, gevortext und nach ca. 1 h Inkubation auf Eis erneut gevortext.

Die nun fertigen Originalproben enthalten die isolierte RNA.

4.2.2 RNA-Quantifizierung/ NanoDrop

Der zweite Schritt in der Analyse der mRNA-Expression von Zellen stellt die Quantifizierung des je Probe enthaltenen RNA-Gehalts dar. Die Quantifizierung ist mitentscheidend für die Qualität der Analyse, da die Menge und die Integrität der RNA die nachfolgende komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)-Synthese und DNA-Amplifikation beeinflussen können.

Der RNA-Gehalt je Probe wird in einem spektrometrischen Verfahren mittels NanoDrop-1000 detektiert und als Verdünnungswert in ng/µl angegeben. Hierfür werden jeweils 1,5 µl der Probe luftblasenfrei auf das Messgerät pipettiert und soweit mit Aqua verdünnt, dass jede Probe einen RNA-Gehalt von ca. 1000 ng/µl enthält.

Letztendlich kann aus den ermittelten Verdünnungswerten nun die Vorbereitung der Proben für die nachfolgende cDNA-Synthese erfolgen. Es wird ein dreifacher Verdünnungsansatz gewählt:

$$(1000/ \text{Verdünnungswert (ng/}\mu\text{l)}) \cdot 3 = X$$

$$15 \mu\text{l} - X = Y$$

Der Reaktionsansatz jeder Probe soll 15 µl enthalten. Diese 15 µl setzen sich zum einen aus der RNA (X) zusammen und zum anderen aus Aqua (Y). Die ermittelten Werte für RNA und Aqua werden in kleine Reagiergefäße pipettiert, gevortext und bei -20 °C eingefroren.

4.2.3 cDNA-Synthese

Der dritte Schritt in der Analyse der mRNA-Expression von Zellen ist die cDNA-Synthese. Hierbei wird die RNA mittels reverser Transkription in die stabilere cDNA umgeschrieben.

Mittels Thermal Cycler werden die für die cDNA-Synthese vorbereiteten Proben (Reaktionsansatz aus 15 µl) zuerst 15 min bei 60 °C erwärmt. Anschließend werden je Probe 15 µl Reaktionsmix hinzu pipettiert und im Thermal Cycler 1 h auf 37 °C erwärmt, 5 min auf 95 °C erhitzt und zuletzt auf 5 °C abgekühlt. Abschließend wird die nun entstandene cDNA in einer 1:10 Verdünnung angesetzt, sprich zu den 30 µl cDNA werden 270 µl Aqua hinzugefügt.

Der Reaktionsmix für die cDNA-Synthese errechnet sich wie folgt:

$$\text{Probenzahl } n \cdot 3 (+ 10) = X$$

$$\text{Summe } (X \cdot Y) = \mu\text{l Mix } (\sum_{k=1}^6 (X \cdot Y) = l\text{Mix})$$

| | |
|----------------------------------|--------------|
| Reaktionsmix | X • Y |
| First Strand Buffer (FS) | X • 2 |
| Oligodesoxythymidin | X • 1 |
| Nukleosidtriphosphate (NTPs) | X • 1 |
| Dithiothreitol (DTT) | X • 0,5 |
| RNasin | X • 0,2 |
| Reverse Transkriptase (M-MLV-RT) | X • 0,3 |

4.2.4 DNA-Amplifikation

Der letzte Schritt in der Analyse der mRNA-Expression von Zellen stellt die PCR dar. Es erfolgt die exponentielle Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragments. Für eine Doppelbestimmung werden zunächst je Probe 2x3 µl der verdünnten cDNA und Aqua als Leerwert in die PCR-Tubes vorpipettiert.

Dann wird der PCR-Mix angesetzt:

10 • Anzahl der Proben n = µl Cyber Green

0,6 • n = µl Primer

6,4 • n = µl Aqua

Die Primer werden nach Angaben des Herstellers in einer 1:10 Verdünnung, je 1:1 FW- und RW-Primer eingesetzt.

Anschließend werden je 17 µl PCR-Mix je Tube pipettiert.

Nun erfolgt die RT-PCR am Icyler mit Hilfe des Programms Bio-Rad CFX Maestro 1.1:

| | | | |
|---|---------------|------------------------------|--|
| 1 | Zyklus | Schritt 1 | 95 °C, 15 min |
| 2 | Zyklus | Schritt 1 = Denaturierung | 95 °C, 30 s |
| | | Schritt 2 = Annäherung | Annäherungstemperatur (Temp.) nach Angaben des Herstellers (X°C), 30 s |
| | | Schritt 3 = Vervielfältigung | 72 °C, 30 s |
| 3 | Zyklus (100x) | Schritt 1 | 50 °C, 10 s (Temp. Erhöhung in 0,5 °C Schritten. Bis 100 °C) |

Die relative Quantifizierung der PCR erfolgt mit Hilfe eines Housekeeping-Gen. Hierfür wird Beta₂Mikroglobulin (*B2M*) für PCR-Serie 1 und 2, welche die Lunge analysieren, ausgewählt. Für PCR-Serie 3 der Niere wird ebenfalls *B2M* ausgewählt und für den

rechten Ventrikel erfolgt die Normierung anhand der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (*HPRT*) und ebenfalls mittels *B2M* für das Endothelin-System.

4.3 Gelelektrophoretischer Proteinnachweis

4.3.1 Aufbereitung der Probe/Proteinisolation

Die Proteinisolation beginnt mit der Herstellung einer geeigneten Pufferlösung:

1 ml Cell Lysis Puffer (10x)

9 ml Aqua

100 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS)

In einem Precell-Röhrchen werden 0,1 g des zu untersuchenden Gewebes mit 500 µl Pufferlösung versetzt und anschließend bei 6000 rpm 2x20 s im Precellys 24 homogenisiert. Nach 10-minütiger Inkubation der Proben auf Eis erfolgt eine 30-sekündige Behandlung mittels Ultraschallprozessor, welcher auf einer Amplitude von 60 % und Circles von 0,7 eingestellt ist. Anschließend werden die Proben 10 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, bevor der Überstand, der die isolierten Proteine enthält, in ein neues Eppendorf-Gefäß abpipettiert wird.

4.3.2 Proteinnormierung

Für die Proteinnormierung wird das Mikropipettierplatten-Prozedere nach Thermo Fisher gewählt und das Pierce Protein BCA Assay Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Dafür wird das Volumen des benötigten Working Reagents (WR) ermittelt und anschließend hergestellt. Der Hersteller gibt dafür folgende Formel an:

$$(\# \text{ standards} + \# \text{ unknowns}) \times (\# \text{ replicates}) \times (\text{volume of WR per sample}) = \text{total volume WR}$$

Das WR bestehend aus Reagenz A und B wird im Verhältnis 50:1 eingesetzt.

Weiterhin muss das Proteinoriginal in einer 1:10 Verdünnung vorliegen. Dafür werden in diesem Fall 6 µl Protein mit 54 µl Aqua versetzt, was dem Unbekannten entspricht.

Die Standards sind vom Hersteller vorgegebene Proben mit bekannter Konzentration an Protein.

Nun werden 2x25 µl von jedem Standard und jedem Unbekannten in die Mikropipettierplatte gegeben. Infolgedessen werden 200 µl des WR hinzugefügt. Die fertige Platte wird abgedeckt, 30 sec auf dem Schüttler gemischt und im Anschluss daran 30 min bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Schlussendlich erfolgt die spektrometrische Auswertung der Proben im ELISA-Reader zur Ermittlung der Proteinkonzentration bei einer Absorption von 562 nm mit Hilfenahme des Programms Tecan Magelan 6.

Aus diesen Ergebnissen kann der sogenannte Proteinmastermix pipettiert werden, welcher aus Protein, Aqua und 2x Laemmli besteht.

Der Mastermix wird bei 95 °C auf dem Heizblock für 5 min denaturiert und abzentrifugiert.

4.3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, die dem Auftrennen bestimmter Moleküle, in diesem Fall Proteine, dient. Es werden die Novex® Mini-Cell-Gelkammer und die NuPAGE™ 10 % Bis-Tris-Gele eingesetzt und nach Angaben des Herstellers vorbereitet.

Für die Durchführung muss ein Laufpuffer hergestellt werden:

50 ml 20 x MOPS SDS Running Puffer

950 ml Aqua

200 ml des Laufpuffers werden mit 500 µl NuPAGE Antioxidant versetzt und in die obere Laufkammer gegeben. Der übrige Puffer befüllt die untere Kammer. Nun werden mit Hilfe der Hamilton-Spritze 15 µl Probe je Geltasche pipettiert. Die erste Tasche wird mit 15 µl Marker befüllt.

Die Gelelektrophorese läuft 50 min bei 200 V Gleichstrom.

4.3.4 Western-Blot

Der Western-Blot schließt sich an die Gelelektrophorese an und dient der Übertragung der zuvor aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose Membran.

Auch hierfür wird die Novex® Mini-Cell-Gelkammer nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Zur Übertragung der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran wird der sogenannte Transferpuffer benötigt, welcher folgendermaßen hergestellt wird:

25 ml NuPAGE Transfer Puffer (20x)

375 ml Aqua

100 ml Methanol 20 %

500 µl NuPAGE Antioxidant

Anschließend wird aus Gel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier, Schwämmen sowie Transferpuffer die Transferkammer luftblasenfrei zusammengesetzt und in die Gelkammer eingesetzt. Zur Kühlung wird die Kammer außerdem mit Aqua befüllt.

Der Western Blot läuft nun ca. 1 h bei 30 V Gleichstrom.

Im Anschluss wird die Membran ca. 1 min in Wasser gewaschen, bevor sie zum Vermeiden der Aufnahme weiterer Proteine mit BSA (oder Milchpulver) geblockt wird. Für eine Membran benötigt man 5 ml Lösung (5 % BSA in 1 x TBS = 0,25 g BSA in 5 ml 1 x TBS oder 0,25 g Milchpulver in 1x TBS). Die Inkubationszeit beträgt 1 h auf dem Schüttler.

4.3.5 Proteinnachweis

Antikörper dienen der Detektion der Proteine auf der Membran, wobei das gesuchte Protein auf der Membran das Antigen darstellt.

Zunächst erfolgt die Inkubation der Membran mittels Erstantikörper in einer Antikörperlösung über Nacht auf dem Schüttler.

Am nächsten Tag erfolgt zuerst ein Waschvorgang der Membran mit Waschlösung, bestehend aus TBS (1X) mit 0,1 % Tween20 für 3 x 10 min. Hier wird der dritte Schritt ohne Tween20 durchgeführt. Im Anschluss erfolgt die Inkubation des Zweitantikörpers

für 1 h in der Antikörperlösung auf dem Schüttler. Zuletzt wird der Waschvorgang wiederholt.

Antikörperlösung:

TBS (1X) mit 0,1 % Tween20

5 % BSA oder Milchpulver

+ Antikörper

Je Membran werden 5 ml Antikörperlösung benötigt, sprich 0,25 g BSA (oder Milchpulver) auf 5 ml TBS (1X) mit 0,1 % Tween20. Der jeweilige Antikörper wird nach Angaben des Herstellers in einem bestimmten Verhältnis eingesetzt.

Abschließend erfolgt die Auswertung im Blot-Reader mit Hilfe des Computerprogramms Chemi-Capt. Die beiden Entwicklungslösungen werden zunächst in gleichem Verhältnis 2 min auf die Membran gegeben, bevor die Reaktion des Zweitantikörpers auf der Membran in der Dunkelkammer des Blot-Readers detektiert werden kann.

Die Validierung des Western Blots erfolgt mittels Housekeeping-Gen, in diesem Fall der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*GAPDH*). Die oben angegebenen Schritte zur Detektion der Proteine werden für die *GAPDH* erneut durchgeführt.

4.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.4.1 Aufbereitung der Probe

Bezüglich der Aufbereitung der Proben für den ELISA werden in diesem Fall zwei verschiedene Methoden nach Angaben des Herstellers unterschieden.

Zum einen werden Plasmaproben der Versuchstiere in einer 1:10 Verdünnung mit dem vom Hersteller CUSABIO® vorgegeben Sample vorbereitet. 20 µl Plasma werden mit 180 µl Sample in ein Reagiergefäß pipettiert. Anschließend wird ELISA-Serie 1 in Doppelbestimmung mit diesen Proben durchgeführt.

Zum anderen werden nach Angaben des Herstellers CUSABIO® Gewebehomogenisate aus den Lungen der Versuchstiere in folgenden Schritten angesetzt:

0,1 g des Gewebes werden mit 1 ml PBS im Precell-Röhrchen angesetzt und im Precellys 24 bei 6000 rpm 2 x 20 sec homogenisiert. Anschließend werden die Proben bei -20 °C über Nacht eingefroren.

Am folgenden Tag werden die Proben für 1 h aufgetaut, gevortext und 20 min bei -20 °C eingefroren. Dieser Vorgang wird anschließend 1x wiederholt. Im Anschluss daran werden die Proben bei 5000 rpm 5 min zentrifugiert. Nun kann der Überstand in ein Reagiergefäß abpipettiert werden und die gewonnenen Gewebehomogenisatproben für ELISA-Serie 2 in Einzelbestimmung verwendet werden.

4.4.2 Durchführung des ELISAs

Der ELISA dient dem antikörperbasierten Nachweis eines Antigens. Das nachzuweisende Antigen wird von einem sich auf der Platte befindlichen Erstantikörper detektiert und durch einen Enzym-gekoppelten Zweitantikörper farblich sichtbar gemacht. Der ELISA dient gleichwohl wie der Western Blot der Unterstützung der Aussagekraft der Messbefunde aus der RT-PCR.

Für die Durchführung werden die Proben zunächst wie oben angegeben aufbereitet. Im Anschluss erfolgt die Vorbereitung der für den Versuch benötigten Reagenzien nach Angaben des Herstellers: Biotin-Antikörper, Horseradish Peroxidase Avidin (HRPA) und Waschpuffer.

- 1 Biotin-Antikörper: Antikörper-Diluent, Verhältnis 1:100, es werden 100 µl pro Well eingesetzt.
- 2 HRP-Avidin: Antikörper-Diluent, Verhältnis 1:100, es werden 100 µl pro Well benötigt.
- 3 Waschlösung: 4ml Waschpuffer auf 100 ml Aqua, es werden 200 µl pro Well benötigt.

Im nächsten Schritt werden 100 µl der zu untersuchenden Probe je Well pipettiert (ggf. sind Einzel- oder Doppelbestimmung der Proben möglich). Es folgt die Inkubation der Platte bei 37 °C für 2 h im Inkubator. Anschließend wird die Flüssigkeit aus der Platte entfernt.

Im folgenden Schritt werden 100 µl Biotin-Antikörper je Well pipettiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wird die Flüssigkeit erneut entfernt und ein Waschvorgang schließt sich an. Hier werden 200 µl Waschlösung je Well pipettiert und diese wirkt 2 min lang ein. Der Vorgang wird 3 x wiederholt.

Der nächste Schritt umfasst das Pipettieren von 100 µl HRP-Avidin je Well und ebenfalls 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgt das Wiederholen des Waschvorgangs.

Anschließend werden 90 µl Tetramethylbenzidin (TMB) je Well hinzugegeben und für ca. 30 min lichtgeschützt bei 37 °C inkubiert.

Nun werden 50 µl Stopp-Reagenz je Well pipettiert, woraufhin die Platte innerhalb der nächsten 5 min im ELISA-Reader bei einer Absorption von 450 nm mit Hilfe der Software Tecan-I-Control™ ausgewertet werden muss.

4.5 Statistik

Zunächst werden diejenigen Messwerte von der elektronischen Datenverarbeitung und statistischen Analyse ausgeschlossen (Quality Check), die außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls (KI) liegen.

Die Normalverteilung der Daten wird anhand des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Handelt es sich nicht um eine Normalverteilung, so wird der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Die generierten normalverteilten Messwerte werden zur ersten Analyse einem Zweistichproben t-Test und die nicht-normalverteilten Messwerte dem Mann-Whitney-U-Test unterzogen, um zu prüfen, wie sich die Mittelwerte zweier Gruppen zueinander verhalten. Des Weiteren erfolgt die sogenannte Analysis of Variance (1-Weg ANOVA), um Gruppenunterschiede zwischen mehreren Gruppen zu ermitteln. Der Student-Newman-Keuls-Test oder die Bonferroni-Korrektur für multiples Testen wird zur Analyse der Unterschiede zwischen mehreren Gruppen verwendet.

Das Signifikanzniveau wird im Vorhinein auf $p < 0,05$ festgelegt.

Normalverteilte Daten werden als Mediane, Quartile und Totale Ranges in Box-Whisker-Blots dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Transkriptionelle Genalterationen in der Lunge von SHR-RVH vs. SHR

Ein groß angelegtes Screening mittels RT-PCR diente der Identifikation von Unterschieden in der Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression bestimmter Marker-Gene in der Lunge von SHR-RVH vs. SHR, die als Anzeige für die Aktivierung pathophysiologisch relevanter Vorgänge dienen können. Untersucht wurden vor allem Gene, die in Prozessen wie Lungenentwicklung und -differenzierung, Entzündungsreaktion, Fibrose, Vasokonstriktion und -dilatation, oxidativer Stress und dem Endothelin-System teilhaben (Siehe Tab. 3). Unterschiede in der mRNA-Expression konnten vor allem bei den Genen *PTHLP*, *ADRB1* und *EDNRB* festgestellt werden, wobei die Expression in den SHR-RVH-Tieren im Gegensatz zu den SHR jeweils vermindert ist und bei *ACTA2*, dessen Expression in den SHR-RVH erhöht ist.

Weiterhin wurden die oben genannten Gruppen mit normotensiven WIS-Ratten verglichen. Im Vergleich der SHR + SHR-RVH vs. WIS konnte eine erhöhte Expression von *NCF1*, *ODC*, *MMP12* und *ACTA2* sowie eine verminderte Expression von *ADRB2* in den SHR festgestellt werden. Selbige Gene waren in SHR vs. SHR-RVH jedoch nicht verändert.

Insbesondere der Unterschied der gefäßabhängigen Gene *ACTA2* und *ADRB2* soll in Abb. 1 verdeutlicht werden.

Tab. 3: Die mRNA-Expression relevanter Gene in der Lunge SHR-RVH vs. SHR

| Name des Gens | Unterschiede im 95%-KI | Effektgröße | p-Wert |
|---------------|---------------------------|-------------|--------|
|---------------|---------------------------|-------------|--------|

Extrazelluläre Matrix

| | | | |
|---------------|----------------------|--------|---------|
| <i>TGFBI</i> | -0,09 (-0,65 – 0,48) | -0,197 | p=0,749 |
| <i>ELN</i> | 0,10 (-0,15 – 0,35) | 0,541 | p=0,388 |
| <i>COL1A1</i> | 0,04 (-0,44 – 0,51) | 0,105 | p=0,864 |
| <i>COL3A1</i> | 0,08 (-0,06 – 0,79) | 1,145* | p=0,083 |

| | | | |
|--------------|----------------------|--------|---------|
| <i>MMP2</i> | 0,08 (-0,59 – 0,75) | 0,165 | p=0,789 |
| <i>MMP9</i> | -0,68 (-3,50 – 2,15) | -0,356 | p=0,605 |
| <i>MMP12</i> | -0,73 (-4,00 – 2,55) | -0,293 | p=0,636 |

Oxidativer Stress

| | | | |
|-------------|----------------------|--------|---------|
| <i>CYBA</i> | -0,19 (-0,74 – 0,36) | -0,459 | p=0,461 |
| <i>CYBB</i> | -0,61 (-2,56 – 1,31) | -0,422 | p=0,497 |
| <i>NCF1</i> | -0,78 (-2,39 – 0,84) | -0,636 | p=0,312 |
| <i>NCF2</i> | 0,26 (-0,83 – 1,34) | 0,316 | p=0,609 |

Lungenentwicklung und Funktion

| | | | |
|--------------|-----------------------|--------|---------|
| <i>PTHLP</i> | 0,78 (-0,34 – 1,90) | 0,919* | p=0,155 |
| <i>PTH1R</i> | -0,00 (-0,36 – 0,36) | -0,012 | p=0,984 |
| <i>ODC1</i> | 0,04 (-0,52 – 0,59) | 0,088 | p=0,887 |
| <i>PLIN2</i> | 1,77 (-16,99 – 20,53) | 0,140 | p=0,838 |

Entzündung

| | | | |
|--------------------------------|-----------------------|---------|---------|
| <i>IL6</i> | -4,05 (-15,73 – 7,63) | -1,053* | p=0,351 |
| <i>NOS2</i> | -0,22 (-0,69 – 0,24) | -0,636 | p=0,312 |
| <i>PPARγ</i> | -0,10 (-1,14 – 0,94) | -0,129 | p=0,834 |
| <i>CXCR4</i> | -0,12 (-3,88 – 3,64) | -0,043 | p=0,944 |

Vasokonstriktion und Vasodilatation

| | | | |
|--------------|----------------------|---------|---------|
| <i>ADRB1</i> | -0,52 (-0,11 – 1,16) | 1,081* | p=0,099 |
| <i>ADRB2</i> | -0,11 (-0,28 – 0,06) | 0,865* | p=0,178 |
| <i>ACTA2</i> | -1,33 (-2,77 – 0,11) | -1,219* | p=0,067 |

Endothelin-System

| | | | |
|--------------|----------------------|--------|---------|
| <i>EDNRA</i> | 0,25 (-1,58 – 2,09) | 0,181 | p=0,769 |
| <i>EDNRB</i> | 1,87 (-0,48 – 4,22) | 1,050* | p=0,108 |
| <i>ECE1</i> | -0,00 (-0,94 – 0,94) | -0,001 | p=0,999 |
| <i>EDNI</i> | -0,45 (-1,25 – 0,35) | -0,740 | p=0,244 |

Tab. 3: Dargestellt ist die mRNA-Expression relevanter Gene in der Lunge von SHR-RVH (n=4) vs. SHR (n=9). Unterschiede (große Effektgrößen mit Cohen's $d > 0,8$) sind mit * kenntlich gemacht; negative Werte SHR-RVH > SHR; t-Tests werden in Spalte drei angegeben; die Expression wurde auf das Housekeeping-Gen *B2M* normiert.

Abb. 1: Die mRNA-Expression von gefäßabhängigen Genen in der Lunge

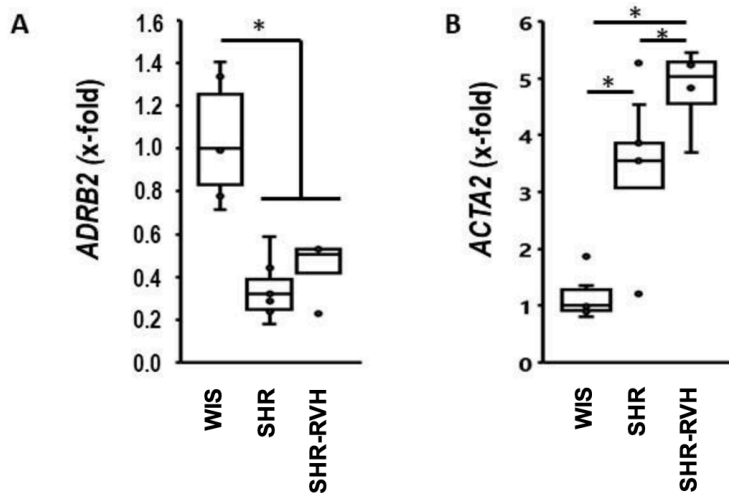


Abb. 1: Die mRNA-Expression von gefäßabhängigen Genen in der Lunge. Dargestellt ist die Expression von *ADRB2* und *ACTA2*, von WIS (n=6), SHR (n=9) und SHR-RVH (n=4). Daten werden als Box-Whisker-Plots dargestellt, wobei Mediane und Quartile durch die Boxen und die Totale Range durch die Whisker repräsentiert werden. Normiert wird auf das Housekeeping-Gen *B2M*. A) *ADRB2*: Die 1-Weg ANOVA beträgt $p=0,000009$, *, $p<0,05$ für WIS vs. SHR+SHR-RVH. B) *ACTA2*: die 1-Weg ANOVA beträgt $p=0,000038$, *, $p<0,05$ für WIS vs. SHR, WIS vs. SHR-RVH und SHR vs. SHR-RVH.

5.2 Das Endothelin-System in der Lunge von SHR-RVH auf den verschiedenen Ebenen

5.2.1 Die Genexpression des Endothelin-Systems

Auf transkriptioneller Ebene ist *EDNI* in der Lunge von SHR-RVH im Gegensatz zu SHR und WIS nicht signifikant verändert. Auch die Expression der Gene des Rezeptors

EDNRA und des Enzyms *ECE1* in der Lunge von SHR-RVH ist zu den Vergleichsgruppen nicht signifikant verändert.

Gefunden wurde jedoch eine verminderte Expression des von *EDNRB*, bei welchem es sich um den Endothelin-Clearance-Rezeptor handelt (15), in der Lunge von SHR-RVH im Vergleich zu SHR und WIS. Gleichermäßen ist die Expression des Rezeptors *EDNRB* bei SHR im Gegensatz zu den beiden Vergleichsgruppen erhöht.

Abb. 2: Die mRNA-Expression des Endothelin-Systems in der Lunge

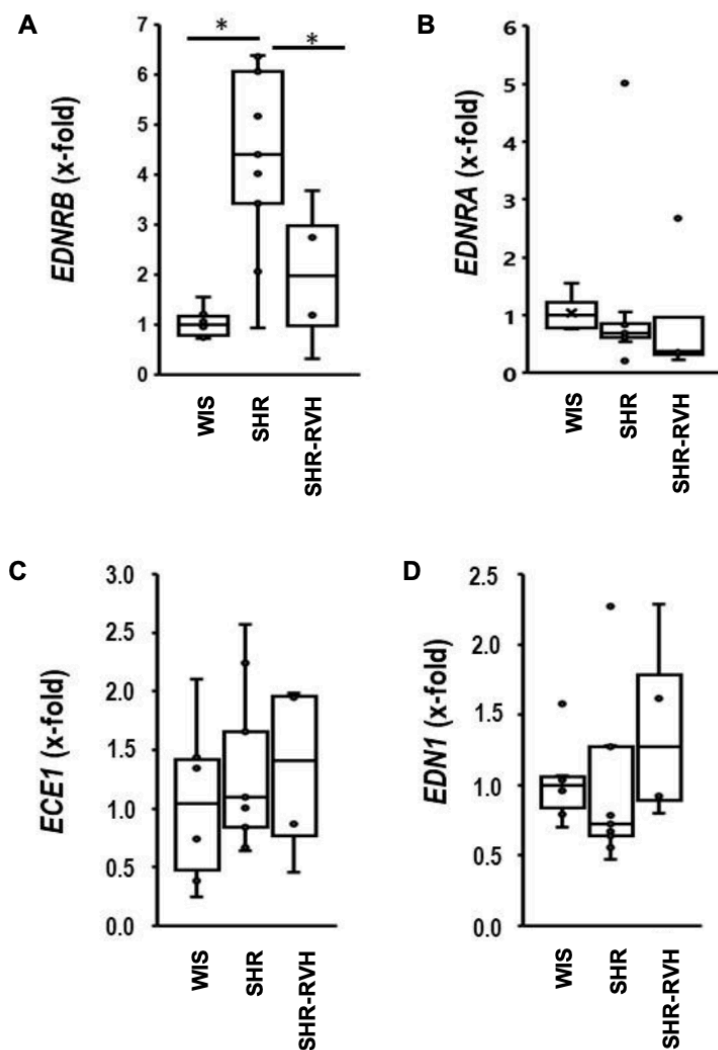


Abb. 2: Die mRNA-Expression des Endothelin-Systems in der Lunge: Dargestellt ist die mRNA-Expression von *EDNRB*, *EDNRA*, *ECE1* und *EDN1* in der Lunge von WIS (n=6), SHR (n=9) und SHR-RVH (n=4). Daten werden als Box-Whisker-Plots dargestellt, wobei Mediane und Quartile durch die Boxen und die Totale Range durch die Whisker repräsentiert werden. Normiert wird auf das Housekeeping-Gen *B2M*. A) *EDNRB*: Die 1-Wege ANOVA ergibt $p=0,007$; *, $p<0,05$ für WIS vs. SHR und SHR vs. SHR-RVH. B) *EDNRA*: Kruskal-Wallis-Test $p=1,164$; C) *ECE1*: Kruskal-Wallis-Test $p=0,73$; D) *EDN1*: Kruskal-Wallis-Test $p=0,199$.

5.2.2 Der Einfluss der Genexpression auf die Konzentration von ET-1

SHR-RVH weisen im Gegensatz zu SHR und WIS erhöhte Konzentrationen von ET-1 in der Lunge auf. Die plasmatische Konzentration des ET-1 ist in SHR-RVH jedoch nicht signifikant verändert. Es ist anzunehmen, dass die oben beschriebene verminderte Expression von *EDNRB* in SHR-RVH für diese erhöhte lokale Konzentration von ET-1 in der Lunge verantwortlich ist. Gleichzeitig zeigen SHR eine verminderte ET-1 Konzentration in der Lunge, wobei diese Tiere die höchsten *EDNRB*-Level aufweisen.

Abb. 3: Die Konzentration von ET-1 in Lunge und Plasma

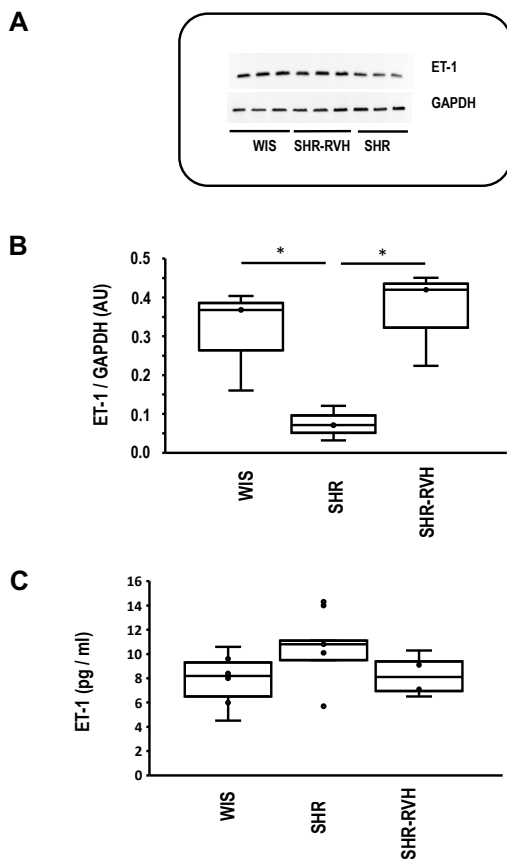


Abb. 3: Die Konzentration von ET-1 in Lunge und Plasma: A) Zeigt einen repräsentativen Western-Blot von ET-1 in der Lunge von WIS, SHR und SHR-RVH. B) Dargestellt ist die Validierung des in A dargestellten Western-Blots bezogen auf das Housekeeping-Gen *GAPDH*. Der Kruskal-Wallis-Test beträgt $p=0,014$; $p<0,05$ für SHR vs. SHR-RVH. C) ELISA: Dargestellt ist die Plasmakonzentration von ET-1 für WIS ($n=6$), SHR ($n=9$) und SHR-RVH ($n=4$). Die 1-Weg ANOVA ergibt einen Wert von $p=0,197$. Die Daten werden als Box-Whisker-Plots dargestellt, wobei Mediane und Quartile durch die Boxen und die Totale Range durch die Whisker repräsentiert werden.

5.3 *PTHLP* in der Lunge von SHR-RVH

Das ubiquitär exprimierte *PTHLP* hat, wie bereits oben beschrieben, verschiedene gewebespezifische Wirkungen, so auch in der Lunge, z.B. seine vasodilatatorischen Eigenschaften.

Die Expression von *PTHLP* in der Lunge von SHR-RVH ist im Vergleich zu den SHR vermindert. Die Expression von *PTHLP* in der Lunge von SHR-RVH und normotensiven WIS-Ratten unterscheidet sich nicht.

Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen *PTHLP* und dem Endothelin-System, denn *PTHLP* beeinflusst möglicherweise die Expression von ET-1 in der Lunge. Eine verminderte Expression von *PTHLP* in SHR-RVH führt möglicherweise zu einer erhöhten lokalen Konzentration von ET-1 in der Lunge dieser Tiere (26).

Abb. 4: Die mRNA-Expression von *PTHLP* in der Lunge

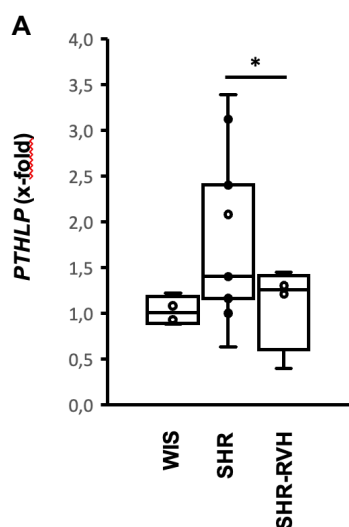


Abb. 4: A) Die mRNA-Expression von *PTHLP* in der Lunge: Dargestellt ist die mRNA-Expression von *PTHLP* in der Lunge von SHR (n=9), SHR-RVH (n=4) und WIS (n=6). Daten werden als Box-Whisker-Plots dargestellt, wobei Mediane und Quartile durch die Boxen und die Totale Range durch die Whisker repräsentiert werden. Normiert wird auf das Housekeeping Gen *B2M*. Die 1-Weg ANOVA beträgt $p=0,104$.

5.4 Transkriptionelle Genalterationen im rechten Ventrikel von SHR-RVH vs. SHR

Ein groß angelegtes Screening mittels RT-PCR dient der Identifikation von Unterschieden in der Expression relevanter Gene im rechten Ventrikel von SHR-RVH vs. SHR, die in der Entstehung einer Rechtsherzhypertrophie in SHR beteiligt sein könnten. Untersucht wurden vor allem Gene, die in Prozessen wie Entwicklung und Differenzierung, Verminderung der kardialen Funktion, kardiales Remodeling, Hypertrophie, Aufbau der extrazellulären Matrix, oxidativer Stress, Entzündungsreaktion, Stoffwechsel, sowie Vasokonstriktion und -dilatation teilhaben (Siehe Tab. 4).

Dabei konnte in den meisten Genen kein Unterschied zwischen SHR-RVH und SHR beobachtet werden.

Festgestellt wurde eine Hochregulation der entzündungsabhängigen Gene Chemokin-Ligand-2 (*CCL2*), von Willebrand Faktor (*vWF*), *IL-6* und *MMP12* im rechten Ventrikel von SHR-RVH vs. SHR (Siehe Abb. 5). Es lässt sich demnach also vermuten, dass eine Entzündungsreaktion im rechten Ventrikel der SHR-RVH an der Entstehung der Rechtsherzhypertrophie beteiligt sein könnte.

Weiterhin zeigt sich eine Hochregulation von *NPPB* und *CILP* und eine Herunterregulation von *ATP2A2* in SHR-RVH, die mit einer Rechtsherzhypertrophie assoziiert sind.

Tab. 4: Die mRNA-Expression relevanter Gene im rechten Ventrikel von SHR-RVH vs. SHR

| Name des Gens | Unterschiede im 95%-KI | Effektgröße | p-Wert |
|---------------|---------------------------|-------------|--------|
|---------------|---------------------------|-------------|--------|

Kardiale Differenzierung und Hypertrophie

| | | | |
|---------------|------------------------|---------|---------|
| <i>NPPA</i> | -0,26 (-0,70 – 0,17) | -0,704 | p=0,475 |
| <i>NPPB</i> | -6,47 (-11,47 – -1,47) | -1,506* | p=0,290 |
| <i>MYH6</i> | 0,80 (-0,11 – 1,71) | 1,019* | p=0,082 |
| <i>MYH7</i> | 2,92 (-5,28 – 11,11) | 0,414 | p=0,465 |
| <i>ACTC1</i> | 0,14 (-0,67 – 0,39) | -0,316 | p=0,718 |
| <i>ACTN2</i> | 0,26 (-0,49 – 1,00) | 0,399 | p=0,482 |
| <i>FGF2</i> | 0,33 (-0,32 – 0,98) | 0,586 | p=0,305 |
| <i>DES</i> | 0,27 (-1,22 – 1,75) | 0,210 | p=0,760 |
| <i>DNM1L</i> | 1,04 (-0,85 – 2,94) | 0,641 | p=0,263 |
| <i>EFHD2</i> | -0,45 (-1,95 – 1,04) | -0,353 | p=0,532 |
| <i>OSM</i> | -0,06 (-0,82 – 0,70) | -0,095 | p=0,866 |
| <i>OSMR</i> | 0,09 (-0,59 – 0,41) | -0,200 | p=0,722 |
| <i>CXCR4</i> | -0,01 (-0,70 – 0,69) | -0,010 | p=0,986 |
| <i>CXCL12</i> | 0,30 (-1,39 – 1,99) | 0,207 | p=0,714 |

| | | | |
|--------------|----------------------|---------|---------|
| <i>GATA4</i> | 0,06 (-0,71 – 0,83) | 0,087 | p=0,877 |
| <i>MEF2C</i> | 0,16 (-0,52 – 0,84) | 0,271 | p=0,632 |
| <i>CCL2</i> | -1,41 (-3,44 – 0,62) | -2,395* | p=0,115 |
| <i>CRYAB</i> | -0,08 (-0,23 – 0,08) | -0,556 | p=0,330 |
| <i>MYO6</i> | 0,10 (-0,26 – 0,46) | 0,319 | p=0,572 |

Kardiale Funktion

| | | | |
|---------------|----------------------|--------|---------|
| <i>SLC8A1</i> | 0,47 (-0,80 – 1,74) | 0,429 | p=0,450 |
| <i>ATP2A2</i> | 1,60 (-0,13 – 3,07) | 1,269* | p=0,034 |
| <i>CASR</i> | -0,11 (-0,40 – 0,18) | -0,431 | p=0,448 |
| <i>ADRB1</i> | 0,27 (-0,59 – 1,13) | 0,368 | p=0,516 |
| <i>ADRB2</i> | -0,02 (-0,29 – 0,25) | -0,117 | p=0,835 |

Extrazelluläre Matrix

| | | | |
|---------------|-----------------------|---------|---------|
| <i>BGN</i> | -0,37 (-0,69 – -0,06) | -1,373* | p=0,023 |
| <i>DCN</i> | -0,02 (-0,19 – 0,16) | -0,106 | p=0,851 |
| <i>COL1A1</i> | -0,02 (-0,37 – 0,32) | -0,084 | p=0,882 |
| <i>COL3A3</i> | -0,22 (-1,05 – 0,61) | -0,313 | p=0,582 |
| <i>CCN2</i> | -3,86 (-8,73 – 1,01) | -0,922* | p=0,410 |
| <i>LOX</i> | 0,09 (-0,37 – 0,55) | 0,238 | p=0,428 |
| <i>MMP12</i> | -2,53 (-4,32 – -0,74) | -1,641* | p=0,259 |

Oxidativer Stress

| | | | |
|---------------|----------------------|---------|---------|
| <i>SOD1</i> | 0,01 (-0,27 – 0,28) | 0,038 | p=0,946 |
| <i>SOD2</i> | 0,13 (-0,59 – 0,86) | 0,214 | p=0,704 |
| <i>SOD3</i> | 0,20 (-0,22 – 0,62) | 0,559 | p=0,327 |
| <i>CYBA</i> | -0,32 (-0,57 – 0,06) | -1,414* | p=0,250 |
| <i>CYBB</i> | 0,11 (-1,10 – 1,33) | 0,109 | p=0,846 |
| <i>NFE2L2</i> | 0,03 (-0,57 – 0,63) | 0,057 | p=0,919 |

Arginin Stoffwechsel

| | | | |
|--------------|----------------------|---------|---------|
| <i>ARG1</i> | 0,06 (-0,21 – 0,33) | 0,256 | p=0,576 |
| <i>ARG2</i> | -0,21 (-0,43 – 0,00) | -1,139* | p=0,055 |
| <i>NOS3</i> | -0,00 (-0,52 – 0,52) | 0,000 | p=1,000 |
| <i>ODC1</i> | -0,36 (-0,93 – 0,21) | -0,730 | p=0,204 |
| <i>TGFBI</i> | 0,03 (-0,19 – 0,25) | 0,140 | p=0,804 |
| <i>NOS2</i> | 0,38 (-0,05 – 0,80) | 1,019* | p=0,007 |

Mitochondriale Funktion

| | | | |
|-----------------|----------------------|--------|---------|
| <i>UCP2</i> | -0,04 (-0,24 – 0,15) | -0,256 | p=0,650 |
| <i>UCP3</i> | 0,13 (-1,56 – 1,82) | 0,092 | p=0,871 |
| <i>HADHA</i> | 0,09 (-0,08 – 0,25) | 0,609 | p=0,287 |
| <i>PPARGCIA</i> | 0,72 (-0,93 – 2,37) | 0,507 | p=0,373 |

Stoffwechsel und Entzündung

| | | | |
|---------------|------------------------|---------|---------|
| <i>PCSK9</i> | -0,33 (-0,63 – -0,03) | -1,286* | p=0,329 |
| <i>SST</i> | -0,19 (-0,46 – 0,08) | -0,820 | p=0,156 |
| <i>SLC2A1</i> | 0,70 (-0,53 – 1,94) | 0,660 | p=0,249 |
| <i>SLC2A4</i> | 1,12 (-0,47 – 2,72) | 0,818 | p=0,157 |
| <i>IL6</i> | -3,530 (-5,76 – -1,30) | -1,844* | p=0,198 |
| <i>IL6R</i> | 0,51 (-0,37 – 1,40) | 0,675 | p=0,099 |

Kardiales Gefäßsystem

| | | | |
|--------------|-----------------------|--------|---------|
| <i>CDH5</i> | 0,17 (-0,11 – 0,45) | 0,721 | p=0,210 |
| <i>VEGFA</i> | 0,71 (-0,91 – 2,34) | 0,514 | p=0,366 |
| <i>vWF</i> | -0,37 (-0,73 – -0,01) | -1,192 | p=0,045 |

Tab. 4: Dargestellt ist die mRNA-Expression relevanter Gene im rechten Ventrikel von SHR-RVH (n=4) vs. SHR (n=9). Unterschiede (große Effektgrößen mit Cohen's $d > 0,8$) sind mit * kenntlich gemacht; negative Werte SHR-RVH $>$ SHR; t-Tests werden in Spalte drei angegeben; die Expression wurde auf das Housekeeping-Gen *HPRT* normiert.

Abb. 5: Die mRNA-Expression entzündungsabhängiger Gene im rechten Ventrikel von SHR-RVH

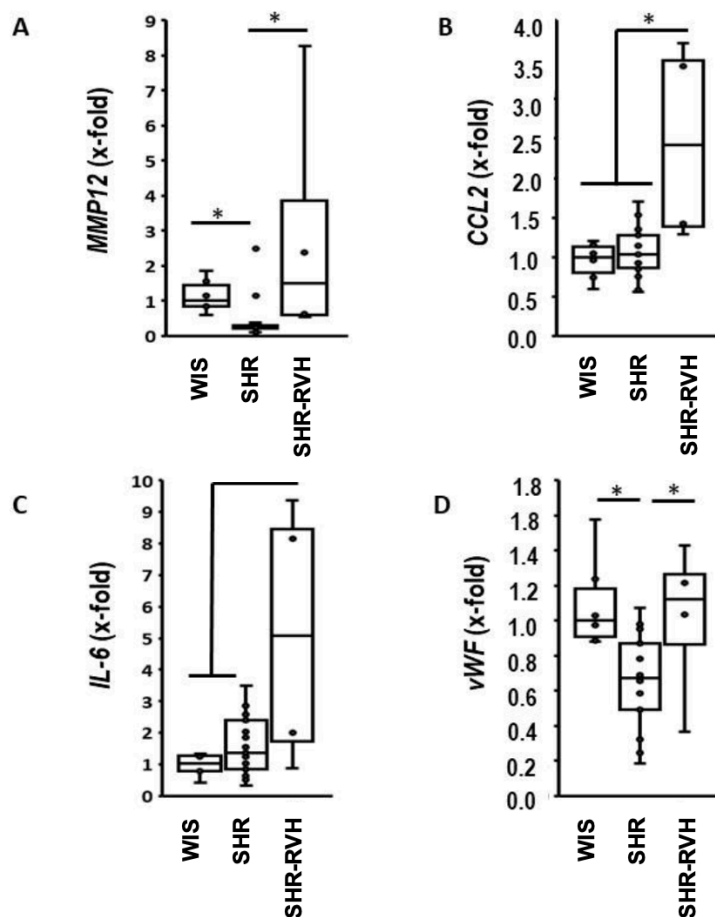


Abb. 5: Die mRNA-Expression entzündungsabhängiger Gene im rechten Ventrikel von SHR-RVH. Dargestellt ist die mRNA-Expression von *MMP12*, *CCL2*, *IL-6* und *vWF* im rechten Ventrikel von WIS (n=6), SHR (n=17) und SHR-RVH (n=4). Daten werden als Box-Whisker-Plots dargestellt, wobei Mediane und Quartile durch die Boxen und die Totale Range durch die Whisker repräsentiert werden. Die Validierung erfolgt anhand von *HPRT*. A) *MMP12*: Kruskal-Wallis-Test: $p=0,002$; *, $p<0,05$ für WIS vs. SHR ($p=0,01$) und SHR vs. SHR-RVH ($p=0,024$). B) *CCL2*: 1-Weg ANOVA: $p=0,000205$; *, $p<0,05$ für SHR-RVH vs. WIS+SHR. C) *IL-6*: 1-Weg ANOVA: $p=0,002$; *, $p<0,05$ für SHR-RVH vs. WIS+SHR. D) *vWF*: 1-Weg ANOVA: $p=0,006$; *, $p<0,05$ für SHR-RVH vs. WIS+SHR.

5.5 Das Endothelin-System im rechten Ventrikel von SHR-RVH

Betrachtet man das Endothelin-System im rechten Ventrikel von SHR-RVH, findet sich eine starke Herabregulation des Gens für *EDNRA*, wohingegen im rechten Ventrikel von SHR *EDNRA* stark hochreguliert ist (siehe Abb. 6, A). Die Regulation des *EDNRA*-Gens spiegelt auch die Konzentration seines Genprodukts wider (Siehe Abb. 7, A/B). Außerdem findet sich im rechten Ventrikel von SHR-RVH die geringste Expression der Gene *ECE1* und *EDN1*.

Abb. 6: Die mRNA-Expression des Endothelin-Systems im rechten Ventrikel

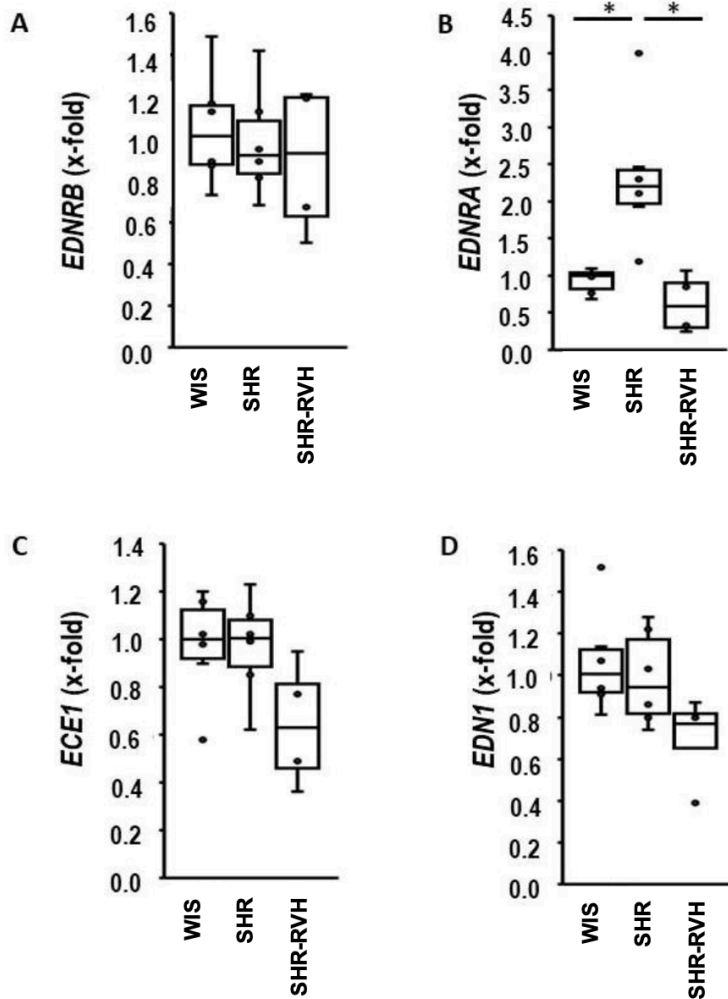


Abb. 6: Die mRNA-Expression des Endothelin-Systems im rechten Ventrikel. Dargestellt ist die mRNA-Expression von *EDNRB*, *EDNRA*, *ECE1* und *EDN1* im rechten Ventrikel von WIS (n=6), SHR (n=9), SHR-RVH (n=4). Daten werden als Box-Whisker-Plots dargestellt, wobei Mediane und Quartile durch die Boxen und die Totale Range durch die Whisker repräsentiert werden. Normiert wird auf das Housekeeping-Gen *B2M*. A) *EDNRB*: 1-Weg ANOVA $p=0,796$. B) *EDNRA*: 1-Weg ANOVA $p=0,001$, $p<0,05$ SHR vs. WIS+SHR-RVH. C) *ECE1*: 1-Weg ANOVA $p=0,081$. D) *EDN1*: 1-Weg ANOVA $p=0,070$.

Abb. 7: Die Konzentration des Proteinprodukts von *EDNRA* im rechten Ventrikel

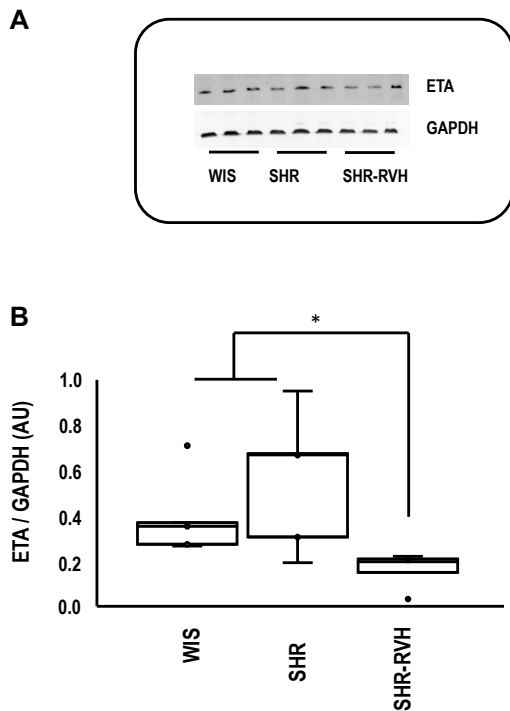


Abb. 7: Die Konzentration des Proteinprodukts von *EDNRA* im rechten Ventrikel. A) Dargestellt ist der repräsentative Western-Blot von *EDNRA* im rechten Ventrikel von SHR (n=5), SHR-RVH (n=4) und WIS (n=5). B) Dargestellt ist die Quantifizierung der Proteinexpression von *EDNRA*. Validiert wird mit Hilfe des Housekeeping-Gens *GAPDH*. Die Daten werden als Box-Whisker-Plots dargestellt, wobei Median und Quartilen durch die Boxen und die Totale Range durch die Whisker repräsentiert werden. Der Kruskal-Wallis-Test beträgt $p=0,038$ für WIS; $p=0,052$ für SHR-RVH. Der Shapiro-Wilk-Test beträgt $p=0,610$ für SHR. Nach Bonferroni-Korrektur ist $p=0,098$ für WIS vs. SHR-RVH und $p=0,056$ für SHR vs. SHR-RVH. Die 1-Weg ANOVA beträgt $p=0,042$.

5.6 Die Expression Hypoxie-assoziiierter Gene in der Niere der SHR-RVH

In der Niere findet unter anderem die Produktion des Erythrozyten stimulierenden Hormons *EPO* sowie verschiedener vaskulärer Wachstumsfaktoren statt. Diese sogenannten Hypoxie-assoziierten Gene könnten einen Beitrag zur Entstehung der Rechtsherzhypertrophie in den Tieren haben. Die Expression von *EPO*, *VEGF*, *NRF2* und *HIF2 α* in der Niere von SHR-RVH ist im Gegensatz zu den Vergleichsgruppen allerdings nicht verändert.

6 Diskussion der Erkenntnisse

6.1 Hauptbefunde der Arbeit

Wie bereits beschrieben, wird in dieser Studie untersucht, ob transkriptionelle Veränderungen in der Lungenstrombahn für die Rechtsherzhypertrophie der SHR verantwortlich sind. Die Schlüsselbefunde wurden auf Proteinebene validiert.

SHR entwickeln normalerweise eine systemische Hypertonie, aber nur milden bis keinen Lungenhochdruck und demnach keine Rechtsherzhypertrophie. Diese Aussage stimmt mit dem Großteil der Ergebnisse vorangegangener Studien überein, allerdings wurde mit einer Prävalenz von 7 % eine Subgruppe aus dem Stamm SHR/NHsd identifiziert, die unabhängig ihres Alters eine schwere Rechtsherzhypertrophie entwickelten.

Die Identifikation dieser Tiere erfolgte post mortem. Da interessanterweise alle zu Lebzeiten durchgeführten funktionellen Tests unauffällig waren, kann von einer molekulargenetischen Ursache für die schwere, jedoch funktionell nur leichtgradig eingeschränkte Rechtsherzhypertrophie der SHR-Tiere ausgegangen werden.

Bei dem Projekt „**Beteiligung der Lunge bei der Entstehung einer extremen Rechtsherzhypertrophie in spontan hypertensiven Ratten**“ konnte das molekulargenetische Screening der Lunge und des rechten Ventrikels von SHR-RVH vs. SHR vs. WIS folgende Schlüsselbefunde darlegen:

- 1 Der *EDNRB*-Rezeptor ist in der Lunge von SHR-RVH herunterreguliert, was zu einer erhöhten lokalen Konzentration des Vasokonstriktors ET-1 führt.
- 2 Das *PTHLP* ist in der Lunge von SHR-RVH herunterreguliert, was ebenfalls zu einer erhöhten lokalen Konzentration von ET-1 führt.
- 3 Das für Aktin kodierende Gen *ACTA2* ist in der Lunge von SHR-RVH erhöht exprimiert, was für Gefäßumbauprozesse in der Lunge spricht.

- 4 Im rechten Ventrikel von SHR-RVH zeigt sich eine Herunterregulation des *EDNRA*-Rezeptors, was für eine Resistenz des rechten Ventrikels gegenüber einer schädigenden ET-1-Wirkung spricht.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Molekulargenetische Veränderungen der Lunge von SHR-RVH

Die zentralen Ergebnisse des Projekts umfassen Veränderungen im Endothelin-System in der Lunge bei SHR-RVH.

Einer der Schlüsselbefunde ist die Herunterregulation des *EDNRB* auf transkriptioneller Ebene in der Lunge von SHR-RVH, der für die Clearance des vasokonstriktorisch wirkenden Hormons ET-1 verantwortlich ist (15,23,53), was somit zu einer erhöhten pulmonalen Konzentration dieses Hormons führt. Die erhöhten pulmonalen ET-1-Spiegel in SHR-RVH können wiederum eine Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße auslösen und zusätzlich über eine Induktion des Gefäßumbaus die Nachlast des rechten Ventrikels erhöhen, was kompensatorisch zu einer Rechtsherzhypertrophie führt (24). Bei SHR-Tieren ohne Rechtsherzhypertrophie zeigt sich allerdings eine Hochregulation des *EDNRB* bei gleichzeitig geringen ET-1-Spiegeln, was vermuten lässt, dass so die Konzentration von ET-1 geringgehalten und dadurch die Tiere vor der Entstehung einer Rechtsherzhypertrophie geschützt werden könnten. Außerdem wird postuliert, dass SHR unter bestimmten PH-triggernden Bedingungen sensitiver für die Entwicklung einer PH sind, wobei das Endothelin-System mit erniedrigtem *EDNRB* und erhöhten ET-1-Spiegeln eine wesentliche Rolle zu spielen scheint (18). Die PH wiederum triggert dann ebenfalls die Entstehung einer Rechtsherzhypertrophie in SHR-RVH (22).

Insgesamt scheinen SHR im Gegensatz zu WIS-Ratten sehr sensitiv auf die ET-1 vermittelten Effekte zu reagieren, was auch weitere Studien zeigen (18). Ähnliche Zusammenhänge konnten beispielsweise in Lämmern gezeigt werden, bei denen die PH ebenfalls zu einer Herunterregulation des *EDNRB*-Rezeptors führt (4).

Ein weiteres Indiz für die Verbindung des Endothelin-Systems, der PH und der Rechtsherzhypertrophie ist die Tatsache, dass Endothelin-Rezeptor-Antagonisten eine der wirksamsten zugelassenen Therapieoptionen im Rahmen der PH darstellen (40) und

die Reduktion der ET-1-Aktivität die Rechtsherzhypertrophie in Ratten verringern kann (38, 39).

Im Gegensatz zur lokalen ET-1-Konzentration in der Lunge ist die plasmatische ET-1-Konzentration nicht verändert. Ebenfalls im Gegensatz zur Lunge ist die *EDNRB*-Expression in den anderen Geweben (besonders im rechten Ventrikel) nicht verändert, was für eine lungenspezifische Reaktion spricht.

Ein weiterer Anhalt für die Annahme, dass lokale Veränderungen des Endothelin-Systems in der Lunge einen Auslöser für die Rechtsherzhypertrophie der SHR-RVH darstellen, ist, dass ein klassischer systemischer Auslöser, sowohl der pulmonalen, als auch der kardialen Insuffizienz, ausgeschlossen werden konnte, nämlich die Hypoxie. Es lässt sich keine Veränderung der Hypoxie-abhängigen Gene in der Niere der SHR-RVH im Gegensatz zu den beiden Vergleichsgruppen feststellen.

Eine weitere Veränderung des Expressionsmusters in SHR-RVH vs. SHR ist eine verminderte Expression des *PTHLP* in der Lunge. *PTHLP* wirkt als vasodilatatorisches Hormon, wobei sich hier als Second Messenger NO anschließt (27). Die vasodilatatorischen Eigenschaften des Hormons könnten also in der Lungenstrombahn der SHR-RVH vermindert ausgeprägt sein. Die vasodilatatorische Wirkung von *PTHLP* könnte unter anderem auf seinen hemmenden Einfluss auf die Expression und Produktion von ET-1 zurückzuführen sein (26). Auch NO scheint einen hemmenden Einfluss auf ET-1 zu haben, was ebenfalls für diese Kaskade sprechen könnte (35). Eine verminderte Expression von *PTHLP* in SHR-RVH könnte daher möglicherweise zu einer erhöhten lokalen Konzentration von ET-1 in der Lunge von diesen Tieren führen.

Ein Teil dieser Interaktion könnte auch die verminderte Expression des *EDNRB*-Rezeptors in den SHR-RVH sein, die zu einer erhöhten lokalen Konzentration von ET-1 in der Lunge von SHR-RVH führt (siehe Abb. 8).

Somit kann *PTHLP* über dieselbe Endstrecke, wie bereits oben im Rahmen des Endothelin-Systems beschrieben, Einfluss auf die Entstehung der Rechtsherzhypertrophie in SHR-RVH nehmen. An dieser Stelle bedarf es weiterer Studien, die diesen Zusammenhang genauer untersuchen, um das System vollends zu verstehen.

Abb. 8: Die Interaktion von *PTHLP* und dem Endothelin-System

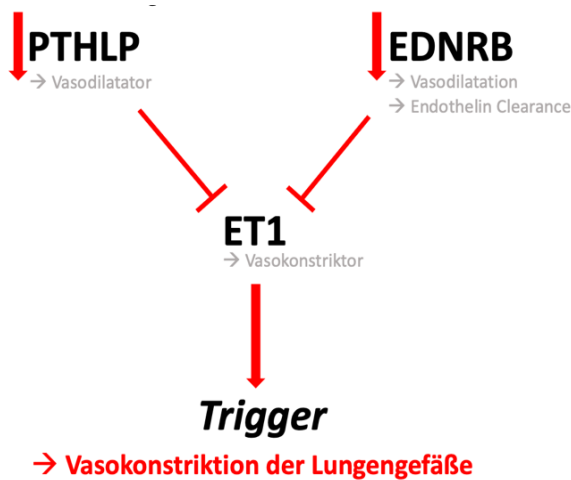


Abb. 8: Die Interaktion von *PTHLP* und dem Endothelin-System.

Dargestellt ist ein möglicher Zusammenhang zwischen der erniedrigten Expression sowohl des Endothelin-Clearance-Rezeptors *EDNRB*, als auch des *PTHLP* in der Lunge von SHR-RVH und einer folglich erhöhten lokalen ET-1-Konzentration in der Lunge von SHR-RVH. ET-1 ist ein bekannter und starker Vasokonstriktor des menschlichen Körpers. Somit könnte es zu einer Vasokonstriktion der nachgeschalteten Lungengefäße und folglich zu einer sekundären Hypertrophie des rechten Ventrikels der SHR-RVH kommen.

Weiterhin gibt es zwar keinen direkten Beweis für das Vorliegen einer PH in diesen Tieren, aber die erhöhte Expression von *ACTA2*, die für eine Isoform des Aktins, einem Mikrofilament des kontraktiven Apparats von glatten Muskelzellen, kodiert, spricht für vaskuläre Umbauprozesse in der Lungenstrombahn und deutet auf eine PH in den SHR-RVH hin (7).

Die Beobachtung, dass *ADRB2* in der Lunge der SHR-RVH vermindert exprimiert wird, deutet darauf hin, dass die Lungengefäße ihre normalerweise durch den β 2-Adrenorezeptor vermittelte Vasodilatation (43) möglicherweise weniger effektiv ausführen können. Im Zusammenspiel mit der erhöhten *ACTA2* lässt sich hier eine verminderte Gefäßflexibilität vermuten, die für Gefäßumbauprozesse sprechen könnte.

Die erhöhte pulmonale ET-1-Konzentration und die erhöhte *ACTA2* können ebenso zu Vasokonstriktion und Gefäßumbau in der Lungenstrombahn führen, was wiederum die Nachlast des rechten Ventrikels erhöhen kann und somit sekundär zur Entstehung der Rechtsherzhypertrophie der SHR-RVH beitragen kann.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die beobachtete Rechtsherzhypertrophie der SHR-RVH ist, dass die Tiere eine ausgeprägte Form der linksventrikulären Hypertrophie aufweisen, die ihrerseits sekundäre pulmonale Veränderungen durch eine übermäßige linksseitige Herzinsuffizienz verursachen könnten (5). Tatsächlich zeigen die SHR-RVH eine stärkere linksventrikuläre Hypertrophie im Vergleich zu den SHR. Dennoch blieben sowohl die molekularen Anpassungen an die Druckbelastung, als auch die linksventrikuläre Funktion zwischen den beiden Gruppen unverändert. Diese

Beobachtungen sprechen dafür, dass die übermäßige linksventrikuläre Hypertrophie nicht als Ursache für die beobachteten Veränderungen des Endothelin-Systems, von *PTHLP* und von *ACTA2* in der Lunge zu werten ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in diesem Projekt Unterschiede in der pulmonalen Genexpression vor allem des Endothelin-Systems, von *PTHLP* und *ACTA2* der SHR-RVH, die mit einer PH und Rechtsherzhypertrophie bei diesen Tieren in Verbindung gebracht werden, identifiziert werden konnten. Diese Unterschiede könnten die in der Literatur beschriebene große Heterogenität des pulmonalen Drucks und der Rechtsherzhypertrophie bei dem Tiermodell SHR erklären.

6.2.2 Molekulargenetische Veränderungen des rechten Ventrikels von SHR-RVH

Im rechten Ventrikel der SHR-RVH lassen sich im Gegensatz zu den SHR klare Entzündungszeichen erkennen. Dies zeigt sich durch die erhöhte Expression von *MMP12*, *CCl2*, *IL6* und *vWF* im rechten Ventrikel der SHR-RVH (3,6,28). Allerdings konnten in der Lunge der SHR-RVH keine Anzeichen für eine inflammatorische Reaktion gefunden werden.

Weiterhin konnten trotz zu Lebzeiten unauffälligen funktionellen Tests der SHR-RVH zwischen SHR-RVH und SHR Unterschiede in der Regulation von Genen gezeigt werden, die eine Rechtsherzhypertrophie anzeigen (verminderte Expression von *ATP2A2* und erhöhte Expression von *CLIP*). Insbesondere *CILP* wird als Marker für eine Rechtsherzhypertrophie angesehen (29). Das heißt, dass der molekulargenetische Fingerabdruck mit dem milden Phänotyp der SHR-RVH, welcher funktionell wenig einschränkend ist, übereinstimmt. SHR-RVH haben, wie bereits beschrieben, eine schwere Rechtsherzhypertrophie ohne relevantes Rechtsherzversagen, wobei das rechtsventrikuläre Gewicht der SHR-RVH vs. SHR diese um mehr als zwei SD überschreitet. Diese überraschende Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass im rechten Ventrikel von SHR-RVH vs. SHR eine Herunterregulation des *EDNRA*-Rezeptors vorliegt. Die Herunterregulation des *EDNRA* im rechten Ventrikel könnte ein adaptiver Mechanismus auf die erhöhten ET-1 Werte in den SHR-RVH sein, um vor einem maladaptiven Remodeling und damit vor einer Rechtsherzinsuffizienz zu schützen (31). Somit würden die Kardiomyozyten anders auf die erhöhten ET-1-Spiegel reagieren

können, was zwar zu einer Hypertrophie, aber nicht zu einer Insuffizienz führen würde. Unterstützt wird diese These zum einen durch den Einsatz von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, die über eine Reduktion der ET-1-Aktivität auch zu einer verbesserten Funktion und erhöhten Belastbarkeit in Patienten mit PH und Rechtsherzhypertrophie führen (42) und zum anderen durch die Tatsache, dass Endothelin-Rezeptor-Antagonisten auch bei Ratten mit PH die Arbeitsleistung des rechten Ventrikels verbessern können (38, 39). Außerdem hatten SHR-RVH die geringste Expression von *EDN-1* und *ECE1* im rechten Ventrikel, was ebenfalls mit der Theorie bezüglich der gesteigerten Toleranz des rechten Ventrikels gegenüber Endothelin übereinstimmen könnte.

6.3 Einordnung der Ergebnisse in den Gesamtzusammenhang

Die Beobachtungen einer biventrikulären Hypertrophie bei systemischer Hypertonie in 7 % der SHR stimmen mit klinischen Befunden überein, die bei hypertensiven Patienten in etwa 17–29 % der Fälle eine biventrikuläre Hypertrophie zeigen (49, 50).

Da die essentielle Hypertonie eine monogene Erkrankung bei Nagetieren und Menschen darstellt, ist es entscheidend, die Gene zu identifizieren, die solche Komplikationen auslösen können. Für ein umfassendes Verständnis sowohl der Erkrankung essentielle arterielle Hypertonie an sich, als auch des Tiermodells SHR ist es ebenso wichtig, diese Gene zu identifizieren. Genau an dieser Stelle lassen sich die Ergebnisse des Projekts **„Beteiligung der Lunge bei einer extremen Rechtsherzhypertrophie in spontan hypertensiven Ratten“** einordnen. Darüber hinaus bietet die Studie eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse früherer Studien zum Auftreten von PH bei SHR und kann helfen, die verschiedenen Ergebnisse in Studien zu verstehen, die unterschiedliche SHR-Stämme untersuchen.

Des Weiteren bestätigen die Ergebnisse der Studie die Korrektheit des Einsatzes von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten bei PH. Endothelin-Rezeptor-Antagonisten sind bei PAH eine der wichtigsten Medikamentenklassen und können in verschiedenen Kombinationen erfolgreich eingesetzt werden (55).

Gegebenenfalls kann das Projekt als Ausgangspunkt für weitere Fragestellungen genutzt werden. Es wäre z.B. wichtig, die mögliche PH in SHR in Form einer prospektiven Studie weiter zu untersuchen, denn der allgemeine wissenschaftliche Konsens ist sich bisher nicht einig, ob SHR eine Tendenz zur Entwicklung einer PH aufweisen oder nicht. Die

Ergebnisse dieses Projektes deuten darauf hin, dass diese Frage zu bejahen ist. Gegebenenfalls könnten hier auch histologische Untersuchungen der Lunge weitere Aufschlüsse geben. Weiterhin könnten das Züchten und Projekte zu einer Knock-out Tier Serie bezüglich des Endothelin-Systems in der Lunge zur Bestätigung der Ergebnisse und zum weiteren Verständnis entscheidend beitragen. Es wäre außerdem interessant zu untersuchen, inwiefern die im rechten Ventrikel der SHR-RVH beschriebene Entzündungsreaktion direkten Einfluss auf die Entwicklung der Rechtsherzhypertrophie der Tiere hat, sprich, ob Entzündungen hypertrophes Wachstum direkt auslösen können.

6.4 Schlussfolgerungen der Arbeit

Die Beobachtung einer phänotypischen Variation bei weiblichen SHR-Ratten, die zu einer schweren rechtsventrikulären Hypertrophie führt, trägt zu einem besseren Verständnis des Tiermodells SHR und den Voraussetzungen für Rechtsherzhypertrophie und Rechtsherzinsuffizienz bei. Besonders auffällig ist, dass SHR-RVH eine schwere Rechtsherzhypertrophie aufweisen, aber einen moderaten Phänotyp ausbilden. Die konstante Häufigkeit von etwa 7 % SHR-RVH in diesem Stamm während des Alterns deutet auf eine genetische Grundlage dieses Phänotyps hin, für die in dieser Studie die Veränderungen des Endothelin-Systems, sowohl in der Lunge, als auch im rechten Ventrikel der betroffenen SHR-RVH-Tiere, hauptverantwortlich gemacht werden.

7 Zusammenfassung

SHR sind ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der essentiellen arteriellen Hypertonie. In den vergangenen Jahren wurde überraschenderweise festgestellt, dass 7 % der weiblichen SHR-Tiere eine massive Rechtsherzhypertrophie (SHR-RVH) mit unbekanntem Trigger entwickelten. Möglicherweise sind molekulargenetische Unterschiede in der Lungenstrombahn an der Entstehung dieser Rechtsherzhypertrophie beteiligt.

RT-PCR der Lunge, des rechten Ventrikels und der Niere der SHR-RVH im Vergleich zu SHR und normotensiven WIS-Ratten geben Aufschluss über mögliche Veränderungen in der Genexpression, die mit Hilfe des Western-Blots und ELISAs auf Proteinebene validiert werden können.

Schlüsselbefunde der umfassenden molekulargenetischen Untersuchungen zeigen, dass das *PTHLP* der SHR-RVH im Gegensatz zu den SHR herunterreguliert ist. *PTHLP* kann eine pulmonale Vasodilatation vermitteln. *PTHLP* besitzt ebenfalls hemmenden Einfluss auf die ET-1 Effekte. Außerdem ist der pulmonale *EDNRB*-Rezeptor der SHR-RVH, der für die Clearance von ET-1, einem starken Vasokonstriktor, verantwortlich ist, herunterreguliert. Die lokale pulmonale ET-1-Konzentration ist in SHR-RVH erhöht. Eine erhöhte *ACTA2*-Expression in der Lunge der SHR-RVH spricht für einen pulmonalen Gefäßumbau. Des Weiteren ist der kardiale *EDNRA*-Rezeptor der SHR-RVH herunterreguliert. *EDNRA* ist an der Ausbildung einer maladaptiven Rechtsherzhypertrophie beteiligt, die durch die Herabregulation des Rezeptors in den SHR-RVH ausgeschlossen werden kann. Dementsprechend kann der Signalweg von *EDNRA* einen entscheidenden Einfluss im Übergang einer Rechtsherzhypertrophie zu einer Rechtsherzinsuffizienz haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in einer Subpopulation an weiblichen SHR-Tieren expressionelle Veränderungen in der Lunge vermutlich eine Nachlastserhöhung des rechten Ventrikels bewirken, die sekundär zu einer Rechtsherzhypertrophie in den SHR-RVH führt, die jedoch ohne nennenswerte Funktionsverluste einhergeht. Weiterhin zeigen die Befunde, dass der rechte Ventrikel auch langfristig im Stadium einer kompensatorischen Hypertrophie verbleiben kann.

8 Summary

SHR are an established animal model for studying essential hypertension. In recent years, it has been observed that 7 % of the female SHRs develop severe right ventricular hypertrophy (SHR-RVH) with an unknown trigger. Molecular genetic differences in the pulmonary circulation may be involved in the development of this right ventricular hypertrophy.

RT-PCR analysis of the lungs, right ventricles, and kidneys from SHR-RVH compared to SHR and normotensive WIS-rats provides insight into potential changes in gene expression, which can be further validated at the protein level using Western blot and ELISA techniques.

Key findings from extensive molecular genetic investigations show that pulmonary *PTHLP* is downregulated in SHR-RVH compared to SHR. *PTHLP* can mediate pulmonary vasodilation and inhibits the effects of ET-1. Furthermore, the pulmonary *EDNRB*-receptor, which is responsible for the clearance of ET-1 (a potent vasoconstrictor), is downregulated in SHR-RVH. The local concentration of ET-1 is increased in the lungs of SHR-RVH. Next, an increased *ACTA2* expression in the lungs of SHR-RVH suggests pulmonary vascular remodeling. In addition, the cardiac *EDNRA*-receptor is also downregulated in SHR-RVH. *EDNRA* plays a role in the development of maladaptive right ventricular hypertrophy, and its downregulation in SHR-RVH suggests that this maladaptive process is unlikely in this subgroup. Therefore, the *EDNRA* signaling pathway may have an important role in the transition from right ventricular hypertrophy to right heart failure.

In conclusion, expression changes in the lungs of a subpopulation of female SHR rats result in an increased afterload on the right ventricle, which secondarily leads to right ventricular hypertrophy in SHR-RVH but without significant functional impairment. These findings further suggest that the right ventricle can remain in a state of compensatory hypertrophy over the long term.

9 Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Die mRNA-Expression von gefäßabhängigen Genen in der Lunge..... | 46 |
| Abb. 2: Die mRNA-Expression des Endothelin-Systems in der Lunge..... | 47 |
| Abb. 3: Die Konzentration von ET-1 in Lunge und Plasma..... | 48 |
| Abb. 4: Die mRNA-Expression von <i>PTHLP</i> in der Lunge..... | 49 |
| Abb. 5: Die mRNA-Expression entzündungsabhängiger Gene im rechten Ventrikel von SHR-RVH..... | 52 |
| Abb. 6: Die mRNA-Expression des Endothelin Systems im rechten Ventrikel..... | 54 |
| Abb.7: Die Konzentration des Proteinprodukts von <i>EDNRA</i> im rechten Ventrikel | 55 |
| Abb. 8: Die Interaktion von <i>PTHLP</i> und dem Endothelin-System..... | 59 |
| | |
| Tab. 1: Gruppeneinteilung und Gruppenunterschiede der Versuchstiere..... | 30 |
| Tab. 2: Gruppenunterschiede der Versuchstiere..... | 31 |
| Tab. 3: Die mRNA-Expression verschiedener relevanter Gene in der Lunge von SHR-RVH vs. SHR..... | 44 |
| Tab. 4: Die mRNA-Expression verschiedener relevanter Gene im rechten Ventrikel von SHR-RVH vs. SHR..... | 50 |

1 Literaturverzeichnis

1. Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G. Duale Reihe Anatomie. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2010
2. Bae T, Hallis SP, Kwak MK. Hypoxia, oxidative stress, and the interplay of HIFs and NRF2 signaling in cancer. *Exp Mol Med.* 2024; <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01180-8>
3. Berry E, Bosonea AM, Wang X, Fernandez-Patron C. Insights into the Activity, Differential Expression, Mutual Regulation, and Functions of Matrix Metalloproteinases and A Disintegrin and Metalloproteinases in Hypertension and Cardiac Disease. *J Vasc Res.* 2013; <https://doi.org/10.1159/000345240>
4. Black SM, Bekker JM, Johengen MJ, Parry AJ, Soifer SJ, Fineman JR. Altered Regulation of the ET-1 Cascade in Lambs with Increased Pulmonary Blood Flow and Pulmonary Hypertension. *Pediatr Res.* 2000; <https://doi.org/10.1203/00006450-200001000-00018>
5. Brändle M, Al Makdessi S, Weber RK, Dietz K, Jacob R. Prolongation of life span in hypertensive rats by dietary interventions. Effects of garlic and linseed oil. *Basic Res Cardiol.* 1997; <https://doi.org/10.1007/BF00788517>

6. Ceron CS, Luizon MR. Experimental and Clinical Findings Regarding Matrix Metalloproteinases in Cardiovascular Diseases. *J Vasc Res.* 2013; <https://doi.org/10.1159/000355275>
7. Chelladurai P, Dabral S, Basineni SR, Chen CN, Schmoranzner M, Bender N, u. a. Isoform-specific characterization of class I histone deacetylases and their therapeutic modulation in pulmonary hypertension. *Sci Rep.* 2020; <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69737-x>
8. Cho S, Namgoong H, Kim HJ, Vorn R, Yoo HY, Kim SJ. Downregulation of Soluble Guanylate Cyclase and Protein Kinase G With Upregulated ROCK2 in the Pulmonary Artery Leads to Thromboxane A2 Sensitization in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. *Front Physiol.* 2021; <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.624967>
9. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, u. a. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1992; <https://doi.org/10.1056/NEJM199207093270202>
10. Cober N, McCourt E, Soares R. Single Cell Transcriptional Analysis Implicates Acta2 Positive Pericytes in Arterial Muscularization and Imbalance in Bmp and Angpt Signaling During Development of Pulmonary Arterial Hypertension. 2022; https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/circ.146.suppl_1.15203
11. Cuspidi C, Negri F, Giudici V, Valerio C, Meani S, Sala C, u. a. Prevalence and clinical correlates of right ventricular hypertrophy in essential hypertension. *J Hypertens.* 2009; <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328324eda0>
12. Cuspidi C, Sala C, Muiesan ML, De Luca N, Schillaci G, Working Group on Heart, Hypertension of the Italian Society of Hypertension. Right ventricular hypertrophy in systemic hypertension: an updated review of clinical studies. *J Hypertens.* 2013; <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32835f17e5>
13. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, u. a. Endothelin. Barker EL, Herausgeber. *Pharmacol Rev.* 2016; <https://doi.org/10.1124/pr.115.011833>
14. Deaton RA, Bulut G, Serbulea V, Salamon A, Shankman LS, Nguyen AT, u. a. A new autosomal Myh11-CreERT2 smooth muscle cell lineage tracing and gene knockout mouse model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023; <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318160>
15. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985.1996; <https://doi.org/10.1152/jappl.1996.81.4.1510>
16. Enevoldsen FC, Sahana J, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *J Clin Med.* 2020; <https://doi.org/10.3390/jcm9030824>

17. Ferial B, Alessandra C, Deborah GJ, Corinne N, Raphaël T, Mina O, u. a. Exploring the Endothelin-1 pathway in chronic thromboembolic pulmonary hypertension microvasculopathy. *Sci Rep.* 2024; <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79623-5>
18. Gomart S, Damoiseaux C, Jespers P, Makanga M, Labranche N, Pochet S, u. a. Pulmonary vasoreactivity in spontaneously hypertensive rats - Effects of endothelin-1 and leptin. *Respir Res.* 2014; <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-12>
19. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J.* 2012; <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.125>
20. Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, u. a. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature.* 1991; <https://doi.org/10.1038/353521a0>
21. Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brida M, u. a. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2023; <https://doi.org/10.1183/13993003.00879-2022>
22. Ivy D, McMurtry IF, Yanagisawa M, Gariepy CE, Le Cras TD, Gebb SA, u. a. Endothelin B receptor deficiency potentiates ET-1 and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.280.5.L1040>
23. Ivy DD, Le Cras TD, Horan MP, Abman SH. Increased lung preproET-1 and decreased ETB-receptor gene expression in fetal pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 1998; <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.274.4.L535>
24. Ivy DD, Yanagisawa M, Gariepy CE, Gebb SA, Colvin KL, McMurtry IF. Exaggerated hypoxic pulmonary hypertension in endothelin B receptor-deficient rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; <https://doi.org/10.1152/ajplung.00272.2001>
25. Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, u. a. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell.* 1991; [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90584-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90584-1)
26. Jiang B, Morimoto S, Fukuo K, Hirotsu A, Tamatani M, Nakahashi T, u. a. Parathyroid Hormone-Related Protein Inhibits Endothelin-1 Production. *Hypertension.* 1996; <https://doi.org/10.1161/01.HYP.27.3.360>
27. Kalinowski L, Dobrucki LW, Malinski T. Nitric oxide as a second messenger in parathyroid hormone-related protein signaling. *J Endocrinol.* 2001; <https://doi.org/10.1677/joe.0.1700433>
28. Kawecki C, Lenting PJ, Denis CV. von Willebrand factor and inflammation. *J Thromb Haemost.* 2017; <https://doi.org/10.1111/jth.13696>
29. Keranov S, Jafari L, Haen S, Vietheer J, Kriechbaum S, Dörr O, u. a. CILP1 as a biomarker for right ventricular dysfunction in patients with ischemic cardiomyopathy. *Pulm Circ.* 2022; <https://doi.org/10.1002/pul2.12062>

30. Kreutz R, Struk B, Rubattu S, Hübner N, Szpirer J, Szpirer C, u. a. Role of the alpha-, beta-, and gamma-subunits of epithelial sodium channel in a model of polygenic hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1997; <https://doi.org/10.1161/01.hyp.29.1.131>
31. Lehmann LH, Rostovsky JS, Buss SJ, Kreusser MM, Krebs J, Mier W, u. a. Essential role of sympathetic endothelin A receptors for adverse cardiac remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; <https://doi.org/10.1073/pnas.1409026111>
32. Leineweber K, Heusch G. Beta 1- and beta 2-adrenoceptor polymorphisms and cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol*. 2009; <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00187.x>
33. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, u. a. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. 2021; <https://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368>
34. Milewicz DM, Østergaard JR, Ala-Kokko LM, Khan N, Grange DK, Mendoza-Londono R, u. a. De Novo ACTA2 Mutation Causes a Novel Syndrome of Multisystemic Smooth Muscle Dysfunction. *Am J Med Genet A*. 2010; <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33657>
35. Mitsutomi N, Akashi C, Odagiri J, Matsumura Y. Effects of endogenous and exogenous nitric oxide on endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 1999; [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00806-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00806-1)
36. Mobitz V, Baumann R. Die spontane Hypertonie der Ratten. In: Baumann R, Dutz H, Nitschkoff S, Herausgeber. Band 1 Pathophysiologie: Klinik und Modellexperiment, S. 327–53. De Gruyter; 2022 https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/9783112478189-010/html?lang=de&srsId=AfmBOooGzSpGGm8Io_Xr22tv5s7DIFzZoP-SquH56g96hiUBVoN1ZqU4
37. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1999; <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.1.9>
38. Nishiyama SK, Zhao J, Wray DW, Richardson RS. Vascular function and endothelin-1: tipping the balance between vasodilation and vasoconstriction. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2017; <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00772.2016>
39. Okamoto K, Aoki K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Jpn Circ J*. 1963; <https://doi.org/10.1253/jcj.27.282>
40. Opitz CF, Ewert R, Kirch W, Pittrow D. Inhibition of endothelin receptors in the treatment of pulmonary arterial hypertension: does selectivity matter? *Eur Heart J*. 2008; <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn234>
41. Pape HC, Kurzt A, Silbernagel S. *Physiologie*. 8. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012

42. Poels EM, da Costa Martins PA, van Empel VPM. Adaptive capacity of the right ventricle: why does it fail? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015; <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00573.2014>
43. Pourageaud F, Leblais V, Bellance N, Marthan R, Muller B. Role of beta2-adrenoceptors (beta-AR), but not beta1-, beta3-AR and endothelial nitric oxide, in beta-AR-mediated relaxation of rat intrapulmonary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005; <https://doi.org/10.1007/s00210-005-1082-2>
44. Powder KE. Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2020; https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0026-9_15
45. Rako ZA, Yogeswaran A, Yildiz S, Weidemann P, Zedler D, da Rocha BB, u. a. Liver stiffness is associated with right heart dysfunction, cardiohepatic syndrome, and prognosis in pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant.* 2024; <https://doi.org/10.1016/j.healun.2024.02.013>
46. Semenza GL. Regulation of Erythropoiesis by the Hypoxia-Inducible Factor Pathway: Effects of Genetic and Pharmacological Perturbations. *Annu Rev Med.* 2023; <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042921-102602>
47. Son JS, Kim KC, Kim BK, Cho MS, Hong YM. Effect of Small Hairpin RNA Targeting Endothelin-Converting Enzyme-1 in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. *J Korean Med Sci.* 2012; <https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.12.1507>
48. Spinella F, Caprara V, Cianfrocca R, Rosanò L, Di Castro V, Garrafa E, u. a. The interplay between hypoxia, endothelial and melanoma cells regulates vascularization and cell motility through endothelin-1 and vascular endothelial growth factor. *Carcinogenesis.* 2014; <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu018>
49. Tikellis C, Cooper ME, Bialkowski K, Johnston CI, Burns WC, Lew RA, u. a. Developmental expression of ACE2 in the SHR kidney: a role in hypertension? *Kidney Int.* 2006; <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000428>
50. Torday JS. Evolution and Cell Physiology. 1. Cell signaling is all of biology. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2013; <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00197.2013>
51. Ueyama H, Bruns G, Kanda N. Assignment of the vascular smooth muscle actin gene ACTSA to human chromosome 10. *Jinrui Idengaku Zasshi Jpn J Hum Genet.* 1990; <https://doi.org/10.1007/BF01876459>
52. Wang H, Wang C. Prognostic Value of Endothelin-1 or Related Peptides in Patients With Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Angiology.* 2023; <https://doi.org/10.1177/00033197231223616>
53. Yorikane R, Miyauchi T, Sakai S, Sakurai T, Yamaguchi I, Sugishita Y, u. a. Altered expression of ETB-receptor mRNA in the lung of rats with pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; <https://doi.org/10.1097/00005344-199322008-00088>

54. Yu Y, Qin J, Chen D, Wang H, Wang J, Yu Y. Chronic cardiovascular disease-associated gene network analysis in human umbilical vein endothelial cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cardiovasc Toxicol.* 2015; <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9279-6>
55. Zelt JGE. Ambitions for Pulmonary Arterial Hypertension Composite End Points. 2023; <https://doi.org/10.1016/j.chest.2023.10.010>

10 Publikationsverzeichnis

Langer A, Schreckenber R, Schlüter KD. Right Ventricular Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR/NHsd) Is Associated with Inter-Individual Variations of the Pulmonary Endothelin System. 2024; <https://doi.org/10.3390/biology13100752>

11 Erklärung zur Dissertation

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

Ort/Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter für die Überlassung meines Themas, die Mitentwicklung des Projekts, die statistische Auswertung und die stetige ermutigende Unterstützung bedanken. Vielen Dank für die Beantwortung von tausenden an Fragen über die Jahre hinweg von einem unerfahrenen wissenschaftlichen Frischling, der sich während des Covid-Chaos versuchte im Labor und in der wissenschaftlichen Welt zurechtzufinden.

Außerdem möchte ich Dr. Rolf Schreckenberg, dem besten Betreuer, den ich mir für mein Projekt hätte wünschen können und die vielen Male, welche ich sein Büro mit mehr Zuversicht, neuen Blickwinkeln und einem Lachen verlassen habe, als ich es betreten habe, bedanken. Ich danke außerdem Nadine Woitasky und Karin Westermann für die Einarbeitung in die umfangreiche wissenschaftliche Methodik und die Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Versuche, sowie die angenehme und freundliche Atmosphäre im Labor, wodurch ich immer gerne zur Arbeit ins Institut gekommen bin.

Ich danke Anna-Lena Hoh, Carolin Balthes, Florian Lurz, Isabelle Pauli und Lilli Butzke für das penible Korrekturlesen meiner Arbeit und die Korrektur jedes einzelnen Kommas, jeder Abkürzung und jedes kursiv geschriebenen Gennamens.

Ich danke meinen Eltern und meinem Bruder für Ihre stetige Unterstützung, unermüdliches Mut machen und bedingungslose Hilfe nicht nur im Rahmen dieser Arbeit. Danke für alles.