

Aus dem Cardio-Pulmonary Institute
Innere Medizin II
am Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Inaugural-Dissertation

Die Rolle von Epoxyeicosatriensäuren in der protra- hierten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat.-

vorgelegt dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

von
Nicole Catherine Krause (MSc)
aus Gießen

Gießen 2019

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek
Justus-Liebig-Universität Gießen, FB 08
Physikalisch-Chemisches Institut
Heinrich-Buff-Ring 17, 35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan
Justus-Liebig-Universität Gießen, FB 08
Institut für Tierphysiologie
Heinrich-Buff-Ring 26, 35392 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann
Justus-Liebig-Universität Gießen, FB 11
Medizinische Klinik II
Cardio-Pulmonary Institute
Aulweg 130, 35392 Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 2020

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molecular Biology and Medicine of the Lung“ (MBML) am Zentrum für Innere Medizin – Medizinische Klinik II der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Oktober 2015 bis August 2019 unter der Leitung von Prof. Dr. Norbert Weißmann angefertigt.

Abkürzungen

%	Prozent
Δ	Delta
μ	Mikro
Ω	Ohm
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AP	Aminopyridin
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	akutes Atemnotsyndrom des Erwachsenen
ATP	Adenosintriphosphat
A.U.	<i>arbitrary unit</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C57BL/6J	<i>Charles River Black 6 Jackson Laboratory</i>
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl	Chlor
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX4i2	Cytochrom C Oxidase Untereinheit 4 Isoform 2
Cs	Cäsium
C _t	Schwellenzyklus
CYP	Cytochrom-P450
Cyt C	Cytochrom C
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DHET	dihydroxy-5Z,8Z,11Z-Eicosatriensäure

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e ⁻	Elektronen
EDHF	Endothel abgeleiteter hyperpolarisierender Faktor
EET	Epoxyeicosatriensäure
EEZE	Epoxyeicosa-5(Z)-enoic-Säure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
E _m	Membranpotential
EPA	extrapulmonale Arterien
Ephx2	Gen der löslichen Epoxidhydrolase 2
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
ET-1	Endothelin-1
ETC	Elektronentransportkette
EU	Europa
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
F	Fluoreszenz
FADH ₂	reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	fetales Rinderserum
G	Gauge, Giga
g	Gramm, Zentrifugalkraft
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H ⁺	Protonen
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
Hg	Quecksilber
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
Hz	Hertz
I	Strom
I.E.	internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
IPA	intrapulmonale Arterien
JLU	Justus-Liebig-Universität

k	Kilo
K ⁺	Kalium
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KPSL	Physiologische Salzlösung mit 80 mM KCl
K _V -Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal
L	Liter
M	Mega, Molar
m	Meter, milli
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
min	Minute
mRNA	Boten RNA
MS-PPOH	N-(methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-Benzenehexanamid
n	Anzahl Einzelexperimente, nano
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenine-Dinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenine-Dinukleotid-Phosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NT	<i>non-targeting</i>
O ₂	Sauerstoff
OH-AA	20-Hydroxyeicosatetraensäure
p	Pico
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzelle
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCLS	<i>precision cut lung slices</i>
PCO ₂	Kohlenstoffpartialdruck
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PH	Pulmonale Hypertonie

P _i	Innendruck
PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PSL	Physiologische Salzlösung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p-Wert	Signifikanzwert
Q	Perfusion
R	Substrat
Rho	<i>ras homolog gene family</i>
RISP	Rieske-Eisen-Schwefel-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
sEH	lösliche Epoxidhydrolase
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	kleine interferierende RNA
T	Wandspannung
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T _K	Wandspannung unter finaler 80 mM KCl Applikation
TPPU	N-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidiny]-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]- Urea
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRPC6	<i>canonical transient receptor potential 6</i>
TRPV4	<i>transient receptor potential vanilloid cation channel 4</i>
U46619	9,11-dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxy-prosta-5Z,13E-dien-1-oic-Säure
V	Ventilation, Volt
vol	Volumen
VT	Volumenteile
W	Watt
WT	Wildtyp
wt/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1 Die Charakteristika der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion	1
1.1.1 Die pulmonale Zirkulation	1
1.1.2 Die Ventilations-Perfusions-Anpassung	3
1.1.3 Die klinische Relevanz der HPV	4
1.1.4 Die Eigenschaften der HPV	7
1.2 Die Mechanismen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion	9
1.2.1 Der mögliche Mechanismus zur Sauerstoff-Detektion.....	9
1.2.2 Der <i>downstream</i> Mechanismus der HPV	13
1.3 Die Cytochrom-P450-abgeleiteten Epoxyeicosatriensäuren	15
1.3.1 Die Synthese und der Metabolismus von Epoxyeicosatriensäuren	15
1.3.2 Die funktionellen Eigenschaften von EETs	18
1.3.3 Die mutmaßliche Rolle von EETs in der HPV	20
1.4 Das Ziel der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Versuchstiere	22
2.1.1 Versuchstiergenehmigung und Tiertötung	22
2.1.2 Mauslinien	22
2.1.3 Versuchstierhaltung	22
2.2 Myographie von isolierten Blutgefäßen.....	23
2.2.1 Das Myographensystem	23
2.2.2 Isolation von pulmonalen und systemischen Gefäßen	24
2.2.3 Isometrische Kontraktionsmessung	26
2.2.4 RNA-Interferenz-Experimente.....	28
2.2.5 Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration.....	29
2.3 Isolierte, perfundierte und ventilierte Lunge	30
2.4 <i>Whole Cell Patch Clamp</i> -Experimente.....	31
2.4.1 Grundprinzipien der <i>Patch Clamp</i> -Technik.....	31
2.4.2 Isolation von PASMCs	32
2.4.3 Messung der <i>Whole Cell</i> -Ionenströme	33
2.5 mRNA- und Protein-Expressionsanalysen	35
2.5.1 <i>Real-Time</i> PCR	35
2.5.2 Western Blot.....	36

2.6	Auswertung der Daten und Statistik.....	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Charakterisierung der Reaktion von pulmonalen Arterien aus Mäusen auf Hypoxie	39
3.1.1	Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von verschiedenen Generationen der pulmonalen Arterien aus Mäusen	39
3.1.2	Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen nach Entfernung des Endothels	43
3.1.3	Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus TRPC6 ^{-/-} Mäusen	44
3.2	Der Effekt einer inhibierten EET-Synthese/-Degradation auf die protrahierte hypoxische pulmonale Vasokonstriktion	45
3.2.1	Die Expression von CYP2J-Epoxygenase-Isoformen in kleinen IPAs aus Mäusen	45
3.2.2	Der Effekt des CYP-Epoxygenase-Inhibitors MS-PPOH auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen.....	46
3.2.3	Der Effekt des EET-Antagonisten 14,15-EEZE auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen.....	47
3.2.4	Der Effekt des sEH-Inhibitors TPPU auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen	48
3.2.5	Der Effekt von MS-PPOH, 14,15-EEZE und TPPU auf KCl- bzw. U46619-induzierte Kontraktionen von kleinen IPAs aus Mäusen	49
3.2.6	Der Effekt von 14,15-EEZE auf die HPV in isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen aus Mäusen.....	49
3.2.7	Der Einfluss einer inhibierten Expression von CYP2J-Epoxygenase- Isoformen auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen	50
3.2.8	Der Einfluss einer inhibierten Expression der löslichen Epoxidhydrolase auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen	52
3.3	Der Effekt von EETs auf den Tonus von pulmonalen Arterien der Maus.....	53
3.3.1	Der Effekt von EETs auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Abwesenheit eines <i>pretone</i> s	53
3.3.2	Der Effekt von EETs auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines KCl-induzierten <i>pretone</i> s	54
3.3.3	Der Effekt von EETs auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines U46619-induzierten <i>pretone</i> s	57
3.3.4	Die EET-induzierten Reaktionen in isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen von Mäusen.....	58
3.3.5	Der Effekt von 14,15-EEZE auf die 5,6-EET-induzierten Reaktionen von kleinen IPAs aus Mäusen.....	59
3.3.6	Der Effekt von 5,6-Dihydroxyeicosatriensäure auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen.....	61

3.3.7	Der Effekt von 5,6-EET auf die Wandspannung von isolierten Aorten und Femoralarterien der Maus	62
3.4	Charakterisierung des Mechanismus der 5,6-EET-induzierten Kontraktion.....	62
3.4.1	Der Effekt von 5,6-EET auf die Ionenströme in PASMCs von Mäusen.....	62
3.4.2	Der Effekt von 5,6-EET auf $[Ca^{2+}]_i$ in kleinen IPAs aus Mäusen	64
3.4.3	Der Effekt von H_2O_2 und 4-Aminopyridin auf die 5,6-EET-induzierten Reaktionen in kleinen IPAs aus Mäusen	65
4.	Diskussion	68
4.1	Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion in pulmonalen Arterien von Mäusen.	68
4.2	Der Einfluss einer inhibierten EET-Synthese/-Degradation auf die protrahierte hypoxische pulmonale Vasokonstriktion	73
4.3	Der Effekt von EETs auf den pulmonalen Tonus von Mäusen	75
4.4	Die Mechanismen der 5,6-EET-induzierten Kontraktion.....	77
4.5	Fazit	79
4.6	Relevanz der Ergebnisse.....	80
5.	Zusammenfassung	82
6.	Summary	84
7.	Literaturverzeichnis.....	86
8.	Abbildungsverzeichnis.....	104
9.	Tabellenverzeichnis.....	106
10.	Curriculum vitae	107
11.	Publikationen und Vorträge	108
12.	Selbstständigkeitserklärung	110
13.	Danksagung	111

1. Einleitung

1.1 Die Charakteristika der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion

1.1.1 Die pulmonale Zirkulation

Die Lunge dient zum einem der Aufnahme von Sauerstoff (O_2) in das Blut, zum anderen der Abgabe von Kohlendioxid (CO_2) über die Atemluft an die Atmosphäre. Die luftleitenden Strukturen des Atmungsorgans werden bei Säugetieren durch die Nasenhöhle, den Rachen, den Kehlkopf, die Luftröhre, die Bronchien und die Bronchiolen, die über den Alveolargang in Alveolen münden, gebildet (Renz-Polster *et al.*, 2004). In den Alveolen findet schließlich der

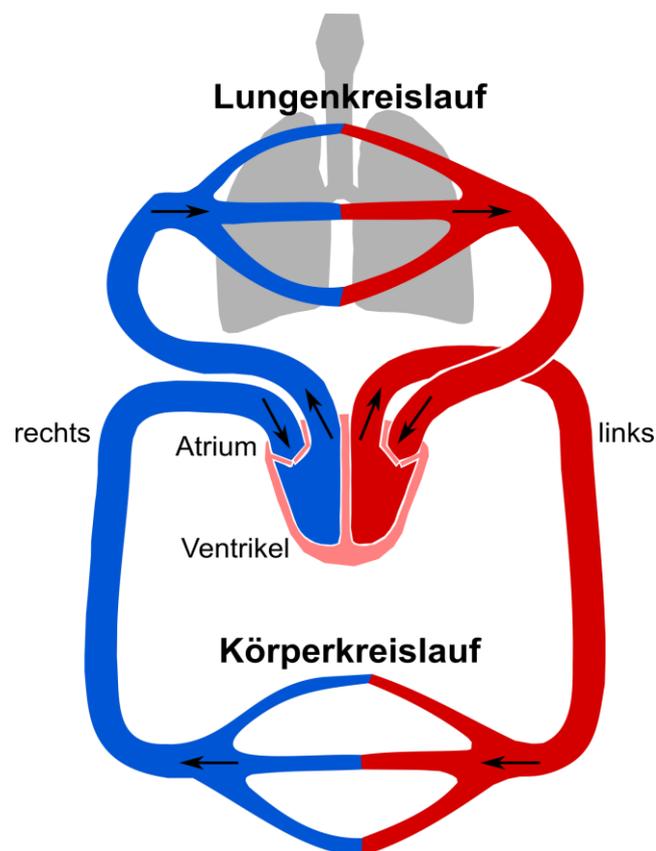


Abbildung 1. Der Blutkreislauf von Säugetieren. Das sauerstoffarme Blut (blau) gelangt über die Hohlvene in das rechte Atrium des Herzens. Während der Diastole sammelt sich das Blut in dem rechten Ventrikel. In der darauffolgenden Systole wird das Blut über die Pulmonalarterien in die Lunge gepumpt, wo es in den Kapillaren mit Sauerstoff angereichert wird. Das sauerstoffreiche Blut (rot) fließt über die Pulmonalvenen zurück zum Herzen, wo es während der Diastole aus dem linken Atrium in den linken Ventrikel fließt. Daraufhin wird während der Systole das Blut in die Aorta und damit in den Körperkreislauf gepumpt.

Gasaustausch mit den angrenzenden Kapillargefäßen statt (Gutierrez *et al.*, 2007; Redfield *et al.*, 1922). Im Blutkreislauf wird folglich sauerstoffarmes bzw. kohlendioxidreiches Blut über die Hohlvene in das rechte Atrium und dann in den rechten Ventrikel geleitet. Von dort wird es über die Pulmonalarterie in die Lunge zum Lungengasaustausch befördert, worauf anschließend sauerstoffreiches Blut über die Pulmonalvenen in das linke Atrium fließt und schließlich über den linken Ventrikel und die Aorta in den Körperkreislauf geleitet wird (Lee, 1971; Comroe, 1966; siehe Abb. 1). Wie die systemischen Gefäße besteht das Lungengefäßsystem aus drei anatomischen Kompartimenten: den Arterien, den Kapillaren und den Venen. Die Architektur des gesunden Lungengefäßsystems ist so konstruiert, dass ein Netzwerk mit hoher Elastizität und geringem Widerstand gewährleistet wird, welches eine große Oberfläche und eine geringe Diffusionstrecke für den Gasaustausch bietet. Die Wand der Lungenarterien besteht aus drei Schichten: der äußeren Schicht *Tunica adventitia*, der mittleren Schicht *Tunica media* und der inneren Schicht *Tunica intima*. Im Allgemeinen umfasst die *Adventitia* pulmonaler Arterien eine extrazelluläre Matrix, Fibroblasten (oder andere interstitielle Zellen) und ein neuronales Netzwerk (Townsend, 2011). Die Zusammensetzung der Zellwand sowie der Beitrag jeder Schicht zur Gesamtwandstärke variiert von der proximalen Pulmonalarterie bis zu den kleinsten extraalveolaren Arterien.

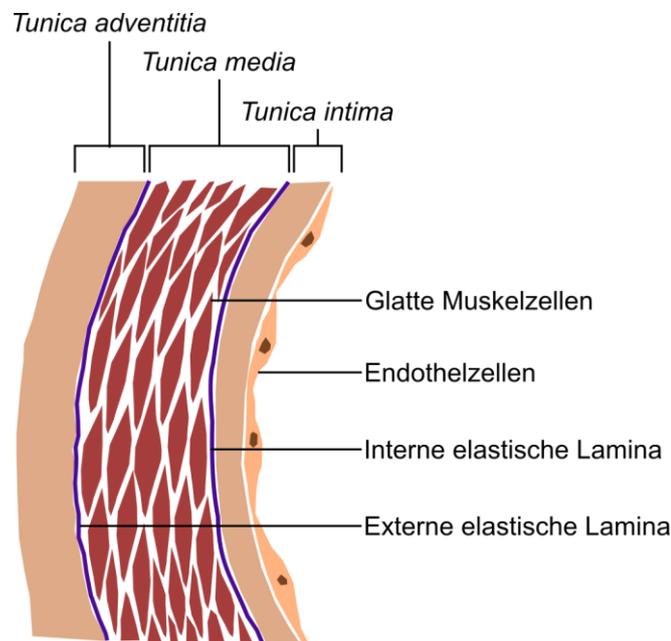


Abbildung 2. Der Aufbau einer Pulmonalarterie. Die Arterienwand ist in drei Schichten eingeteilt: Die *Tunica adventitia*, die *Tunica media* und die *Tunica intima*. Die *mediale* Schicht wird durch eine elastische Lamina von den anderen Schichten, die Bindegewebe enthalten, abgegrenzt. Innerhalb der Lamina befinden sich die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. Das Lumen der pulmonalen Arterien wird durch einen Monolayer aus Endothelzellen ausgekleidet.

Die Klassifizierung der Lungenarterien beruht jedoch auf zwei Merkmalen der *medialen* Schicht: dem Vorhandensein einer elastischen Lamina und dem Grad der Muskulatur, sprich der Anzahl an pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs). Somit werden Arterien als elastische, muskulöse, Übergangs- (mit Merkmalen sowohl der elastischen als auch der muskulären Arterien), teilweise muskulöse oder nicht-muskulöse Arterien klassifiziert. Im gesamten Lungenarteriensystem besteht die dünne *Intima* aus einem nicht fenestrierten Monolayer aus Endothelzellen, die das Gefäßlumen auskleiden, sowie einem subendothelialen Interstitium, das sich bis zur inneren elastischen Lamina erstreckt (Townsend, 2011; siehe Abb. 2). Lungenarterien sind im Vergleich zu systemischen Arterien im Allgemeinen weniger muskulös, dehnbarer und komprimierbarer. Darüber hinaus besitzen Lungenarterien, im Gegensatz zu systemischen Arterien, die Fähigkeit bei Hypoxie zu kontrahieren (Madden *et al.*, 1985; Shirai *et al.*, 1991; Michelakis *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 1990). Dies dient der optimalen Ventilations-Perfusions-Anpassung.

1.1.2 Die Ventilations-Perfusions-Anpassung

Für einen optimalen Gasaustausch ist die Abstimmung von alveolärer Ventilation an die Perfusion mit Blut essentiell (Sylvester *et al.*, 2012). Ein optimaler Gasaustausch ist demnach nur möglich, wenn der Antransport von O₂ durch die Ventilation genau so groß ist, wie die Aufnahme von O₂ in das Blut. Daraus ergibt sich das Verhältnis aus Ventilation/Zeit (\dot{V}) und Perfusion/Zeit (\dot{Q}) gleich 1. Wenn die Ventilation in einem Lungenareal eingeschränkt ist, die Perfusion allerdings gleichbleibt, kommt es zu einer Verringerung des \dot{V}/\dot{Q} -Verhältnisses in dem eingeschränkten Bereich. Dadurch wird das Blut unzureichend oxygeniert. Eine regionale Variation des \dot{V}/\dot{Q} -Verhältnisses in einer gesunden Lunge ist zum einen auf die Schwerkraft zurückzuführen, welche eine relativ größere Perfusion (und somit eine Senkung des \dot{V}/\dot{Q} -Verhältnisses) in bestimmten Lungenregionen durch Effekte auf den pleuralen und vaskulären Druck ausübt. Zum anderen ist die Variation durch die Lungenstruktur bestimmt, welche die grundlegenden Widerstände gegen den regionalen Luft- und dem Blutfluss festlegt, und durch den Tonus der Atemwege und der glatten Gefäßmuskulatur, die diese Widerstände ändern können (Sylvester *et al.*, 2012). Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. einer Pneumonie oder dem akuten Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS), ist das \dot{V}/\dot{Q} -Verhältnis, auf Grund der Ausbildung eines Lungenödems, jedoch wesentlich dramatischer verringert (Dunham-Snary *et al.*, 2017; Tsai *et al.*, 2004). Unter diesen Bedingungen hat das Blut in bestimmten Arealen der Lunge, auf Grund der unzureichenden Ventilation, keine Möglichkeit Sauerstoff aufzunehmen. Um starke Abweichungen von einem idealen \dot{V}/\dot{Q} -Verhältnis gleich 1 zu verringern, greift der Mechanismus der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) ein (Sylvester *et al.*, 2012). Dass die Ventilation an die Perfusion

angepasst wird, wurde im Jahr 1946 von Euler und Liljestrand durch Studien an intakten, anästhesierten Katzen entdeckt. Sie fanden heraus, dass der Druck in der Pulmonalarterie durch eine Verringerung des Partialdrucks von Sauerstoff (PO_2) oder eine Erhöhung des Partialdrucks von CO_2 (PCO_2) ansteigt, während eine Erhöhung des PO_2 zu einer Verringerung des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) führt. Demnach wird unter Hypoxie der Blutfluss zu besser ventilierten Bereichen der Lunge umgeleitet, was zu optimalen Bedingungen für die Nutzung von alveolarer Luft führt.

1.1.3 Die klinische Relevanz der HPV

Die Vorteile einer HPV sind bei einem chirurgischen Eingriff innerhalb des Thorax, wie bei einer Lungentumor-Resektion, von entscheidender Bedeutung (Dunham-Snary *et al.*, 2017). Bei dieser Operation wird der gesunde Teil der Lunge selektiv ventilert, während der operative Teil der Lunge kollabiert. Die HPV reduziert daraufhin die Perfusion innerhalb der operativen Lunge. Würde dieser Mechanismus nicht einsetzen, würde der Eingriff zu einer intraoperativen systemischen Hypoxämie führen. Die Vorteile einer HPV können jedoch auch während einer Operation durch Anästhetika, Vasodilatoren und Hypothermie verringert werden (Lumb & Slinger, 2015; Dunham-Snary *et al.*, 2017). Daher ist die Wahl des Anästhetikums und der Temperatur in Patienten mit einer Ein-Lungen-Ventilation zu beachten. Die HPV optimiert zudem die systemische Oxigenierung in Patienten mit einer Atelektase, Pneumonie und Asthma (Dunham-Snary *et al.*, 2017). Sie wirkt sich jedoch nachteilig aus, wenn diese auf Grund eines globalen Sauerstoffmangels über einen längeren Zeitraum in der gesamten Lunge auftritt, da dies zu einem erhöhten Gesamt-Gefäßwiderstand führt (Jeffery & Morrell, 2002). Ein globaler Sauerstoffmangel in der Lunge entsteht z.B. bei einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und bei der ideopathischen Lungenfibrose. COPD ist eine Krankheit der Atemwege und des Lungenparenchyms, die durch eine anhaltende Entzündung (auf Grund des Einatmens schädlicher Partikel oder Gase) und eine Verengung der Atemwege gekennzeichnet ist, wodurch die Ventilation über einen langen Zeitraum beeinträchtigt ist (Mannino & Buist, 2007). Eine verringerte Ventilation kann zudem durch einen Aufstieg in großen Höhenlagen (ab 1600-2500 m) und der damit einhergehenden Entstehung von pulmonalen Ödemen verursacht werden (Sylvester *et al.*, 2012; Swenson, 2013). Das sogenannte Höhenlungenödem wurde erstmals 1913 von Ravenhill beschrieben. Es entsteht innerhalb der ersten 2-4 Tage nach der Ankunft in großen Höhenlagen und ist durch Symptome wie Atemnot im Ruhezustand, Husten, allgemeine Schwäche, thorakalem Engegefühl und Fieber gekennzeichnet. In dieser Krankheit kommt es zu einem Lungenödem, da die erhöhte und heterogene HPV zu einem schnellen Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks führt, welcher die Arterienwände so sehr belastet, dass die Basalmembran, und damit auch

die alveolare-kapillare Barriere, zerstört wird (Dunham-Snary *et al.*, 2017; Sylvester *et al.*, 2012). Zudem führt Hypoxie zu einer inhibierten Aktivität und Expression des epithelialen Na^+ -Kanals und der Na^+ - K^+ -ATPase, welche normalerweise Na^+ , und folglich Wasser, aus den Alveolen transportieren (Sylvester *et al.*, 2012). Kommt es, durch einen Aufstieg in großen Höhen oder durch eine Lungenkrankheit, zu einer generalisierten Hypoxie und einer protrahierten HPV, kann dies zur Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie (PH) beitragen. Dabei kann es zu einem Anstieg des PAP auf Werte > 25 mmHg in Ruhe oder ca. 30 mmHg während einer Belastung kommen, welcher zu einer rechtsventrikulären Hypertrophie, Rechtsherzversagen und letztendlich zum Tode führen kann (Rubin, 1997; Runo & Loyd, 2003; Humbert *et al.*, 2004). Die pulmonale Hypertonie kann jedoch auch durch andere Faktoren ausgelöst werden, z.B. durch eine Erkrankung des linken Herzens oder einer chronischen Thromboembolie, weshalb die pulmonale Hypertonie in verschiedene klinische Klassen eingeteilt wird (siehe Tab. 1; Simonneau *et al.*, 2019). Für die erste Gruppe (pulmonalarterielle Hypertonie, PAH) sind bisher 5 Klassen von Medikamenten zugelassen: Calcium-Kanal-Inhibitoren, Prostanoiden, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Phosphodiesterase-5-Inhibitoren und Stimulatoren für die lösliche Guanylatzyklase (Wijeratne *et al.*, 2018). Die Behandlungen für PAH wirken jedoch nach wie vor eher palliativ als heilend. Bisherige Therapien für PAH beschränken sich auf Medikamente, die eine Vasodilatation induzieren oder die Proliferation von PASMCs inhibieren, wodurch die Symptome jedoch lediglich verbessert und nicht geheilt werden (Humbert *et al.*, 2004). Die Problematik der Medikamente liegt zudem bei kurzen Halbwertszeiten, schnellen Toleranzentwicklungen, Katheter-induzierten Infektionen, Thrombosen und Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Sehstörungen, Schwindel, Verdauungsstörungen, verstopfter Nase, Übelkeit, Gelenkschmerzen, Bronchitis und Infektionen der oberen Atemwege (Badesch *et al.*, 2002; Barst *et al.*, 1996; Karatza *et al.*, 2005; Rosenkranz *et al.*, 2015). Die beste Behandlungsmöglichkeit für PAH ist eine Herz-/Lungentransplantation, allerdings ist die Lebenserwartung nach der Operation auf wenige Jahre beschränkt (Kotloff & Thabut, 2011; Humbert *et al.*, 2004). Zudem kostet ein Jahr Behandlung mit dem Medikament Sildenafil schätzungsweise 13 000 US-Dollar gegenüber etwa 56 000 US-Dollar für Bosenta, wohingegen die Kosten für inhaliertes Iloprost und intravenöses Prostazyklin 90 000 US-Dollar pro Jahr übersteigen (Archer *et al.*, 2010). Zudem sind die genannten Medikamente nicht für eine Behandlung der PH-Gruppen 2 und 3 geeignet, sprich auch nicht für die Hypoxie-induzierte PH. Die bisherigen Therapien zielen daher auf die komorbiden Zustände, wie die systemische Hypertonie und die Herzklappenerkrankung (Wijeratne *et al.*, 2018). Neue therapeutische Strategien, die die protrahierte HPV inhibieren, könnten weitaus wirksamer gegen die Hypoxie-assoziierte PH sein. Die genauen Mechanismen, die einer protrahierten HPV unterliegen, sind jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

Tabelle 1. Klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (verändert nach Simonneau *et al.*, 2019).**1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)**

- 1.1. Idiopathische PAH
- 1.2. Hereditäre PAH
- 1.3. Medikament- und Toxin-induziert
- 1.4. PAH assoziiert mit:
 - 1.4.1. Erkrankung des konnektiven Gewebes
 - 1.4.2. HIV Infektion
 - 1.4.3. Portaler Hypertonie
 - 1.4.4. Angeborenem Herzfehler
 - 1.4.5. Schistosomiasis
- 1.5. PAH bei der über eine lange Zeit die Behandlung mit Calcium-Kanal-Inhibitoren anschlägt
- 1.6. PAH mit offenen Merkmalen einer Involvierung der Venen/Kapillaren
- 1.7. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen-Syndroms

2. PH auf Grund einer Erkrankung des linken Herzens

- 2.1. PH auf Grund von Herzversagen mit konservierter linksventrikulärer Auswurffraktion
- 2.2. PH auf Grund von Herzversagen mit reduzierter linksventrikulärer Auswurffraktion
- 2.3. Erkrankung der Herzklappen
- 2.4. Angeborene/erworbene kardiovaskuläre Konditionen, die zu einer postkapillaren PH führen

3. PH auf Grund einer Lungenerkrankung und/oder Hypoxie

- 3.1. Obstruktive Lungenerkrankung
- 3.2. Restriktive Lungenerkrankung
- 3.3. Andere restriktiv und obstruktiv gemischte Lungenerkrankungen
- 3.4. Hypoxie ohne eine Lungenerkrankung
- 3.5. Entwicklungsstörungen der Lunge

4. PH auf Grund von Obstruktionen der Arterien

- 4.1. Chronisch thromboembolische PH
- 4.2. Andere Obstruktionen der pulmonalen Arterien

5. PH mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen

- 5.1. Hämatologische Erkrankungen
- 5.2. Systemische und metabolische Erkrankungen
- 5.3. Andere
- 5.4. Komplexe angeborene Herzkrankheiten

1.1.4 Die Eigenschaften der HPV

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion ist folglich ein intrinsischer Mechanismus des Lungengefäßsystems zur Reaktion auf eine alveoläre Hypoxie, um die Ventilation an die Perfusion anzupassen und so den Lungengasaustausch zu optimieren (Sommer *et al.*, 2016; siehe Abb. 3).

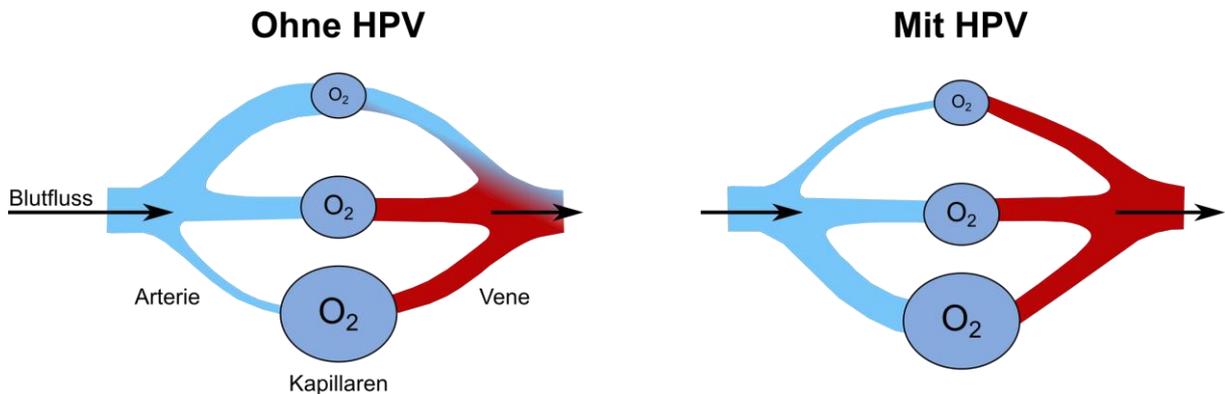


Abbildung 3. Darstellung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. Ohne eine hypoxische pulmonale Vasokonstriktion wird der Blutfluss in den pulmonalen Arterien nicht der Ventilation angepasst, so dass das Blut in den Kapillaren mit nicht genug Sauerstoff angereichert wird und sauerstoffarmes Blut in die Venen gelangt (links). Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion kann dies verhindern, indem pulmonale Arterien unter sauerstoffarmer Ventilation kontrahieren und somit den Blutfluss durch diese Regionen verringern (rechts). Somit fließt ausschließlich sauerstoffreiches Blut in die Venen (verändert nach Sommer *et al.*, 2016).

Die innerhalb von Minuten auftretende HPV tritt in Menschen und in fast allen Wirbeltieren, einschließlich Säugetiere (Weissmann *et al.*, 2004; Weissmann *et al.*, 1995; Lindgren *et al.*, 1985; Peake *et al.*, 1981), Vögel (Faraci *et al.*, 1984), Amphibien (Malvin & Walker, 2001) und Reptilien (Skovgaard *et al.*, 2005) auf. Obwohl die Größenordnung der HPV stark zwischen den Spezies und Untersuchungsmodellen variiert, ist der zeitliche Verlauf der Reaktion auf Hypoxie bei allen Spezies mehr oder weniger konsistent. Im Allgemeinen bewirkt eine starke Hypoxie einen anfänglichen Anstieg des pulmonalen Gefäßtonus, der innerhalb von 10 bis 15 min ein Maximum erreicht, und auf diese akute Phase folgt ein Rückgang um 20 bis 100 % während der folgenden 15 bis 50 min. Schließlich folgt ein allmählicher Anstieg des pulmonalen Gefäßtonus auf maximale Werte nach 30-180 min, bezeichnet als anhaltende oder auch protrahierte Phase der HPV (siehe Abb. 4). Im Gegensatz dazu führt eine mäßige Hypoxie in manchen Gefäßen zu einer Vasokonstriktion, die ein Maximum während der ersten 15-30 min erreicht und nicht gefolgt von einem Rückgang des Tonus ist. Stattdessen bleibt dieser gleich oder erhöht sich nur noch geringfügig (Sylvester *et al.*, 2012).

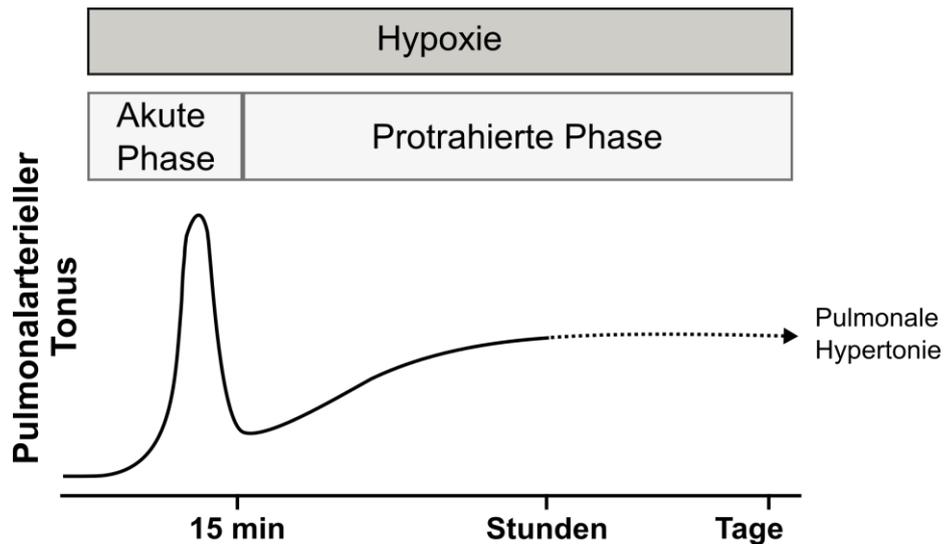


Abbildung 4. Der Verlauf der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. Hypoxie führt in vielen Spezies zu einem anfänglichen Anstieg des pulmonalen vasomotorischen Tonus innerhalb der ersten 15 min (akute Phase). Auf diese Phase folgen zuerst eine Dilatation und schließlich ein allmählicher Anstieg des vasomotorischen Tonus auf maximale Werte nach 30-180 min (protrahierte Phase). Unter chronischer Hypoxie kann die HPV zu der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie beitragen (verändert nach Ward & McMurtry, 2009).

Die Stärke der HPV hängt zudem vom PO_2 ab. Dabei gilt je geringer der PO_2 , desto stärker ist die HPV ausgeprägt. Während einer kurzen Hypoxieexposition tritt die HPV in intakten und isolierten Lungen aus Kälbern ab einem PO_2 von etwa 50 mmHg auf, erreicht 50 % des Maximums bei einem PO_2 von 30 mmHg und gelangt zu einem Maximum bei einem PO_2 von 20 mmHg (Rudolph & Yuan, 1966). Während einer längeren Exposition in Hypoxie von isolierten Lungen aus Schweinen erhöhen sich die genannten PO_2 -Werte auf 88 mmHg um ein Eintreten der HPV zu beobachten, 62 mmHg um 50 % des Maximums zu erreichen und 40 mmHg um eine maximale HPV zu erreichen (Hlastala *et al.*, 2004; Sylvester *et al.*, 2012). Die verfügbaren funktionalen und anatomischen Beweise zeigen zudem, dass die HPV im gesamten Lungengefäßsystem auftritt, einschließlich in der mikrovaskulären Region. Die größten und beständigsten HPV-Reaktionen treten jedoch in kleinen Lungenarterien (sprich intrapulmonalen Arterien (IPAs)) auf (Sylvester *et al.*, 2012). In angiographischen Studien von isolierten Lungenlappen, die *in situ* in intakten Windhunden perfundiert und beatmet wurden, verursachte Hypoxie eine reversible Verengung von Lungenarterien mit einem Durchmesser von $\leq 678 \mu\text{m}$, während die Verengung in den Arterien mit einem Durchmesser von ca. 300 μm am größten war (Allison & Stanbrook, 1980). In ähnlicher Weise trat die HPV in Arterien und Venen aus isolierten linken Lungenlappen von intakten Katzen mit einem Durchmesser von 100-600 μm auf, war jedoch am größten in Lungenarterien mit einem Durchmesser von 200-300 μm (Shirai *et al.*, 1986).

Bisherige Studien zeigen, dass isolierte PASMCs, im Gegensatz zu systemischen glatten Muskelzellen, auf Hypoxie mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) und einer Kontraktion reagieren (Salvatera & Goldmann, 1993; Desireddi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Robertson *et al.*, 1995). Dies lässt vermuten, dass in diesen Zellen die Sensor- und Effektor-Mechanismen der HPV vorhanden sind (Murray *et al.*, 1990; Madden *et al.*, 1992; Sham *et al.*, 2000). Die Rolle des Lungenendothels in der HPV ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Frühere Studien haben gezeigt, dass die HPV in isolierten intrapulmonalen Arterien aus Ratten und Schweinen vom Endothel abhängig ist (Liu *et al.*, 2001; Robertson *et al.*, 2003). Interessanterweise wurde auch vermutet, dass endotheliale Connexin 40 *gap junctions* für die HPV von Bedeutung sind: *In vivo* Fluoreszenzstudien in Echtzeit zeigten, dass Hypoxie eine Depolarisation der Endothelmembran in alveolaren Kapillaren hervorruft, die über Connexin 40 *gap junctions* zu Arteriolen übertragen wird. Die Autoren gingen davon aus, dass dieses Signal eine pulmonale Vasokonstriktion auslöst (Wang *et al.*, 2012). Es sollte jedoch erwähnt werden, dass isolierte Segmente der Arterien von Mäusen und Rindern nach vollständiger Denudation des Endothels immer noch auf Hypoxie reagierten (Kizub *et al.*, 2016; Korde *et al.*, 2011). Allerdings ist in den meisten Studien mit isolierten IPAs eine Vorstimulierung (auch genannt *pretone*) für die Entwicklung oder Amplifikation einer HPV erforderlich (Sylvester *et al.*, 2012). Dies ist jedoch in Studien an isolierten und perfundierten Lungen nicht der Fall. Isolierte, perfundierte und ventilierte Lungen reagieren auch ohne vasomotorischen Stimulus auf Hypoxie mit einem Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (Weissmann *et al.*, 2006). Dies lässt darauf schließen, dass andere Gefäßabschnitte oder andere Zelltypen (wie z.B. das Endothel) für die HPV mitverantwortlich sein könnten und so in dem Modell der isolierten Lunge eine endogene Vorkontraktion hervorrufen (Robertson *et al.*, 2000; Weissmann *et al.*, 2006; Weissmann *et al.*, 1995). Obwohl der wesentliche Mechanismus der HPV sehr wahrscheinlich in den PASMCs lokalisiert ist, kann daher ein endothelialer Mechanismus für die Generierung oder das Modulieren der HPV *in vivo* wichtig sein (Strielkov *et al.*, 2017).

1.2 Die Mechanismen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion

1.2.1 Der mögliche Mechanismus zur Sauerstoff-Detektion

Da Mitochondrien die hauptsächlichen Verbraucher von O_2 sind ist anzunehmen, dass diese Organellen als primäre Sauerstoffsensoren wirken können. Es wird angenommen, dass die mitochondriale Elektronentransportkette (ETC) als Sauerstoffsensor fungiert und die Kontraktion von PASMCs unter Hypoxie durch die Steuerung verschiedener Kinasen und Ionenkanäle durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) auslöst (Sommer *et al.*, 2016; Michelakis *et*

al., 2002). Jedoch ist der exakte Mechanismus, wie Mitochondrien Sauerstoff detektieren, nicht komplett aufgeklärt. Während des Prozesses der oxidativen Phosphorylierung werden stabile (wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2)), sowie instabile (Hydroxyl- und Superoxidradikale) ROS erzeugt (Liu *et al.*, 2002; Sylvester *et al.*, 2012; siehe Abb. 5). Es ist bekannt, dass ROS als intrazelluläre sekundäre Botenstoffe fungieren können und somit verschiedene Signalwege regulieren (Wong *et al.*, 2008).

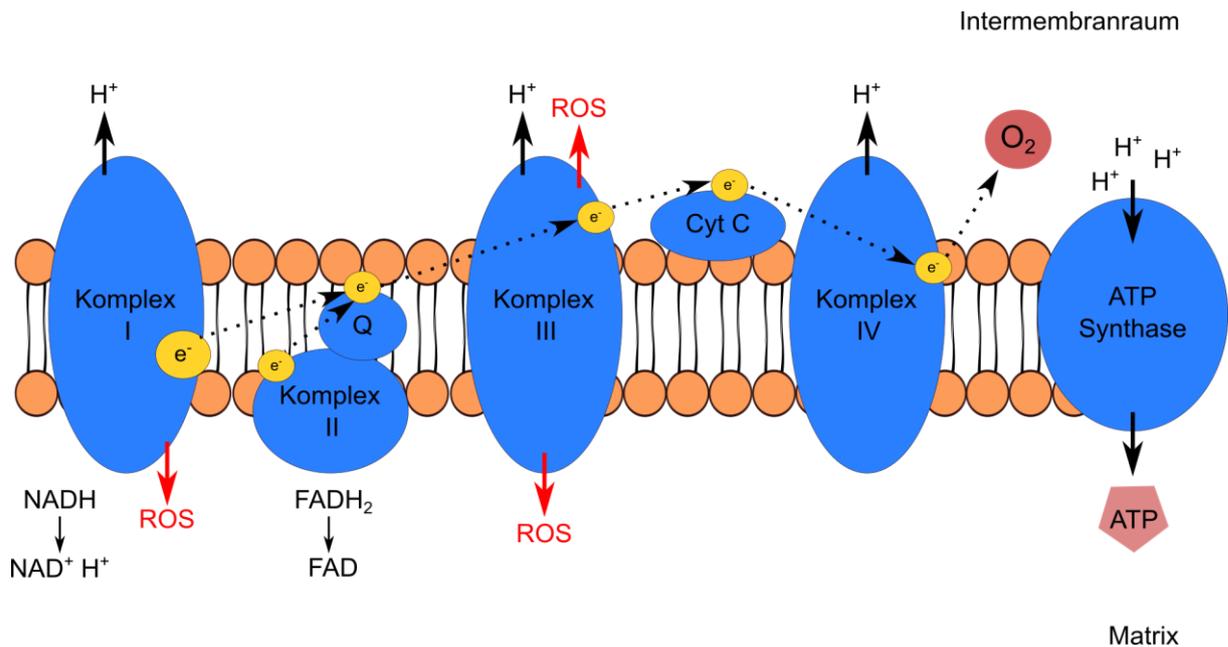


Abbildung 5. Die mitochondriale Elektronentransportkette. In der Elektronentransportkette werden am Komplex I (NADH-Dehydrogenase) die Elektronen (e^-) und Protonen (H^+) von NADH abgenommen. Die H^+ werden daraufhin in den Intermembranraum transportiert, während die e^- an das Coenzym Q (Q) weitergeleitet werden. Dasselbe geschieht an Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) mit FADH_2 , die H^+ werden über den Komplex III (Cytochrom C Reduktase) in den Intermembranraum transportiert, die e^- gelangen zum Coenzym Q. Der Komplex III übernimmt die e^- von Q und leitet diese an Cytochrom C (Cyt C). Danach werden die e^- auf den Komplex IV (Cytochrom C Oxidase) übertragen. Schließlich werden die e^- auf Sauerstoff (O_2) übertragen. Der H^+ -Gradient wird von der ATP-Synthase für die oxidative Phosphorylierung von ADP genutzt. Es wird vermutet, dass während des Elektronentransports reaktive Sauerstoffspezies (ROS) von Komplex I und Komplex III an die Matrix abgegeben werden, von Komplex III zudem an den Intermembranraum.

Die anfängliche Hypothese der Sauerstoffwahrnehmung von Weir und Archer aus dem Jahr 1995 legt nahe, dass in PSMCs die ROS-Erzeugung durch die mitochondriale Elektronentransportkette unter Hypoxie auf Grund einer reduzierten Verfügbarkeit von Sauerstoff abnimmt. Dies kann dazu führen, dass die Cysteinbrücken in den spannungsabhängigen Kaliumkanälen (K_V -Kanäle) reduziert werden, wodurch die Kanäle geschlossen und die Depolarisation der Membran und der Ca^{2+} -Eintritt induziert werden (Archer & Michelakis, 2002, Weir

& Archer, 1995). Nach dieser Hypothese sollten Inhibitoren der Elektronentransportkette den beginnenden Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ und die Vasokonstriktion nachahmen können. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Inhibitoren der proximalen Elektronentransportkette, wie Rotenon und Antimycin A, die ROS-induzierte Chemilumineszenz in Rattenlungen senken und eine Vasokonstriktion hervorrufen (Archer *et al.*, 1993). Es ist zu beachten, dass sich die anfänglichen ROS-Messungen auf Lucigenin verliesen, welches als membranundurchlässige Sonde bekannt ist (Archer *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2017). Demnach impliziert die beobachtete Abnahme der Chemilumineszenz unter Hypoxie eine Abnahme der extrazellulären Superoxidanionen, welche die Rate der ROS-Bildung in Mitochondrien möglicherweise nicht direkt widerspiegelt (Strielkov *et al.*, 2017).

Eine beträchtliche Datenmenge hat sich zugunsten der entgegengesetzten Hypothese angesammelt. Diese besagt, dass Mitochondrien die ROS-Freisetzung unter Hypoxie erhöhen (Desireddi *et al.*, 2010; Sommer *et al.*, 2010; Waypa *et al.*, 2006). Waypa *et al.* (2010) haben anhand eines neuen redoxsensitiven, fluoreszierenden Proteinsensors (RoGFP) gezeigt, dass Hypoxie die ROS-Produktion in der mitochondrialen Matrix in PSMCs verringert, während sie in dem mitochondrialen Intermembranraum ansteigt, woraufhin ROS ins Zytosol der PSMCs diffundieren. Zudem konnte, insbesondere bei Verwendung des Mitochondrien-Fluoreszenzfarbstoffs MitoSOX, ein Anstieg der ROS-Bildung unter Hypoxie in Kaninchen PSMCs nachgewiesen werden (Sommer *et al.*, 2010). Dieser Anstieg wurde von einer positiven Verschiebung des Mitochondrien-Membranpotenzials begleitet und ging der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ voraus. Trotz der erheblichen Evidenz für die Zunahme der mitochondrialen ROS-Bildung unter Hypoxie ist der mögliche zu Grunde liegende Mechanismus immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass ROS unter Hypoxie aus dem Mitochondrienkomplex III in den Intermembranraum freigesetzt werden. Anfänglich beruhte diese Hypothese auf Ergebnissen, die zeigten, dass die Hemmung des Komplexes I und der proximalen Teile des Komplexes III die hypoxischen Reaktionen hemmte, während Inhibitoren, die distal auf die äußere Ubichinol- (aktiviertes/elektronreiches Coenzym Q) Bindungsstelle des Komplexes III wirken, die HPV nicht reduzierten (Leach *et al.*, 2001; Waypa *et al.*, 2001; Waypa *et al.*, 2002). Succinat, welches die Hemmung von Komplex I durch die Bereitstellung von Elektronen über Komplex II umgeht, stellte den durch Hypoxie induzierten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ und die HPV wieder her (Leach *et al.*, 2001). Zudem wurde kürzlich das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (RISP) als essentiell für die ROS-Produktion am Komplex III während einer Hypoxie identifiziert. Es ist bekannt, dass RISP ein Elektron von Ubichinol an Cytochrom C überträgt, wodurch Ubisemichinon produziert wird, welches das zweite Elektron zu Cytochrom B des Komplexes III überträgt, aber auch dazu neigt, das Elektron anstelle von molekularem Sauerstoff freizusetzen, um Superoxid zu erzeugen (Korde *et al.*, 2011). Durch die Inhibierung der Genexpression von RISP mittels siRNA oder die Verwendung einer induzier-

baren *knockout*-Technik wurde der durch Hypoxie induzierte Anstieg der ROS-Bildung und der Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ in PASMCs verhindert, während die Überexpression von RISP den gegenteiligen Effekt hatte (Korde *et al.*, 2011; Waypa *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurde der akute Anstieg des rechtsventrikulären systolischen Drucks als Reaktion auf Hypoxie auch bei RISP *knockout* Mäusen abgeschwächt (Waypa *et al.*, 2013). Es ist jedoch erwähnenswert, dass die Inhibierung von RISP den Elektronentransfer stromabwärts von Cytochrom C hemmen kann und daher andere physiologische Funktionen beeinflusst, die von der Mitochondrienatmung abhängen. Die erhöhte ROS-Produktion am Komplex III kann das Ergebnis einer erhöhten Verfügbarkeit von Elektronen an der Ubichinol-Bindestelle, auf Grund von einer Elektronenakkumulation in der ETC während einer hypoxischen Reduktion des Komplexes IV, sein (Schumacker, 2011). Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass im PO_2 -Bereich hypoxischer Reaktionen von PASMCs eine kleine, aber signifikante Abnahme der Mitochondrienatmung und eine verringerte Aktivität von Cytochrom C beobachtet wurde (Sommer *et al.*, 2010). Darüber hinaus können Inhibitoren, die distal von der Ubichinol-Bindestelle wirken, tatsächlich die HPV verstärken (Leach *et al.*, 2001, Waypa *et al.*, 2001). Es wurde vor kurzem gezeigt, dass die Freisetzung von Superoxid aus Komplex III während einer akuten Hypoxie durch eine Hyperpolarisierung der Mitochondrienmembran, welche durch die Komplex IV Untereinheit 4 Isoform 2 (COX4i2) vermittelt wird, initiiert wird (Sommer *et al.*, 2017; Schumacker, 2011). Diese Schlussfolgerung basiert auf der Feststellung, dass in den Lungen von COX4i2^{-/-} Mäusen keine Depolarisation der Zellmembran und keine akute Phase der HPV zu sehen war, während die chronische, Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie nur geringfügig betroffen war. Außerdem zeigten PASMCs von COX4i2^{-/-} Mäusen keinen durch Hypoxie induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, des Superoxids und des mitochondrialen Membranpotentials (Sommer *et al.*, 2017). Einige Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die Inhibierung der ETC distal des Komplexes III nicht der einzige Mechanismus ist, durch den Hypoxie die ROS-Produktion am Komplex III aktiviert (Sommer *et al.*, 2008; Strielkov *et al.*, 2017). In dieser Hinsicht können auch spezifische Eigenschaften von Mitochondrien in PASMCs zur HPV beitragen. Mitochondrien von PASMCs weisen im Vergleich zu Mitochondrien in glatten Muskelzellen systemischer Arterien höhere ROS-Freisetzungsraten auf (Michelakis *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2016). Zudem sind die Mitochondrien in PASMCs deutlich näher an der plasmalemalen Membran angelagert als in glatten Muskelzellen der Mesenterialarterien. Infolgedessen sind die Auswirkungen der mitochondrialen Inhibitoren auf den K_V -Strom in PASMCs wahrscheinlich signifikant stärker (Firth *et al.*, 2009). Zusammengefasst zeigen die jüngsten Ergebnisse, dass Mitochondrien in PASMCs Eigenschaften besitzen, die für den hypoxischen Signalweg verantwortlich sein können. Allerdings ist bisher unklar, wie der Anstieg von ROS spezifisch zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und zu einer Vasokonstriktion führt.

1.2.2 Der *downstream* Mechanismus der HPV

Das Membranpotential (E_m) in PSMCs wird vorwiegend durch die K^+ -Permeabilität gesteuert. Es wurde gezeigt, dass K^+ -Ströme durch K_V -Kanäle die Hauptdeterminanten für das Ruhemembranpotential in PSMCs sind (Yuan, 1995; Evans *et al.* 1996; Post *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 1998). Hypoxie scheint den Ionenstrom durch K_V -Kanäle zu verringern und zu einer Depolarisation der PSMCs zu führen (Sylvester *et al.*, 2012). Daher sind wahrscheinlich einige sauerstoffsensitive K_V -Kanäle an der Initiierung der HPV beteiligt, darunter $K_V1.5$, $K_V2.1/K_V9.3$ und wahrscheinlich auch $K_V1.2$, sowie $K_V3.1b$ (Pozeg *et al.*, 2003). Außerdem ist eine verringerte Expression von $K_V1.5$ in mehreren Formen von pulmonaler Hypertonie festgestellt worden (Michelakis *et al.*, 2002). Zudem haben Mäuse, in denen die Expression von $K_V1.5$ inhibiert ist, eine verringerte HPV (Archer *et al.*, 2001). Hypoxie scheint jedoch keinen direkten Effekt auf den K_V -Kanal zu haben. Die Hypoxie-induzierte Depolarisation findet spezifisch in PSMCs statt, da Hypoxie nicht den Ionenstrom durch K_V -Kanäle in glatten Muskelzellen von Mesenterialarterien oder Arterien aus der Niere verringert (Post *et al.*, 1992; Yuan *et al.*, 1993). Zudem führt Hypoxie zu keiner Verringerung des Ionenstroms durch $K_V1.5$, wenn der humane $K_V1.5$ in glatten Muskelzellen von Mesenterialarterien überexprimiert wird. Wird der $K_V1.5$ jedoch in PSMCs überexprimiert, so reduziert Hypoxie den $K_V1.5$ -Ionenstrom, obwohl die Kinetik der exogen transfizierten $K_V1.5$ -Kanäle in beiden Zelltypen vergleichbar war (Platoshyn *et al.*, 2006). Diese Daten implizieren, dass die Hypoxie-induzierte Inhibition der K_V -Kanäle eine spezifische Eigenschaft von PSMCs ist und nicht der K_V -Kanäle selbst.

Der zu Grunde liegende Mechanismus der Inaktivierung von K_V -Kanälen unter Hypoxie befindet sich derzeit in einer Debatte. Anfangs wurde vorgeschlagen, dass eine Verringerung der ROS-Konzentration unter Hypoxie zu einer Reduktion der Thiol-Gruppen der porenbildenden Untereinheit der K_V -Kanäle führt, wodurch der Kanal nicht mehr geöffnet werden kann (Weir & Archer, 1995). Laut anderen Studien repräsentieren β -Untereinheiten von K_V -Kanälen einen Sauerstoffsensoren (López-López & Pérez-García, 2007; Pérez-García *et al.*, 1999). Eine frühere Studie zeigt, dass der Ausstrom von Ca^{2+} der initiale Schritt für die Inhibition der K_V -Kanäle und der Membrandepolarisation unter Hypoxie sein könnte (Post *et al.*, 1995). Andererseits wird vermutet, dass der K^+ -Ionenstrom durch Änderungen des zellulären Redoxstatus gesteuert wird, wobei möglicherweise Mitochondrien- und/oder NAD(P)H Oxidasen-abhängige Sauerstoffradikalbildungen beteiligt sind (Archer *et al.*, 2000; Weir und Archer, 1995). Vor kurzem konnte in der Studie von Sommer *et al.* (2017) gezeigt werden, dass die Applikation von H_2O_2 die Hypoxie-induzierte Depolarisation der Zellmembran von PSMCs aus Mäusen imitieren kann. Daher kann angenommen werden, dass die Erhöhung der ROS-Konzentration unter Hypoxie auch zu der Inaktivierung der K_V -Kanäle in PSMCs führt (Strielkov *et al.*, 2017). Die intrinsischen Mechanismen dieser Reaktion sind jedoch nach wie

vor nicht komplett verstanden. Bisher wird davon ausgegangen, dass die Depolarisation der Membran von PSMCs, durch die Schließung von K_V -Kanälen, zu einer Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und damit zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt (Sommer *et al.*, 2017). Die alleinige Inhibition der K_V -Kanäle scheint jedoch nicht ausreichend zu sein, um eine Vasokonstriktion auszulösen. In pulmonalen Arterien aus Ratten und Menschen führte die alleinige Applikation des K_V -Kanal-Inhibitors 4-AP nicht zu einer Vasokonstriktion, obwohl es in den PSMCs aus Ratten eine Depolarisation induzierte (Peng *et al.*, 1996; Osipenko *et al.*, 1998, Sylvester *et al.*, 2012). Demnach ist scheinbar noch mindestens ein weiterer Mechanismus von Nöten, um eine Vasokonstriktion zu induzieren.

In Anbetracht dessen könnte eine Hypoxie-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ die K_V -Kanäle sekundär beeinflussen, wodurch die durch Hypoxie hervorgerufene Membrandepolarisation induziert wird (Post *et al.*, 1995; Ward & Aaronson, 1999). Wie bereits erwähnt führt Hypoxie zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in isolierten PSMCs. Bekannterweise sind Veränderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ und in der Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparates die zwei Hauptdeterminanten für eine Kontraktion der SMCs (Kamm & Stull, 1985; Sylvester *et al.*, 2012). Es wurde gezeigt, dass die protrahierte HPV scheinbar von einer Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität abhängig ist (Robertson *et al.*, 2000). Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität kann durch eine Aktivierung der Rho Kinase induziert werden. Diese inhibiert die Myosin Phosphatase, wodurch die Phosphorylierung der leichten Myosinkette erhöht wird (Kimura *et al.*, 1996). Y-27632, ein Inhibitor der Rho Kinase, inhibiert bevorzugt die protrahierte Phase der HPV, während es nur eine minimale Wirkung auf die akute Phase der hypoxischen Kontraktion *in vivo*, *ex vivo* und *in vitro* aufweist (Wang *et al.*, 2001). Dennoch wird davon ausgegangen, dass eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ der letzte Schritt in der Signalkaskade der HPV ist. Die vorherigen Geschehnisse, die erklären wie z.B. Veränderungen der ROS-Konzentration letztlich zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führen (außer durch die Inhibition der K_V -Kanäle), sind nicht komplett verstanden. Bisherige Studien zeigen, dass ROS möglicherweise mit Ryanodin Rezeptoren interagieren und diese aktivieren, wodurch unter Hypoxie Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytosol von PSMCs strömen (Connolly *et al.*, 2013; Dipp *et al.*, 2001; Morio & McMurtry, 2002; Liao *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2007). Die Hypoxie-induzierte Erhöhung von ROS aktiviert zudem womöglich den extrazellulären Ca^{2+} -registrierenden Rezeptor, wodurch es zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ kommt (Zhang *et al.*, 2012). Außerdem wurde entdeckt, dass der *transient receptor potential channel 6* (TRPC6) eine wichtige Rolle für die akute hypoxische Reaktion spielt. Der TRPC6 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, der durch Diacylglycerol aktiviert wird. In isolierten PSMCs von Mäusen, denen TRPC6-Kanäle fehlen, fehlt der akute Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Außerdem fehlt in isolierten Lungen von TRPC6^{-/-} Mäusen die akute HPV, jedoch nicht die pulmonalvaskuläre Gefäßveränderung auf eine anhaltende oder chronische Hypoxie (Weissmann *et al.*, 2006). Neben dem TRPC6 können

auch andere TRP-Kanäle, wie der *transient receptor potential vanilloid cation channel 4* (TRPV4), bei der akuten HPV eine Rolle spielen, da ein *knockout* des TRPV4 die akute HPV spezifisch abschwächt (Goldenberg *et al.*, 2015). Die Ergebnisse zeigen, dass die akute HPV in den Pulmonalarterien von Mäusen mit einer Gendeletion des TRPV4s um 66% reduziert wurde. Zudem war der Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ in PSMCs unter Hypoxie ebenfalls signifikant abgeschwächt (Goldenberg *et al.*, 2015). Da die Gendeletion von TRPC6 zu einem ähnlichen Effekt führt, wurde vermutet, dass diese beiden Kanäle einen heteromeren Kanal bilden und die akute HPV in Tandem vermitteln. Dennoch ist der exakte Mechanismus, der zur Aktivierung der genannten Kanäle in PSMCs unter Hypoxie führt, nicht aufgeklärt.

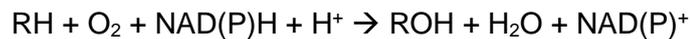
Die Mechanismen der protrahierten Phase der HPV scheinen sich von denen der akuten Phase zu unterscheiden. Im Gegensatz zu den Mechanismen, denen die akute HPV unterliegt, scheint ein zusätzlicher Faktor erforderlich zu sein, um die protrahierte Kontraktion unter Hypoxie zu erzeugen. Studien an intrapulmonalen Arterien von Schweinen, Ratten und Kaninchen legen nahe, dass ein löslicher pulmonaler Vasokonstriktor als Reaktion auf eine verlängerte Hypoxie freigesetzt wird (Gaine *et al.*, 1998; Talbot *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2001). In den Studien von Robertson und seinen Kollegen wurde Perfusat aus der hypoxischen Rattenlunge gesammelt und unter Verwendung einer Fraktion von diesem hitzestabilen Perfusat, mit einem Molekulargewicht von weniger als 3000, konnte in isolierten pulmonalen Arterien derselben Spezies eine Vasokonstriktion ausgelöst werden. Außerdem wurde dieser Faktor nicht während normoxischer Perfusion freigesetzt und löste nur in intrapulmonalen Arterien und nicht in Mesenterialarterien eine Kontraktion aus (Robertson *et al.*, 2001). Weiterhin haben Talbot *et al.* (2003) gezeigt, dass der unter Hypoxie, durch Kaninchen Pulmonalarterien, freigesetzte Faktor bei 38 °C für mehr als 60 min stabil war und für eine signifikante protrahierte Kontraktion von intrapulmonalen Arterien aus Kaninchen verantwortlich war. Allerdings ist die Identität des löslichen Vasokonstriktors in der HPV noch nicht bekannt. Bisherige Studien deuten darauf hin, dass Metabolite der Cytochrom-P450-Epoxygenasen, sogenannte Epoxyeicosatriensäuren, diesen Faktor darstellen und für die HPV mitverantwortlich sein könnten.

1.3 Die Cytochrom-P450-abgeleiteten Epoxyeicosatriensäuren

1.3.1 Die Synthese und der Metabolismus von Epoxyeicosatriensäuren

Cytochrom-P450 (CYP) umfasst eine Familie von membrangebundenen Hämoproteinen. Diese allgegenwärtigen Proteine sind in Pflanzen, Insekten und tierischen Geweben weit verbreitet und werden in allen bisher untersuchten Säugetierzelltypen exprimiert (de Montelano, 1995; Waxman & Chang, 1995; Nelson *et al.*, 1996). CYP-Enzyme sind typische Mo-

noxygenasen, die nach der enzymatischen Spaltung von molekularem Sauerstoff das Einfügen eines einzelnen Sauerstoffatoms in das Substrat (R) katalysieren, während der Rest als Wasser freigesetzt wird. Die katalytische Reaktion erfordert einen Elektronentransfer von NADPH auf das P450-Hämeisen, eine Reaktion, die durch ein membrangebundenes Flavoprotein, die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase, mit der folgenden Stöchiometrie katalysiert wird (de Montellano, 1995):



Die Bindung des Substrats spiegelt sich in den spektralen Eigenschaften des Enzyms wider, wobei die Absorption bei 390 nm zunimmt und bei 420 nm abnimmt. Wenn keine reduzierenden Äquivalente verfügbar sind, kann dieser Komplex stabil bleiben, d.h. wenn Kohlenmonoxid an reduziertes P450 bindet, wird der Katalysezyklus unterbrochen. Diese Reaktion ergibt das klassische CO-Differenzspektrum mit einem Maximum bei 450 nm (Oliw, 1994; de Montellano, 2005). Bei Säugetieren ist die Verbreitung von P450-Isoformen artspezifisch und mehr oder weniger vom Alter, Geschlecht und dem Organ abhängig (Nelson *et al.*, 1996; Kaspera & Totah, 2009; Omata *et al.*, 1992). Darüber hinaus wird die Menge der P450-Isoformen auch durch den tierischen Hormonstatus, die Ernährung und die Exposition gegenüber einer Vielzahl von Fremdchemikalien kontrolliert (de Montellano, 1995; Waxman & Chang, 1995; Capdevila *et al.*, 1995). Obwohl viele CYP-Isoenzyme in dem Metabolismus von Medikamenten involviert sind und ein Spektrum von mehrfach ungesättigten ω -6- und ω -3-Fettsäuren, wie Retinsäure, Linolsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexensäure oxidieren können, werden sie oft als der dritte Stoffwechselweg des Arachidonsäure-Metabolismus bezeichnet (Konkel & Schunck, 2011; Kaspera & Totah, 2009). Studien zur Beteiligung von CYP-Epoxygenasen am Metabolismus von Arachidonsäure wurden im Jahr 1969 mit dem Nachweis eingeleitet, dass mehrere mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit der Hämgruppe von CYP-Epoxygenasen interagieren und den Metabolismus von Medikamenten hemmen (Di Augustine & Fouts, 1969). Die detaillierte strukturelle Charakterisierung von Metaboliten aus mikrosomalen Fraktionen von Rattenlebern oder -nieren zeigte, dass die CYP-Epoxygenase Arachidonsäure zu einen oder mehreren der folgenden Typen metabolisiert: 1.) 5-, 8-, 9-, 11-, 12- und 15-Hydroxyeicosatetraensäure (HETEs) 2.) 16-, 17, 18-, 19- und 20-Hydroxyeicosatetraensäure (OH-AAs) und 3.) 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-Epoxyeicosatriensäuren (EETs) (Oliw, 1994; Makita *et al.*, 1996, Capdevila *et al.*, 1995). Die EETs sind *bis*-allylische Epoxide und als solche sind sie gegen den Angriff durch schwache Nucleophile wie Wasser und Glutathion resistent. Zudem sind EETs biologisch aktive Metabolite, die als autokrine und parakrine Faktoren fungieren und bisher für ihre anti-inflammatorischen, schmerzlindernden und vasodilatatorischen Eigenschaften bekannt sind (Spector, 2009; Schmelzer *et al.*, 2006). Die lösliche Epoxidhydrolase (*soluble epoxide hyd-*

rolase, sEH) katalysiert ihre schnelle enzymatische Hydratation zu den entsprechenden Dihydroxyeicosatriensäuren (DHETs) (Spector *et al.*, 2004; siehe Abb. 6). Jede Isoform der CYP-Epoxygenasen produziert mehrere Regioisomere der EETs, wobei normalerweise eine Form vorherrscht und jedes Regioisomer zwei R/S-Enantiomerenformen in unterschiedlichen Verhältnissen enthält (Capdevila *et al.*, 2000; Spector & Norris, 2006).

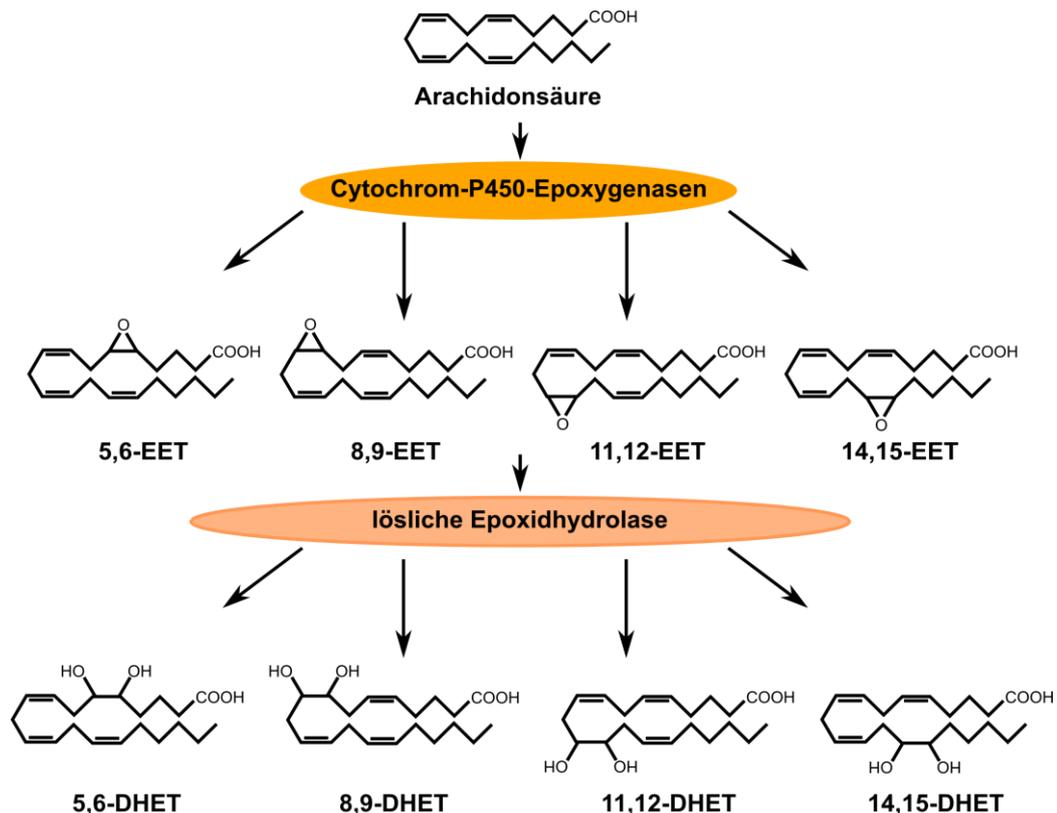


Abbildung 6. Der Metabolismus der Arachidonsäure. Arachidonsäure wird von der Cytochrom-P450-Epoxygenase zu vier Regioisomeren der Epoxyeicosatriensäure (EET) metabolisiert. Jedes EET-Regioisomer kann daraufhin von der löslichen Epoxidhydrolase zu den entsprechenden Dihydroxyeicosatriensäuren (DHET) hydrolisiert werden.

Vorherige Studien unterstützen die Annahme, dass die menschlichen CYP-Isoformen CYP2C8, CYP2C9 und CYP2J2 die Erzeugung von EETs in verschiedenen Geweben dominieren, mit einem geringeren Beitrag von anderen CYP-Isoformen, wie CYP3A4 und CYP1A2 (Daikh *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1996; Fer *et al.*, 2008). CYP2J-Unterfamilienmitglieder wurden bei vielen Spezies identifiziert, einschließlich Kaninchen, Ratten, Mäusen und Menschen (Kikuta *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1997; Nelson, 2009; Nelson *et al.*, 2004; Hukkanen *et al.*, 2002). Interessanterweise wird im Menschen nur ein einzelnes CYP2J-Gen (CYP2J2) exprimiert, aber es gibt sieben murine CYP2J-Gene (CYP2J5,

CYP2J6, CYP2J8, CYP2J9, CYP2J11, CYP2J12 und CYP2J13), während CYP2C-Isoformen kaum in der Mäuselunge exprimiert werden (Nelson et al., 2004; Graves et al., 2017). Dies erschwert die Untersuchung von EET-abhängigen Signalwegen im Mausmodell.

1.3.2 Die funktionellen Eigenschaften von EETs

Da die verschiedenen EET-Regioisomere eine Reihe ähnlicher metabolischer und funktioneller Eigenschaften aufweisen, werden EETs im Allgemeinen als eine einzige Klasse von Verbindungen betrachtet. Dies ist eine zu starke Vereinfachung, da es quantitative und sogar qualitative Unterschiede in den Wirkungen der verschiedenen Regioisomere gibt (Spector & Norris, 2006). Jedes Regioisomer spielt womöglich eine separate Rolle in der intrazellulären Signalkaskade, indem es autokrine und parakrine Effekte erzeugt (Chen et al., 2008; Yang et al., 2008; Spector & Norris, 2006). Obwohl EETs in der extrazellulären Flüssigkeit gewonnen werden, wenn sie entweder aus Arachidonsäure synthetisiert oder aus Phospholipiden freigesetzt werden, verweilen sie wahrscheinlich lange genug in den Zellen, um eine autokrine Reaktion auszulösen (Rosolowsky & Campbell, 1996; Weintraub et al., 1997; Weintraub et al., 1999). Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass sich radioaktiv markiertes EET, das anfänglich in endothelialen Phospholipiden vorhanden war, noch einige Zeit nach der Zugabe des Calciumionophors A-23187 in der extrazellulären Flüssigkeit ansammelte. Dies weist darauf hin, dass ein Teil der von den Phospholipiden hydrolysierten EETs wahrscheinlich einige Minuten im Zytosol verblieb, bevor er an das Medium abgegeben wurde (Fang et al., 2001). Ebenso scheint die zelluläre Aufnahme von EETs aus der extrazellulären Flüssigkeit schnell genug zu sein, um parakrine Effekte auszulösen. Zum Beispiel wurde der schnelle Einbau von extrazellulärem 14,15-EET in vaskuläre Phospholipide der glatten Muskelzellen beobachtet (Fang et al., 1997). Zudem fand im Zytosol eine schnelle Umwandlung des neu eingebauten 14,15-EET zu 14,15-DHET statt (Zeldin et al., 1993; Fang et al., 1997). Weitere Studien lassen vermuten, dass EETs direkt mit zellulären Proteinen interagieren können. *Patch Clamp*-Experimente haben gezeigt, dass EETs die Aktivität von myokardialen Na^{2+} -, ATP-sensitiven K^+ -Kanälen und L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen verändern (Lee et al., 1999; Lu et al., 2001; Xiao, 2007). Sie aktivieren zudem möglicherweise L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in vaskulären glatten Muskelzellen (Fang et al., 1999). Außerdem binden EETs direkt an den calciumpermeablen Kationenkanal TRPV4 (Berna-Erro et al., 2017). Dabei führte hauptsächlich 5,6-EET in murinen Endothelzellen aus Aorten zu einer Aktivierung des TRPV4 und zu einer erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]$; (Vriens et al., 2005; Watanabe et al., 2003). Wie EETs jedoch mit den anderen Ionenkanälen interagieren ist unklar. Die Veränderung der Position der Doppelbindung im EET-Molekül kann zu einer antagonistischen Aktivität führen. Der synthetische Antagonist zu 14,15-EET namens 14,15-EEZE unterscheidet sich insofern von der Struktur der origina-

len Version, dass die Doppelbindungen am Kohlenstoff 8,9 und 11,12 gesättigt sind und so die EET-induzierte Vasodilatation von Koronararterien aus Rindern inhibiert wird (Gauthier *et al.*, 2002). Solch eine Beziehung zwischen Struktur und Aktivität lässt darauf schließen, dass eine Bindungsinteraktion im EET-induzierten Mechanismus von Nöten ist, die eine präzise Konformation des EET-Moleküls erfordert. Viele Studien schlagen daher vor, dass EETs durch einen Rezeptor in der Plasmamembran agieren (Yang *et al.*, 2008; Snyder *et al.*, 2002). So konnte z.B. ein exogen appliziertes membranundurchlässiges 14,15-EET-Derivat die Aromataseaktivität in glatten Muskelzellen aus Aorten genauso inhibieren, wie 14,15-EET (Snyder *et al.*, 2002). Studien mit radiomarkiertem 14,15-EET zeigten außerdem eine hohe Bindungsaffinität zu Zellmembranen von Monozyten, U937-Zellen und mononukleären Zellfraktionen (Wong *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2000). Zudem scheint die Aktivität von EETs über einen $G_{s\alpha}$ -gekoppelten Rezeptor und einer darauffolgenden Aktivierung der Adenylatzyclase, einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und einer Aktivierung der Protein Kinase A vermittelt zu werden (Wong *et al.*, 2000, Spector & Norris, 2006). In koronaren glatten Muskelzellen werden Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle von EETs über diesen $G_{s\alpha}$ -vermittelten Mechanismus aktiviert (Li & Campbell, 1997). Die Identität des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, mit einer hohen Affinität zu EETs, ist jedoch trotz der neusten Untersuchung von 241 möglichen Kandidaten bisher unentdeckt (Liu *et al.*, 2017). Es besteht die Möglichkeit, dass EETs ebenfalls durch einen intrazellulären Mechanismus wirken können, jedoch gibt es bisher keine schlüssigen Beweise dafür (Spector & Norris, 2006). Im Allgemeinen bleiben die Signalwege, die diese Auswirkungen von EETs vermitteln, ungewiss.

Das Interesse an den vaskulären Wirkungen von EETs war anfangs mit ihrer Identifizierung als „vom Endothel abgeleitete hyperpolarisierende Faktoren“ (EDHF) verbunden (Campbell *et al.*, 1996; Fisslthaler *et al.*, 1999). Die Synthese der EDHFs soll dabei durch einen hypoxischen Stimulus oder durch Scherkräfte des Blutes aktiviert werden. Der Stimulus induziert dabei einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, woraufhin die Phospholipase A_2 im Endothel aktiviert wird, welche Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden freisetzt. Die Freisetzung von EDHFs führt daraufhin zu einer Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen und zu einer Freisetzung von K^+ aus den Endothelzellen, woraus die Hyperpolarisation der SMCs durch die Aktivierung von einwärtsgerichteten K^+ -Kanälen und/oder Na^+/K^+ -ATPasen folgt. Außerdem soll die Hyperpolarisation der Endothelzellen durch *gap junctions* auf glatte Muskelzellen übertragen werden. Alles in allem führt die Freisetzung der EDHFs folglich zu einer Vasodilatation (Michaelis & Fleming, 2006; Fleming, 2004). Der Grund warum EETs als EDHFs angesehen wurden liegt daran, dass EDHF-induzierte Reaktionen durch einen Inhibitor der CYP-Epoxygenase und der Phospholipase A_2 gehemmt werden konnten. So wurde eine EDHF-abhängige Vasodilatation in Herzkranzgefäßen und Arterien aus der Niere von Men-

schen, Schweinen, Kühen, Hunden, Ratten und Kaninchen beschrieben (diskutiert in Fleming, 2004). Es wird jedoch neuerdings vermutet, dass EETs mehr als nur Vasodilatoren von systemischen Gefäßen sind. Im Herzen haben EETs viele biologische Funktionen, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Vasodilatation, Inhibierung der Expression von Cytokin-induzierten Adhäsionsmolekülen von Endothelzellen und der Erhöhung der NO-Synthese (Hercule *et al.*, 2009; Kaspera und Totah, 2009). In der Niere fördern EETs die Salzausscheidung in proximalen Tubuli und 5,6-EET hemmt die Na⁺-Reabsorption und die K⁺-Sekretion im isolierten und perfundierten Sammelrohr der Kaninchenniere (Sun *et al.*, 2009). Daher hat die Stabilisierung der Synthese von EETs zur Verbesserung der abnormalen Hämodynamik der Niere und des Bluthochdrucks von Ratten beigetragen, die eine fettreiche Diät erhielten (Huang *et al.*, 2007; Kaspera und Totah, 2009). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass EETs an verschiedenen biologischen Reaktionen innerhalb der am Tumorstadium beteiligten Gefäße beteiligt sind. In humanen Krebsgeweben und Zelllinien verstärkte die Überexpression von CYP2J2 das Tumorstadium, erhöhte die Proliferation von Karzinomzellen, verhinderte die Apoptose von Krebszellen *in vitro* und erhöhte das Metastasierungs-potenzial *in vivo* bei Mäusen (Jiang, 2005; Kaspera & Totah, 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass EETs zur pulmonalen vaskulären Reaktion auf akute Hypoxie beitragen (Zhou *et al.*, 2013). Darauf wird nun im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.3.3 Die mutmaßliche Rolle von EETs in der HPV

Obwohl in früheren Studien gezeigt wurde, dass EETs die meisten Blutgefäße im systemischen Kreislauf relaxieren, ist deren Effekt im pulmonalen Kreislauf umstritten. EETs führen z.B. an Studien in der Kaninchenlunge oder in den Lungenarterien von Ferkeln zu einer Vasodilatation (Fuloria *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1997). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass sie zu einer Kontraktion von Lungenarterien aus Kaninchen führen und den Lungengefäßwiderstand in isolierten, perfundierten Lungen erhöhen (Zhu *et al.*, 2000; Stephenson *et al.*, 2003; Losapio *et al.*, 2005). Der Grund für diese Diskrepanzen ist unklar. Zudem wurde in der Studie von Pokreisz *et al.* (2006) dargestellt, dass die gehemmte Aktivität der CYP-Epoxygenase die akute hypoxische pulmonale Vasokonstriktion in Mäusen signifikant reduziert. Darüber hinaus hat eine Studie von Keserü *et al.* gezeigt, dass die akute pulmonale Vasokonstriktion durch den *knockout* der löslichen Epoxidhydrolase, dem Enzym welches die EETs degradiert, verstärkt wurde (Keserü *et al.*, 2009). Zhou *et al.* (2013) haben die Rolle des CYP2J-Locus von Mäusen in der HPV untersucht, indem eine Deletion erstellt wurde, die die gesamte CYP2J-Genregion in Mäusen umspannt und indem ein Mausstamm erstellt wurde, in dem die Locusdeletion mit dem humanen CYP2J2-Gen ersetzt wurde. Damit konnten sie zeigen, dass sich die systemischen und pulmonalen hämodynamischen Messungen

zu Beginn nicht in Wildtyp-, *knockout*- und komplementierten Mäusen unterschieden, wohingegen die HPV während eines Verschlusses des linken Hauptstamms des Bronchus beeinträchtigt und mit einer verminderten systemischen Sauerstoffversorgung in CYP2J^{-/-} Mäusen verbunden war, jedoch nicht in CYP2J^{-/-} Mäusen, die das menschliche CYP2J2-Gen trugen (Zhou *et al.*, 2013). Allerdings wurde in all diesen Studien eine hypoxische Exposition von 5-15 min gewählt, was lediglich eine akute Phase der HPV induziert. Die Rolle von EETs in dem Signalweg der protrahierten Phase der HPV wurde bisher nicht untersucht. Zudem ist eine Interpretation zu der Rolle von EETs in der Regulation der pulmonalen Zirkulation auf Grund der Diskrepanzen in der Literatur weiterhin kompliziert.

1.4 Das Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von EETs für die Regulation der protrahierten Phase der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion in Pulmonalarterien zu untersuchen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde das HPV-Modell anhand der Myographen-Technik in isolierten intrapulmonalen Arterien von Mäusen etabliert. Mit diesem Modell wurden die Auswirkungen einer Inhibierung der Synthese und des Abbaus von EETs auf die Entwicklung der protrahierten Phase der HPV untersucht. Die Ergebnisse anhand von intrapulmonalen Arterien wurden durch zusätzliche Untersuchungen in dem Modell der HPV in isolierten, perfundierten und ventilierten Mäuselungen verifiziert. Außerdem wurden Techniken wie [Ca²⁺]_i-Messungen und *Patch Clamp* verwendet, um die Wirkung von EETs auf isolierte PSMCs von Mäusen weiter zu überprüfen. Zusätzlich wurde der mögliche Mechanismus der EET-induzierten pulmonalen Vasokonstriktion untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Versuchstiergenehmigung und Tiertötung

Die durchgeführten Zellisolationen von PASMCs und Untersuchungen an der isolierten, perfundierten und ventilerten Mauslunge wurden vom Regierungspräsidium Gießen unter folgendem Aktenzeichen genehmigt:

-GI 20/10 Nr. 115/2014 („Isolation pulmonaler Zellen“)

-GI 20/10 Nr. 105/2014 („Mechanismen pulmonaler Erkrankungen am Modell der isoliert ventilerten und perfundierten Mauslunge (ILU)“)

Die Tiertötungen wurden unter den Meldenummern 527_M („Einfluss der Sauerstoffspannung auf die Gefäßwandkonstriktion der Pulmonalarterie“) und 640_M („Einfluss der Sauerstoffspannung auf die Gefäßwandkonstriktion der Pulmonalarterie in TRPC6 *knockout* Mäusen“) durchgeführt.

2.1.2 Mauslinien

Alle Untersuchungen an/mit Tieren wurden mit Mäusen durchgeführt (*Mus musculus*). Dafür wurden adulte, männliche C57BL/6J Mäuse (22–24 g Körpergewicht, im Folgenden als „Wildtyp“ bzw. „WT“ bezeichnet) aus der Zucht von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Bei dem Mausstamm handelt es sich um einen Inzuchtmausstamm. Des Weiteren wurden TRPC6 *knockout* Mäuse (TRPC6^{-/-}) wie zuvor beschrieben gezüchtet (Dietrich *et al.*, 2005) und in den Versuchen verwendet. TRPC6^{+/+} Mäuse, die ebenfalls männlich und im selben Alter wie die TRPC6^{-/-} Mäuse waren, wurden aus derselben Kolonie wie die dazugehörigen *knockout* Mäuse bezogen und als Kontrolltiere verwendet. Diese wurden ebenfalls im Folgenden als WT bezeichnet.

2.1.3 Versuchstierhaltung

Die Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung „Seltersberg“ in Gießen unter Standardbedingungen gehalten, sprich der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug 14/10 h, mit einem Tagbeginn um 5.00 Uhr und einem Nachtbeginn um 19.00 Uhr (nach Winterzeit). Die relative Luftfeuchte betrug 55 ± 10 % und die Raumtemperatur 22 ± 2 °C. Es wurden maximal 5 Tiere pro Käfig zusammengesetzt (IVC-Käfige, Typ IIL, Tecniplast, Deutschland). Den Tieren wurden Häus-

chen, Nistmaterial und Beißhölzer in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt. Futter (Haltungsdiät für Ratten und Mäuse Nr. 1324, Altromin, Deutschland) und Wasser wurden den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

2.2 Myographie von isolierten Blutgefäßen

2.2.1 Das Myographensystem

Das 4-Kammern-Myographensystem (620M, Danish Myo Technology A/S, Dänemark) erlaubt die *in vitro*-Messung der kontraktiven Aktivität von kleinen Blutgefäßen (mindestens 80 µm im Durchmesser) unter isometrischen Bedingungen. Das bedeutet, in diesem System findet keine Verschiebung bzw. Verkürzung der kontraktiven Myofibrillen statt, sondern ausschließlich eine Kraft- bzw. Spannungsänderung. Diese Technik wurde im Jahr 1972 von Bevan und Osher entwickelt und durch die Professoren Mulvany und Halpern (1977) weiter verbessert. Das Myographensystem besteht aus vier einzelnen, rostfreien Edelstahlkammern, mit einem Kammervolumen von max. 8 ml, die mit einer Abdeckung verschlossen werden, um die Evaporation der Lösung zu vermeiden. Jede Kammer kann einzeln beheizt und begast werden und über ein Vakuumsystem wird der Kammerinhalt geleert. In den Kammern wird das Gewebe mit Hilfe von 40 µm dicken rostfreien Edelstahldrähten eingespannt. Einer der Drähte wird dabei an Trägerbacken mit einem Kraftumwandler verbunden, der andere an Trägerbacken mit einer Mikrometerschraube (siehe Abb. 7). Der Kraftumwandler erlaubt die Messung von Veränderungen der Wandspannung mit einem Auflösungsvermögen von 0,01 mN. Zudem können mit Hilfe der Mikrometerschraube die Trägerbacken in µm-Schritten bewegt werden. Dies wird für die Applizierung einer Vorspannung benötigt, da unter physiologischen Bedingungen die Blutgefäße von Säugetieren durch den Blutdruck kontinuierlich einer Dehnung ausgesetzt sind. Die passiven Längen-Spannungs-Verhältnisse können mit Hilfe des DMT Normalization Module (LabChart 8, ADInstruments, Australien) individuell bestimmt werden. Dies ermöglicht die Berechnung der Menge an einer Gefäßdehnung, die erforderlich ist um eine Spannung zu erreichen, die äquivalent zu der *in vivo* Spannung ist. Die Berechnung erfolgt dabei nach dem Gesetz von Laplace, welches die Beziehung zwischen der Wandspannung und den auf sie einwirkenden Innendruck (P_i) beschreibt (Mulvany & Halpern, 1977; Angus & Wright, 2000):

$$P_i = \text{Wandspannung} / [\text{Innerer Gefäßumfang} / (2 * \pi)]$$

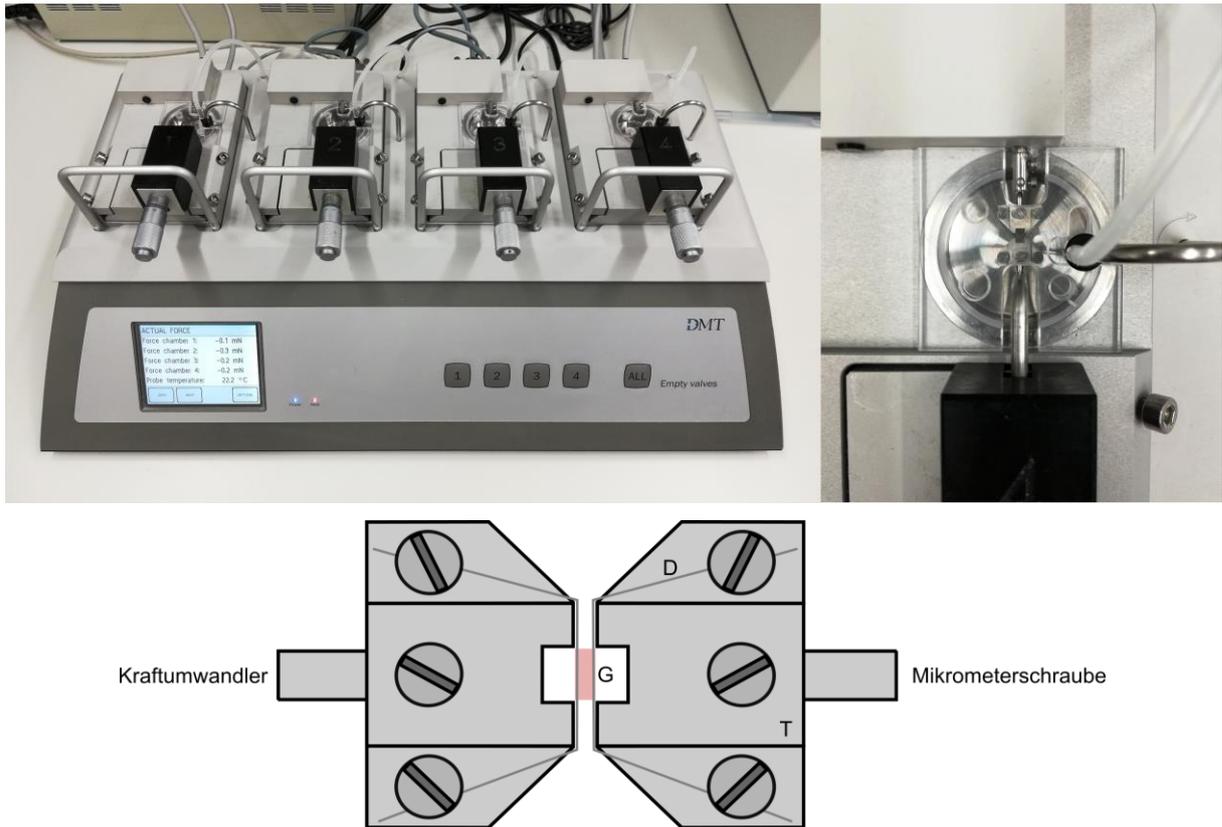


Abbildung 7. Das 4-Kammern-Myographensystem. Repräsentative Bilder vom verwendeten Myographen mit dem 4-Kammern-System (oben links), sowie eine Vergrößerung von einer Kammer (oben rechts). In der schematischen Darstellung (unten) ist ein Gefäß (G) mit Hilfe der Edelstahldrähten (D) unter den Schrauben der Trägerbacken (T) befestigt. Eine Trägerbacke ist mit einem Kraftumwandler, die andere mit der Mikrometerschraube verbunden.

2.2.2 Isolation von pulmonalen und systemischen Gefäßen

Für die Isolation der Gefäße wurden die Mäuse durch eine zervikale Dislokation getötet. Danach wurde ein Schnitt unterhalb des Brustkorbs ausgeführt, um Zugang zum Zwerchfell zu erhalten. Das Zwerchfell wurde durchtrennt und der Brustkorb geöffnet, sodass die Lunge und das Herz frei gelegt waren. Diese wurden vom umliegenden Gewebe getrennt und in eine physiologische Salzlösung (PSL, Zusammensetzung siehe Tab. 2) gelegt. Die Lösung wurde mit einem normoxischen Gasmischung (21 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂, Air Liquide, Deutschland) begast, sodass sich ein pH-Wert von 7,4 einstellte. Für die Isolation der extrapulmonalen Arterien (EPA, 500-700 µm im Durchmesser), wurde die Lunge samt Herz auf einer Petrischale (Danish Myo Technology A/S, Dänemark) fixiert und der rechte und linke Hauptstamm der EPA wurde unter einem Mikroskop (SMZ-171, Motic, Hong Kong) vom konnektivem Binde- und Fettgewebe befreit und in 2-3 mm lange Segmente geschnitten. Zudem wurden intrapulmonale Arterien vom linken Lobus und vom *post caval* Lobus isoliert. Vorherige Experimente haben gezeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen

den Reaktionen der IPAs aus den verschiedenen Lungenlobi gibt. Um die IPAs zu isolieren, wurde der entsprechende Lobus fixiert und ein Schnitt entlang des Bronchus ausgeführt, da IPAs entlang des Bronchus verlaufen. Der Bronchus wurde daraufhin vorsichtig entfernt und die Segmente der großen IPAs (450-650 μm im Durchmesser) und der kleinen IPAs (80-200 μm im Durchmesser) wurden vom konnektiven Gewebe befreit. Die Lokalisation der verwendeten Gefäße ist in Abb. 8 dargestellt. Außerdem wurde für manche Experimente die Aorta und die Femoralarterie isoliert. Für die Isolation der Aorta wurde diese samt Lunge und Herz vom umliegenden Gewebe getrennt und in PSL gelegt. Die Aorta wurde vom Herzen getrennt und ohne starke Spannung auf einer mit PSL gefüllten Petrischale fixiert und dort vom konnektivem Binde- und Fettgewebe befreit. Daraufhin wurde der thorakale Abschnitt der Aorta in 2-3 mm lange Segmente unterteilt. Für die Isolation der Femoralarterie wurde zunächst die Haut am Femur entfernt, wodurch die entlang des Beins verlaufende Arterie und Vene bereits sichtbar wurde. Diese wurden samt Muskelgewebe vom Femur getrennt und in PSL gelegt. Daraufhin wurde die Femoralarterie vom umliegenden Gewebe befreit und ebenfalls in 2-3 mm lange Segmente unterteilt. Während der gesamten Isolation der Gefäße wurde besonders vorsichtig präpariert, um die glatten Muskelzellen und das Endothel intakt zu halten. Die isolierten Gefäße wurden daraufhin entweder für die RNA-Interferenz-Experimente verwendet oder direkt im Myographensystem eingespannt.

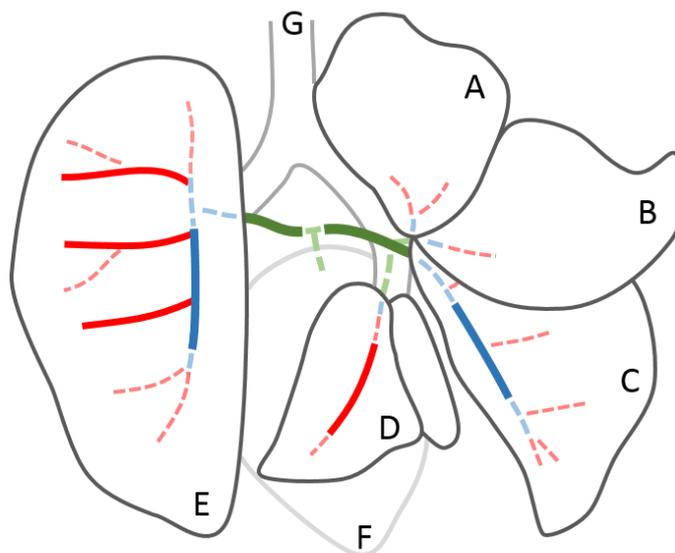


Abbildung 8. Schematische Darstellung der verwendeten pulmonalen Arterien von Mäusen. Die grünen Linien repräsentieren extrapulmonale Arterien (500-700 μm im Durchmesser), die blauen Linien große intrapulmonale Arterien (450-650 μm im Durchmesser) und die roten Linien kleine intrapulmonale Arterien (80-200 μm im Durchmesser). Die dicken Linien repräsentieren die für die Versuche verwendeten Arteriensegmente. Die gestrichelten Linien repräsentieren den weiteren Verlauf der Arterien. A: *Lobus cranialis* B: *Lobus medialis* C: *Lobus caudalis* D: *Lobus accessorius* E: linke Lunge F: Herz G: Trachea.

Tabelle 2. Zusammensetzung der physiologischen Salzlösung (PSL) und der physiologischen Salzlösung mit einem hohen Kaliumanteil (KPSL).

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration PSL (mM)</u>	<u>Konzentration KPSL (mM)</u>	<u>Firma</u>
Natriumchlorid	118,0	38,0	Sigma-Aldrich, USA
Kaliumchlorid	4,0	80,0	Carl Roth, Deutschland
Calciumchlorid	1,8	1,8	Carl Roth, Deutschland
Magnesiumsulfat	1,0	1,0	Carl Roth, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	0,4	0,4	Carl Roth, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	24,0	24,0	Carl Roth, Deutschland
Glukose	5,5	5,5	Carl Roth, Deutschland

2.2.3 Isometrische Kontraktionsmessung

Vor jedem Versuch wurden die Kammern unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂) auf 37 °C beheizt und mit 6 ml PSL befüllt. Danach wurden die Gefäße mit Hilfe der 40 µm dicken Edelstahldrähte in die Kammern eingespannt und die Drähte wurden mit der Mikrometerschraube so nah wie möglich aneinander geführt. Daraufhin wurde die Aufzeichnung der Wandspannung gleich Null gesetzt. Die Arterien wurden auf eine Wandspannung äquivalent zu einem Blutdruck von 15 mmHg und die Aorten auf eine Wandspannung äquivalent zu 100 mmHg gedehnt. Die Aufzeichnung der Wandspannung erfolgte mit LabChart 8 (ADInstruments, Australien). Zu Beginn jedes Experiments wurden die Gefäße 3-mal für 3 min mit KPSL stimuliert, einer PSL mit 80 mM K⁺ (siehe Tab. 2). Hiermit wurden die Vitalität und Integrität der Gefäße überprüft. Durch die Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration wurde eine Depolarisation induziert, wodurch es zu einer Kontraktion der PASMCs kam (Coppock *et al.*, 2001). Für die Versuche wurden lediglich Gefäße verwendet, die unter KPSL eine Erhöhung der kontraktile Kraft von mindestens 1 mN aufwiesen. Änderungen der Wandspannung (T) während der hypoxischen Exposition oder während einer gleich langen Zeit unter Normoxie, im Vergleich zu den Ausgangswerten, werden in den Ergebnissen als Prozentsätze der maximalen Konstriktion ausgedrückt, die durch die endgültige Exposition gegenüber KPSL induziert wurde (% T_K). Nach dieser Prozedur wurde 20 min gewartet, da-

mit die Wandspannung einen stabilen Wert annehmen konnte, bevor das eigentliche Experiment durchgeführt wurde. Da pulmonale Arterien *in vivo* bereits eine gewisse Vorspannung aufweisen (Connolly *et al.*, 2013), wurde in manchen Experimenten ein *pretone* appliziert, sprich die Gefäße wurden entweder mit 15-20 mM KCl oder mit 1-3 nM U46619 vorstimuliert. Die exakte Konzentration eines *pretone*s wurde für jedes Gefäß individuell appliziert, um eine Kontraktion zu erreichen, die 20 % der maximalen Kontraktion unter KPSL entsprach. Die Vorversuche haben gezeigt, dass dieser Ansatz reproduzierbare Ergebnisse liefert. Sobald die Gefäße daraufhin eine stabile Wandspannung aufwiesen, wurde die Begasung für 80 min auf ein hypoxisches Gasgemisch (1 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂, Air Liquide, Deutschland) umgestellt. Der Partialdruck von O₂ in der Lösung betrug dabei 15-22 mmHg (gemessen mit einem optischen, nadelartigen Sauerstoffsensor (Firesting, Pyro Science, Deutschland)). Am Ende jedes Experiments wurde erneut KPSL appliziert, um zu überprüfen, ob die Gefäße nach wie vor reaktionsfähig waren. In einigen Experimenten wurde vor der Messung das Endothel entfernt, indem ein menschliches Haar in das Lumen der eingespannten Arterie eingeführt und vorsichtig an der luminalen Oberfläche gerieben wurde. Die erfolgreiche Entfernung des Endothels wurde durch die Applikation von 10 µM Acetylcholin (Sigma-Aldrich, USA) in Anwesenheit eines 3 µM Prostaglandin F_{2α}-induzierten *pretone*s (Sigma-Aldrich, USA) überprüft. Außerdem wurden für die Experimente verschiedene Inhibitoren und Agonisten verwendet, die in Tab. 3 aufgeführt sind.

Tabelle 3. Verwendete Inhibitoren und Agonisten für die Messungen im Myographensystem.

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Firma</u>
MS-PPOH	30,0 µM	Cayman Chemical, Deutschland
14,15-EEZE	1,5 µM	Cayman Chemical, Deutschland
TPPU	3,0 µM	Cayman Chemical, Deutschland
5,6-Epoxyeicosatriensäure	0,1-3,0 µM	Cayman Chemical, Deutschland
8,9-Epoxyeicosatriensäure	0,1-3,0 µM	Cayman Chemical, Deutschland
11,12-Epoxyeicosatriensäure	0,1-3,0 µM	Cayman Chemical, Deutschland
14,15-Epoxyeicosatriensäure	0,1-3,0 µM	Cayman Chemical, Deutschland
5,6-Dihydroxyeicosatriensäure	1,5 µM	Cayman Chemical, Deutschland
H ₂ O ₂	3,0 µM	Sigma-Aldrich, USA
4-Aminopyridin	1,0 mM	Sigma-Aldrich, USA
Nifedipin	1,0 µM	Sigma-Aldrich, USA

Die verwendeten Inhibitoren für den EET-Signalweg namens MS-PPOH, 14,15-EEZE und TPPU wurden 15 min vor der 80-minütigen Inkubation unter Hypoxie (bzw. Normoxie für die Kontrollen) appliziert. Die Epoxyeicosatriensäuren, sowie H₂O₂, 4-Aminopyridin und Nifedipin wurden lediglich unter normoxischen Bedingungen appliziert. Bei allen Substanzen, die in Ethanol gelöst waren, wurde der Ethanol mit Stickstoff vaporisiert und durch PSL ersetzt. Für Substanzen, die in Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, USA) gelöst waren, wurden entsprechende Kontrollen ausgeführt.

2.2.4 RNA-Interferenz-Experimente

Um die Involvierung von EETS in der HPV zu untersuchen, wurde eine Methode entwickelt, um die Expression der löslichen Epoxidhydrolase und der Cytochrom-P450-Epoxygenasen in isolierten IPAs aus Mäusen zu inhibieren. Dies geschah mit Hilfe von *small interfering RNAs* (siRNAs) (ON-TARGET plus SMARTpool, Dharmacon, USA) in einer Konzentration von 5 nM. Das SMARTpool siRNA Reagenz ist eine Mischung aus vier siRNA Duplexen, die alle an unterschiedlichen Stellen innerhalb des spezifischen Gens binden. Die siRNA Sequenzen wurden mit dem SMARTselection Design Algorithmus von Dharmacon generiert und anschließend unter Verwendung einer BLAST Analyse mit einer Datenbank für die entsprechende Spezies auf signifikante Sequenzidentität mit anderen nicht-zielgerichteten Genen analysiert (Zielsequenzen sind in der Tab. 4 dargestellt).

Tabelle 4. Zielsequenzen der verwendeten siRNAs.

<u>Gen</u>	<u>Zielsequenzen</u>
Ephx2	AGUUUGAACACGCCGUUUA, GUAAAGGGUUGGGACGAAA, GUGCGUACCAGACGGAAUU, CCAUGAAAGUUAUCCGAUC
CYP2J5	UGUCAAGAAACACGAGAAA, UGAUAUCAGAGAAGCGAAA, GGUUAGAGAACGAAUCACA, AUGAGUAGCUAUCCAGAAA
CYP2J6	GUGUUAUGCAAGAACGUAU, CAUUAUGAAUCGUCCUCUA, CAUCCAGCCGUUGGUGAA, AGGGAAGUAGCAAUGGAUA
CYP2J9	CAGAAUGGCUGCAACCGUU, GAGCUUAGAGGAACGAAUA, GGGAAUGGAUUAAGUAGAU, CAAGUUAUGGGUUCAGUAA
CYP2J11	GGAAACGUAAUUAGCGUGA, GGGAACAAUUGGCCAGUUG, AAUCAUAUGUUCUGAGGCA, CUGCAAGGCAACAUGUAUU
CYP2J12	UAGAUGAAGCCACGUGUUU, AUGUAGUGAUUCAGCAGUU, GGAGACAAGACUACUACAA, CCUUCAUGCUCUUGGCCUCA
CYP2J13	GAGCUUAGAGCAUCGAAUU, GCGUAGAGUUGGCGGGAAU, GAAGGAAGGUGACGGGGAA, AAUCAAGUCUGCAGUCAUU
<i>non targeting</i> siRNA	UGGUUUACAUGUCGACUAA, UGGUUUACAUGUUGUGUGA, UGGUUUACAUGUUUCUGA, UGGUUUACAUGUUUCCUA

Die IPAs wurden für die Transfektion in 250 μl *minimal essential medium* (MEM, Sigma-Aldrich, USA) ohne Antibiotika überführt. Daraufhin wurden 1,25 μl vom Lipofectamine RNAiMAX Transfektions Reagenz und 0,02 nM siRNA hinzugefügt. Die IPAs wurden darin für 6 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium zu 3 ml MEM + 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, Life Technologies, USA) gewechselt. Darin wurden die IPAs für vier Tage inkubiert, das Medium wurde jedoch am zweiten Tag erneuert. Am vierten Tag wurde die kontraktile Aktivität der IPAs mit Hilfe der Myographen-Technik untersucht. Die Überprüfung des *knockdowns* erfolgte mittels *Real-Time* PCR (siehe 2.5.1.).

2.2.5 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mit dem konfokalen Myographensystem (360CW, Danish Myo Technology A/S, Dänemark). Dieses System wurde speziell entwickelt, um einen nahen optischen Zugang zu dem eingespannten Gefäß zu erlangen. Die Gefäße wurden dafür in eine Myographenkammer eingespannt, deren Boden aus Quarzglas besteht. Somit konnten simultane Messungen der Wandspannung und der Fluoreszenz aufgezeichnet werden. Für die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden die eingespannten IPAs für 60 min bei Raumtemperatur in einer PSL inkubiert, die mit dem intrazellulär fluoreszierenden Calciumindikator Cal-520 (10 μM , AAT Bioquest, USA) und 0,02 % Pluronic F-127 (Thermo Fisher Scientific, USA) versetzt war. Die Begasung der PSL erfolgte mit normoxischen Gas (21 % O_2 , 5,3 % CO_2 , Rest N_2 , Air Liquide, Deutschland). Danach wurde die Kammer mit reiner PSL gewaschen und auf 37 °C erhitzt. Für die Messung wurden alle 4 sec ein Bild mit einer CCD-Kamera (Sensicam QE, PCO AG, Deutschland) aufgezeichnet, die an einem invertierten Fluoreszenz-Mikroskop (IX71, Olympus, Japan) installiert war. Während der Bildaufnahme wurden die IPAs mit 485 nm durch den Monochromator Polychrome V (Till Photonic, Deutschland) beleuchtet. Für die Erfassung der Fluoreszenz wurde die durchschnittliche Intensität des von dem Gefäß emittierten Lichts ($> 510 \text{ nm}$) berechnet, wobei die durchschnittliche Hintergrundintensität von jedem Bild abgezogen wurde. Dafür wurde die Micro-Manager Software (Edelstein *et al.*, 2014) benutzt. Vor dem Beginn der Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde, wie bereits beschrieben, eine Vorspannung in den IPAs appliziert und mittels 3-maliger KPSL-Applikation deren Funktionalität überprüft. Alle darauffolgenden Veränderungen der Fluoreszenz wurden als Prozentsatz der maximalen Fluoreszenzintensität, die in Antwort auf 80 mM KPSL beobachtet wurde, dargestellt (% F_K). Die Wandspannung wurde zeitgleich mit LabChart 8 (ADInstruments, Australien) aufgezeichnet.

2.3 Isolierte, perfundierte und ventilierte Lunge

Das Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge bietet die Möglichkeit den kontinuierlichen, pulmonalarteriellen und pulmonalvenösen Druck im intakten Organ, z.B. eine Vasokontraktion/Dilatation, zu messen. Die Versuche wurden unter Mithilfe von Nasim Alebrahimdehkordi durchgeführt. Zu Beginn des Versuches wurde das Perfusionsystem mehrfach mit destilliertem Wasser gespült und auf 4 °C gekühlt, bevor es mit Krebs-Henseleit-Lösung (Serag-Wiessner, Deutschland, Zusammensetzung siehe Tab. 5) befüllt wurde. Daraufhin wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit einer Mischung aus Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht; Bela-Pharm GmbH & Co.KG, Deutschland), Xylazin (20 mg/kg Körpergewicht; Ceva Tiergesundheit GmbH, Deutschland) und Heparin (50.000 I.E./kg Körpergewicht; Ratiopharm GmbH, Deutschland) anästhesiert und antikoaguliert. Die Tiere wurden in aufrechter Rückenlage auf einem Gestell fixiert, wodurch ein Einschnitt der Haut vom Unterkiefer zum oberen Abdomen durchgeführt werden konnte. Daraufhin wurde die Trachea der Maus freipräpariert und unterhalb der Trachea wurde ein Bindfaden mit einem Knoten vorgelegt (Coats GmbH, Deutschland). Die Trachea wurde danach oberhalb des Knotens eingeschnitten, wodurch ein Tubus (Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) eingeführt und mittels des vorgelegten Fadens in der Trachea fixiert wurde. Die Maus wurde daraufhin über den Trachealtubus und die angeschlossene Beatmungspumpe (Minivent Type 845, Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) mit Raumluft beatmet. Die Beatmungspumpe war dabei auf ein Atemzugvolumen von 150 µl pro Atemzug und 90 Atemzüge pro Minute eingestellt. Für die Katheterisierung der Pulmonalarterie wurde der Bauchraum und der Thorax der Maus geöffnet, um das Herz und die Lunge frei zu legen. Daraufhin wurde zunächst die Herzspitze und danach der rechte Ventrikel eingeschnitten, um dort einen mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten Perfusionskatheter in die Pulmonalarterie einzuführen und mit dem vorgelegten Faden zu fixieren. Die Perfusion erfolgte mit der Masterflex Peristaltic Pump Easy-load 7518-10 von Cole Parmer (USA). Mit dem Start der Perfusion erfolgte zudem die Umstellung auf eine Ventilation mit einem normoxischen Gasgemisch (21 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂; Air Liquide, Deutschland), um den pH-Wert der Perfusion aufrecht zu erhalten. Als nächstes wurde die Trachea, die Lunge und das Herz *en bloc* aus dem Brustkorb entfernt (ohne die Beatmung und Perfusion zu unterbrechen) und das Lungengewicht wurde mit Hilfe eines Kraftwandlers (Kent Scientific, USA) überwacht. Ein zweiter Perfusionskatheter, mit einer gebogenen Kanüle an seiner Spitze, wurde über den linken Ventrikel in das linke Atrium eingeführt und mit einem Faden fixiert. Der Perfusionsfluss wurde dabei langsam von 0,2 auf 2 ml/min erhöht (gesamtes Systemvolumen betrug 10 ml). Nachdem die Lunge mit ca. 20 ml Lösung gespült wurde (um Blutreste zu entfernen), wurde der Perfusionskreislauf geschlossen und somit ein rezirkulierendes System hergestellt. Der linksarterielle Druck wurde auf 2,0 mmHg eingestellt. Die isolierte und perfundierte Lunge wurde in eine

Gehäusekammer platziert, worin das ganze System auf 37,5 °C erwärmt wurde. Der Druck in der Pulmonalarterie (*pulmonary artery pressure*, PAP), im linken Ventrikel und in der Trachea wurde mittels eines Druckwandlers (Combitrans 1-fach Set Mod. II Uni Gießen, Braun, Deutschland), der mit dem Perfusionskatheter verbunden war, registriert und mit Hilfe eines Analog-Digital-Wandlers (PCLD-8115 wiring terminal board Rev.A2, Advantech, Deutschland) digitalisiert, wodurch die Daten mit einem Computer aufgezeichnet werden konnten (Sydykov, 2009; Malczyk, 2017).

Tabelle 5. Die Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung.

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>
Natriumchlorid	120,0
Kaliumchlorid	4,3
Kaliumdihydrogenphosphat	1,1
Calciumchlorid	2,4
Magnesiumchlorid	1,3
Glukose	13,3
Hydroxyethylamylopectin (Molekulargewicht 200,000)	5 % (wt/vol)
Natriumbicarbonat	24,0

2.4 Whole Cell Patch Clamp-Experimente

2.4.1 Grundprinzipien der *Patch Clamp*-Technik

Die *Patch Clamp*-Technik ermöglicht die Messung von Ionenströmen über einzelne Ionenkanäle. „*Patch*“ steht dabei für den Membranbereich, der unter der Messelektrode liegt. Die aus Glas gefertigte Messelektrode (*Patch-Pipette*) wird demnach nicht in die Zelle eingestochen, sondern so nah an die Zelle herangeführt, bis ein sogenanntes „*giga seal*“ entsteht, sprich ein hoher elektrischer Widerstand. Dadurch wird der Membranfleck in der Messelektrode elektrisch von der restlichen Membran isoliert und kann gezielt auf das Ein- und Ausströmen von Ionen untersucht werden. Die elektrischen Widerstände zwischen der Membran und der *Patch-Pipette* liegen dabei im Gigaohm-Bereich ($G\Omega$). Mit Hilfe des *giga seals* werden Leckströme minimiert, was für die Messung von Einzelkanalableitungen von großer Bedeutung ist, da die isolierten Ionenkanäle lediglich eine Stromamplitude von wenigen Picoampere (pA) aufweisen. Eine Referenzelektrode in der Badlösung erlaubt dabei die Messung des

Membranpotentials des *Patches*. Das Membranpotential wird daraufhin von einem Vorverstärker amplifiziert und an den *Patch Clamp*-Verstärker übertragen. Der *Patch Clamp*-Verstärker ist für den Vergleich zwischen dem vorhandenen Membranpotential und einem festgelegten Sollwert zuständig. Um diesen auszugleichen, wird von dem *Patch Clamp*-Verstärker ein kompensatorischer Klemmstrom generiert. Dieser wird mit Hilfe der Messelektrode auf den *Patch* appliziert und entspricht dabei dem über die Zellmembran fließenden Strom, jedoch mit umgekehrten Vorzeichen. Dieser Strom kann schließlich mit Hilfe eines Messprogramms digital dokumentiert werden. Die Messelektrode befindet sich dabei in der sogenannten *cell attached*-Konfiguration und misst dabei ausschließlich die Ionenströme im isolierten Membranfleck. Wird ein Unterdruck auf den *Patch* ausgeübt, wird dieser zerstört und man erreicht den sogenannten *Whole Cell*-Modus. Dieser ermöglicht die Messung der Summe aller Ionenströme über die ganze Membran (Knöpp, 2015). In dieser Dissertation wurde lediglich die *Whole Cell*-Konfiguration für die Messungen verwendet. Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Fenja Knöpp durchgeführt.

2.4.2 Isolation von PSMCs

Für die Durchführung der *Patch Clamp*-Versuche wurden PSMCs basierend auf dem Protokoll von Waypa *et al.* (2001) aus Wildtyp C57BL6/J Mäusen isoliert. Dafür wurden die Mäuse, wie bereits in 2.3 beschrieben, anästhesiert und antikoaguliert. Sobald die nozizeptiven und viszerale Reflexe erfolgreich gelähmt waren, wurde die Maus fixiert und das Abdomen der Maus geöffnet, um Zugang zur unteren Hohlvene und der Bauchorta zu erhalten. Diese wurden durchtrennt, um den Tod des Tieres zu verursachen. Daraufhin wurde das Zwerchfell eingeschnitten und der Brustkorb geöffnet, um das Herz frei zu legen. Der darauf liegende Thymus und das Perikard um das Herz wurden entfernt, bevor eine Ligatur um die Pulmonalarterie und die Aorta gelegt wurde. Daraufhin wurde ein Schnitt in den linken Ventrikel durchgeführt, damit das Spülen der Lunge nicht zur Ausbildung eines Ödems führte. Als nächstes wurde ein kleiner Schnitt in den rechten Ventrikel ausgeführt, durch den ein Katheter in die Pulmonalarterie eingeführt und daraufhin eingebunden wurde. Über diesen wurde die Lunge mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Pan-Biotech GmbH, Deutschland) gespült, um das restliche Blut zu entfernen und sie stattdessen mit einer 37 °C warmen flüssigen Agarose-Eisenpartikel-Suspension (2 ml Suspension/Lunge; Sigma-Aldrich, USA) zu befüllen. Die Eisenpartikel akkumulieren dabei auf Grund ihrer Größe im präkapillaren Bereich, da sie diesen nicht durchdringen können. Dadurch wird die Isolation von präkapillaren Gefäßen bzw. Zellen ermöglicht. Anschließend wurde das Fell bis zum Unterkiefer geöffnet und die Speicheldrüsen am Hals zur Seite geklappt, damit die Trachea vom umliegenden Muskelschlauch befreit werden konnte. Um die freiliegende Trachea wurde anschließend

eine Ligatur gelegt und über einen Schnitt in die Trachea wurde ein Tubus eingeführt und eingebunden. Über diesen Trachealtubus wurde die Lunge mit der flüssigen Agaroselösung komplett ausgefüllt. Daraufhin wurde der Trachealtubus entfernt und gleichzeitig die Ligatur gezogen, wodurch die fixierte Lunge aus dem Körper herauspräpariert werden konnte. Um die noch flüssige Agaroselösung zu festigen, wurde die Lunge in 4 °C kalte PBS gelegt. Anschließend wurde das Herz, die Aorta und die Trachea von der Lunge entfernt und die fünf verschiedenen Lungenlappen mit der Drei-Scheren-Technik zerkleinert und mehrfach in PBS mit einem magnetischen Konzentrierer gewaschen. Die so erworbenen Gewebestücke wurden in 37 °C warmer Kollagenaselösung (80 Unit/ml; Sigma-Aldrich, USA) für 1 h inkubiert und daraufhin mit 15 G und 18 G Kanülen weiter zerkleinert und mit Hilfe des magnetischen Konzentrierers (Invitrogen, USA) von den Gefäßen, die mit Eisenpartikeln gefüllt waren, separiert. Die Zersetzung durch die Kollagenase wurde durch das Waschen mit warmen Medium 199 + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin gestoppt (siehe Tab. 6; Malczyk, 2017). Schließlich wurden die isolierten PSMCs in SMC Medium + 15 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin (siehe Tab. 6) auf Zellkulturschalen mit Glasboden (35/10 mm, Greiner Bio-One, Deutschland) ausgesät und dort für 5-6 Tage kultiviert, bevor sie für die *Patch Clamp*-Versuche verwendet wurden. Für die Versuche wurden jedoch nur Zellen verwendet, die in einem nicht kontrahierten oder nur teilweise kontrahierten Zustand waren und die eine spindelförmige Morphologie aufwiesen. Demnach wurden runde und vollständig kontrahierte Zellen von den Versuchen ausgeschlossen.

Tabelle 6. Komponenten der verwendeten Zellkultur-Medien.

<u>Substanz</u>	<u>Firma</u>
Medium 199	Gibco, Life Technologies, USA
<i>smooth muscle cell basal medium</i> (SMC Medium)	PromoCell, USA
Fetales bovines Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, USA
Penicillin	Gibco, Life Technologies, USA
Streptomycin	Gibco, Life Technologies, USA

2.4.3 Messung der *Whole Cell*-Ionenströme

Da eine *Patch Clamp*-Messung sehr stör anfällig ist, befand sich der ganze Messaufbau auf einem schwingungsgedämpften Labortisch und dieser befand sich wiederum in einem Faraday'schen Käfig, der die Messung vor elektromagnetischen Strahlungen schützte. Zudem wurden alle Bestandteile des Messaufbaues geerdet. Während der Experimente wurden die

Zellen kontinuierlich mit einer vorbeheizten (37 °C) extrazellulär-analogen Badlösung perfundiert (0,5 ml/min; siehe Tab. 7). Dies geschah unter Verwendung eines durch Schwerkraft getriebenen Perfusionssystems, in Kombination mit einem Perfusionseinsatz für Zellkulturschalen (Warner Instruments, USA). Die Badlösung wurde entweder mit einem normoxischem (21 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂; Linde, Deutschland) oder hypoxischem (1 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂; Linde, Deutschland) Gasgemisch begast, wodurch zusätzlich der pH auf 7,4 eingestellt wurde.

Tabelle 7. Verwendete Substanzen für die extrazellulär-analoge Badlösung.

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Firma</u>
Natriumchlorid	126,7	Sigma-Aldrich, USA
Kaliumchlorid	5,4	Carl Roth, Deutschland
Calciumchlorid	1,8	Carl Roth, Deutschland
Magnesiumchlorid	1,1	Carl Roth, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	0,4	Carl Roth, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	22,0	Carl Roth, Deutschland
Glukose	10,0	Carl Roth, Deutschland

In der Nähe der Zelle wurde der Sauerstoffpartialdruck (PO₂) mit einem optischen, nadelartigen Sauerstoffsensor (Firesting, Pyro Science, Deutschland) gemessen. Mit einem DMZ Universal-Elektrodenzieher (Zeitz, Deutschland) wurden feuerpolierte *Patch*-Pipetten mit einem Spitzenwiderstand von 3-5 MΩ aus Borosilikatglas-Kapillarröhrchen (Sutter Instruments, Novato, USA) gezogen und mit einer intrazellulär-analogen Lösung (pH eingestellt auf 7,2; siehe Tab. 8) befüllt.

Tabelle 8. Verwendete Substanzen für die intrazellulär-analoge Lösung.

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Firma</u>
Natriumchlorid	4,0	Sigma-Aldrich, USA
Kaliumchlorid	25,0	Carl Roth, Deutschland
Kaliumaspartat	105,0	Sigma-Aldrich, USA
Magnesiumchlorid	1,0	Carl Roth, Deutschland
Magnesium-Adenosintri-phosphat	4,0	Sigma-Aldrich, USA
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	10,0	Carl Roth, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	10,0	Carl Roth, Deutschland

Alle *Patch Clamp*-Experimente wurden in der *Whole Cell*-Konfiguration, unter der Verwendung eines EPC10 USB-Einzelverstärkers (HEKA, Deutschland), der von der Patchmaster-Software (HEKA, Deutschland) gesteuert wurde, durchgeführt. Die Daten wurden bei 2,9 kHz gefiltert und bei 100 Hz (Stromklemme) bzw. 1 kHz (Spannungsklemme) aufgezeichnet. Das experimentell bestimmte Flüssigkeitspotential (*liquid junction potential*) (+12,4 mV/Stromklemme oder +3,9 mV/Spannungsklemme) wurde elektronisch korrigiert. Zur Analyse wurden Fitmaster (HEKA, Deutschland) und die IGOR Pro 6.37 Software (Wavemetrics, USA) verwendet. Das Membranpotential wurde dabei sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie im Stromklemmmodus ($I = 0$) aufgezeichnet. Die Stabilität des Membranpotentials wurde für mindestens 1 min bestimmt, bevor die Aufzeichnung begonnen wurde. In den Experimenten mit 5,6-EET wurde K^+ (KCl oder K^+ -Aspartat) in der intra- und extrazellulären Lösung durch die äquivalente Menge an Cäsium (CsCl, Sigma-Aldrich) getauscht, um K^+ -Ionenströme zu inhibieren. 5,6-EET (1,5 μ M) wurde vor dem Experiment in der Badlösung gelöst und über das Perfusionssystem in die Messkammer gegeben. Die 5,6-EET-induzierten Veränderungen der Ionenströme über die Membran wurden bei Haltepotentialen von -40 mV bzw. -20 mV gemessen.

2.5 mRNA- und Protein-Expressionsanalysen

2.5.1 *Real-Time* PCR

Um die mRNA-Expression von der löslichen Epoxidhydrolase (Ephx2) und von CYP2J5, CYP2J6, CYP2J8, CYP2J9, CYP2J11, CYP2J12 und CYP2J13 in isolierten IPAs der Maus zu untersuchen, wurde zunächst die RNA aus den IPAs isoliert und daraufhin in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden die IPAs in 2 ml Röhrchen, in denen sich Keramikkügelchen (PepqLab, Deutschland) und 300 μ l RLT-Puffer (Qiagen, Niederlande) befand, mit dem Homogenizer Precellys 24 (PepqLab, Deutschland) 2-mal für 30 sec homogenisiert. Daraufhin wurde die mRNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers aus den homogenisierten IPAs isoliert. Die isolierte RNA wurde im Verhältnis 200 ng in 1 μ l RNase-freiem Wasser (Gibco, USA) gelöst und durch reverse Transkription mit Hilfe des iSCRIPT cDNA Synthesis Kit (Bio RAD, Deutschland) unter den folgenden Konditionen in cDNA umgeschrieben: Vorbereitung bei 25 °C für 5 min, Reverse Transkription bei 46 °C für 20 min, Inaktivierung der reversen Transkription bei 95 °C für 1 min. Schließlich wurde die relative Quantifizierung der mRNA-Expression der CYP2J-Isoformen und der Ephx2 mittels *Real-Time* PCR erfasst. Dafür wurde der iTaq SYBR Green Supermix nach Herstellerangaben (Bio-RAD, Deutschland) verwendet. Pro Ansatz wurden 5 μ l iTaq SYBR Green Supermix, 0,5 μ l *forward* und 0,5 μ l *reverse* Primer (Metabion, Deutschland), 3,5 μ l RNase-freies

Wasser und 1 µl cDNA zusammengemischt. Für jeden Versuch wurde eine Negativkontrolle angesetzt, in der keine cDNA hinzugefügt wurde. Die benötigten Primer wurden mit Hilfe der Sequenzinformationen in der Datenbank vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA) designt (siehe Tab. 9). Die *Real-Time* PCR wurde mit dem CFX Connect PCR System (Bio-RAD, Deutschland) unter folgenden Konditionen durchgeführt: 95 °C für 5 min, 95 °C für 10 sec, 60 °C für 10 sec, 72 °C für 10 sec und 95 °C für 30 sec, dann 45 Zyklen bei 65 °C für 30 sec. Um die Spezifität der amplifizierten Fragmente zu überprüfen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Schmelztemperatur hängt dabei von der Länge der Fragmente ab und somit gibt die Schmelzkurve Auskunft über die Größe der amplifizierten Fragmente. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass nur das gewünschte PCR-Produkt vervielfältigt wurde. Die erhaltenen Ct-Werte der zu untersuchenden mRNA-Expressionen wurden zu der Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Die relativen Veränderungen der mRNA-Expression wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet (Haimes und Kelley, 2010).

Tabelle 9. Primersequenzen für die *Real-Time* PCR.

Gen	<i>Forward</i> (5´ - 3´)	<i>Reverse</i> (5´ - 3´)
CYP2J5	GGGTGAACAGAGACAACATCC	GACAAGCTCACCTGCCTCTTG
CYP2J6	TGGTCATAACTGGACTGCCCT	GCTCCTTCCATATTTGGCCACT
CYP2J8	TTGGGGATCCAGCCGTTTGT	TGAGCCTCATCCTGTATGCGT
CYP2J9	TACCTTCAAGCCCCAGTCAA	CAAATGGGAGCAGACACCAGT
CYP2J11	GGAAAGAGAGCTTGCCCTGG	ACTTCAGGCTCGGCTTCTCA
CYP2J12	ATGCTTGCTACTGAGGACACC	GGGTCCTGGTGGGTAGTTCTT
CYP2J13	GTCACTGAGCCACTGCCATA	AAGTAGGCAGGAAGCACACTG
Ephx2	CTGTGGCCAGTTTGAACACG	GGCCACTCCTGGTTCTTGAAA
GAPDH	TGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	TGAATTTGCCGTGAGTGGAG

2.5.2 Western Blot

Um die Proteinkonzentration der CYP-Enzyme in den IPAs aus Mäusen zu untersuchen, wurden unter Mithilfe von Claudia Garcia Western Blots mit Proteinen aus Homogenaten von isolierten IPAs und den Geweben, die als Kontrolle dienten (Leber, Niere, Milz und Skelettmuskel der Maus; Zhou *et al.*, 2013; Graves *et al.*, 2015), durchgeführt. Dafür wurden die Gewebe in Zellyse-Puffer, der 1 mM PMSF (ein Serin-Protease-Inhibitor, beides von Cell Signaling Technology, Großbritannien) enthielt, lysiert und mit Hilfe vom Precellys Glass Kit

(2,8 mm) und dem Homogenizer Precellys 24 (Peqlab, Deutschland) homogenisiert. Daraufhin wurden die Proben für 15 min auf Eis gestellt, bevor sie bei 21910 g (14000 rpm) für 10 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Um die Proteinkonzentration des Überstandes zu bestimmen, wurde ein spektrophotometrischer Assay (BCA Assay, Pierce, USA) verwendet. Daraufhin wurden für die Western Blot Analysen 30 µg/µl der Proteine mit 4 x Laemmli-Probenpuffer (BioRad, USA) und β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA) im Verhältnis 1:10 versetzt und für 5 min auf 96 °C erhitzt. Daraufhin wurden die Proben mit Hilfe einer *Sodium Dodecyl Sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Bio Rad, USA) aufgetrennt. Dafür wurden 12 %ige Trenngele und 5 %ige Sammelgele hergestellt (siehe Tab. 10).

Tabelle 10. Zusammensetzung der selbst hergestellten Gele. Der Tris-Puffer bestand aus Tris-BASE gelöst in dH₂O.

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration Sammelgel</u>	<u>Konzentration Trenngel</u>	<u>Firma</u>
dH ₂ O	5,7 ml	3,4 ml	Millipore, Deutschland
30 %iges Acrylamid	1,7 ml	4,0 ml	Serva, Deutschland
Tris-Puffer	2,5 ml (0,5 M)	2,5 ml (1,5 M)	Carl Roth, Deutschland
10 %iges SDS	0,1 ml	0,1 ml	Carl Roth, Deutschland
TEMED	1,0 µl	0,5 µl	Carl Roth, Deutschland
APS	5,0 µl	5,0 µl	Sigma-Aldrich, USA

Nachdem die Proben und der Marker (Precision Plus Protein TM Standard, Bio Rad, USA) auf die Gele aufgetragen wurden, wurde die Gelelektrophorese in 1-fach Laufpuffer (siehe Tab. 11) mit den Parametern 120 V, 400 mA, 150 W für 2 h gestartet. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine durch die sogenannte *Semi-dry*-Technik mit Hilfe eines Transferpuffers (siehe Tab. 11) auf eine 0,45 µm dicke Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF; Bio Rad, USA) übertragen. Dies geschah bei 100 V, 115 mA und 150 W für 75 min. Die Membran wurde daraufhin in einer Lösung mit 6 %iger Magermilch (Sigma-Aldrich, USA) in Waschpuffer (siehe Tab. 11) mit 0,1 % Tween20 (Sigma-Aldrich, USA) für 1 h geblockt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Antikörper gegen das humane Cytochrom-P450-2J2 (Abcam, Deutschland) in einer Konzentration 1:500 oder mit dem Antikörper gegen GAPDH (Biolegend, USA) in einer Konzentration von 1:1000 inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen, bevor sie für 1 h mit einem mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem sekundärem Antikörper (Pro-mega, USA) in der Konzentration 1:5000 in Raumtemperatur inkubiert wurde. Dieser Anti-

körper wurden ebenfalls in dem mit Milch angesetzten Puffer gelöst. Schließlich wurde die Membran fünfmal für 5 min gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch eine Chemilumineszenzreaktion mit dem ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Großbritannien) und dem ChemiDoc Touch Imaging System (Bio Rad, USA). Um die Membran mit einem weiteren Antikörper inkubieren zu können, wurde diese für 1 h in einer *Stripping*-Lösung (siehe Tab. 11) inkubiert und daraufhin zweimal für 5 min gewaschen, bevor sie mit einem neuen Antikörper hybridisiert wurde.

Tabelle 11. Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Western Blot-Experimente.

<u>Puffer</u>	<u>Substanz</u>	<u>Menge</u>	<u>Firma</u>
Laufpuffer (10X)	Tris-BASE	30,3 g	Carl Roth, Deutschland
	Glycin	144,0 g	Carl Roth, Deutschland
	SDS	1,0 %	Carl Roth, Deutschland
	dH ₂ O	1000,0 ml	Millipore, Deutschland
Transferpuffer	Tris-BASE	11,6 g	Carl Roth, Deutschland
	Glycin	5,8 g	Carl Roth, Deutschland
	SDS 20 %	3,7 ml	Carl Roth, Deutschland
	Methanol	400,0 ml	SAV Liquid Production, Deutschland
	dH ₂ O	2000,0 ml	Millipore, Deutschland
Waschpuffer (pH 7,5)	Tris-BASE	24,2 g	Carl Roth, Deutschland
	NaCl	88,6 g	Carl Roth, Deutschland
	Tween20	1,0 ml	Sigma-Aldrich, USA
	dH ₂ O	1000,0 ml	Millipore, Deutschland
<i>Stripping</i> -Lösung	Glycin	0,8 g	Carl Roth, Deutschland
	37 %ige HCl	1,0 ml	Carl Roth, Deutschland
	dH ₂ O	90,0 ml	Millipore, Deutschland

2.6 Auswertung der Daten und Statistik

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung von Prism 6 (GraphPad Software Inc., USA) durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Normalverteilung der Proben wurde mit dem Shapiro-Wilk Normalitätstest getestet. Vergleiche wurden unter Verwendung von Student-t-Test, Mann-Whitney-U Test, *one-way* und *two-way* ANOVA mit Sidak-Korrektur für mehrere Vergleiche, wie geeignet, durchgeführt. Der Unterschied wurde bei * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ als statistisch signifikant angesehen. Die Einzelexperimente sind durch „n“ angegeben. Für die Experimente wurden mindestens 3 verschiedene Mäuse verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Reaktion von pulmonalen Arterien aus Mäusen auf Hypoxie

3.1.1 Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von verschiedenen Generationen der pulmonalen Arterien aus Mäusen

Um die HPV in dem pulmonalen Gefäßsystem zu charakterisieren, wurden Myographie-Experimente mit kleinen und großen intrapulmonalen Arterien (IPAs) und extrapulmonalen Arterien (EPAs) durchgeführt (siehe Abb. 8). Zu Beginn jedes Experimentes wurde die Vitalität der Gefäße durch die Applikation von KPSL überprüft. Zudem wurde das Experiment entweder ohne ein *pretone* durchgeführt oder es wurde vor der 80-minütigen Inkubation mit Hypoxie (1 % O₂)/Normoxie (21 % O₂) durch 15-20 mM KCl- bzw. durch 1-3 nM U46619 ein *pretone* induziert.

In extrapulmonalen Arterien (EPAs; 500-700 µm im Durchmesser; siehe Abb. 8) führte die Applikation von KPSL zu einer deutlichen Kontraktion auf bis zu $3,8 \pm 0,1$ mN. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Tonus nach der 80-minütigen Inkubation mit Normoxie, ohne vorheriger Applikation eines KCl- bzw. U46619-induzierten *pretones*, festgestellt werden ($0,5 \pm 0,9$ % T_K nach 80 min). Unter Hypoxie wurde jedoch eine signifikante Verringerung der Wandspannung erkennbar (auf $-4,4 \pm 2,2$ % T_K nach 80 min; $p < 0,05$; siehe Abb. 9. A). In EPAs, in denen ein *pretone* mit KCl induziert wurde, erhöhte sich die Wandspannung langsam während der 80-minütigen Inkubation mit Normoxie auf bis zu $20,8 \pm 3,2$ % T_K. Unter Hypoxie erhöhte sich die Wandspannung in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretones* nach 80 min auf $26,2 \pm 10,3$ % T_K. Dabei war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar (siehe Abb. 9. B). Im Vergleich dazu erhöhte sich die Wandspannung von EPAs, in denen ein *pretone* mit U46619 induziert wurde, nur geringfügig unter Normoxie bis auf $8,4 \pm 6,9$ % T_K. Unter Hypoxie verringerte sich die Wandspannung in den mit U46619 vorstimulierten EPAs auf $3,5 \pm 5,4$ % T_K, allerdings waren die Werte nicht signifikant unterschiedlich zu denen unter Normoxie (siehe Abb. 9. C). Demnach induzierte Hypoxie in Abwesenheit eines *pretones* eine geringe, aber signifikante Dilatation der Maus EPAs, jedoch nicht in Anwesenheit eines KCl- oder U46619-induzierten *pretones*.

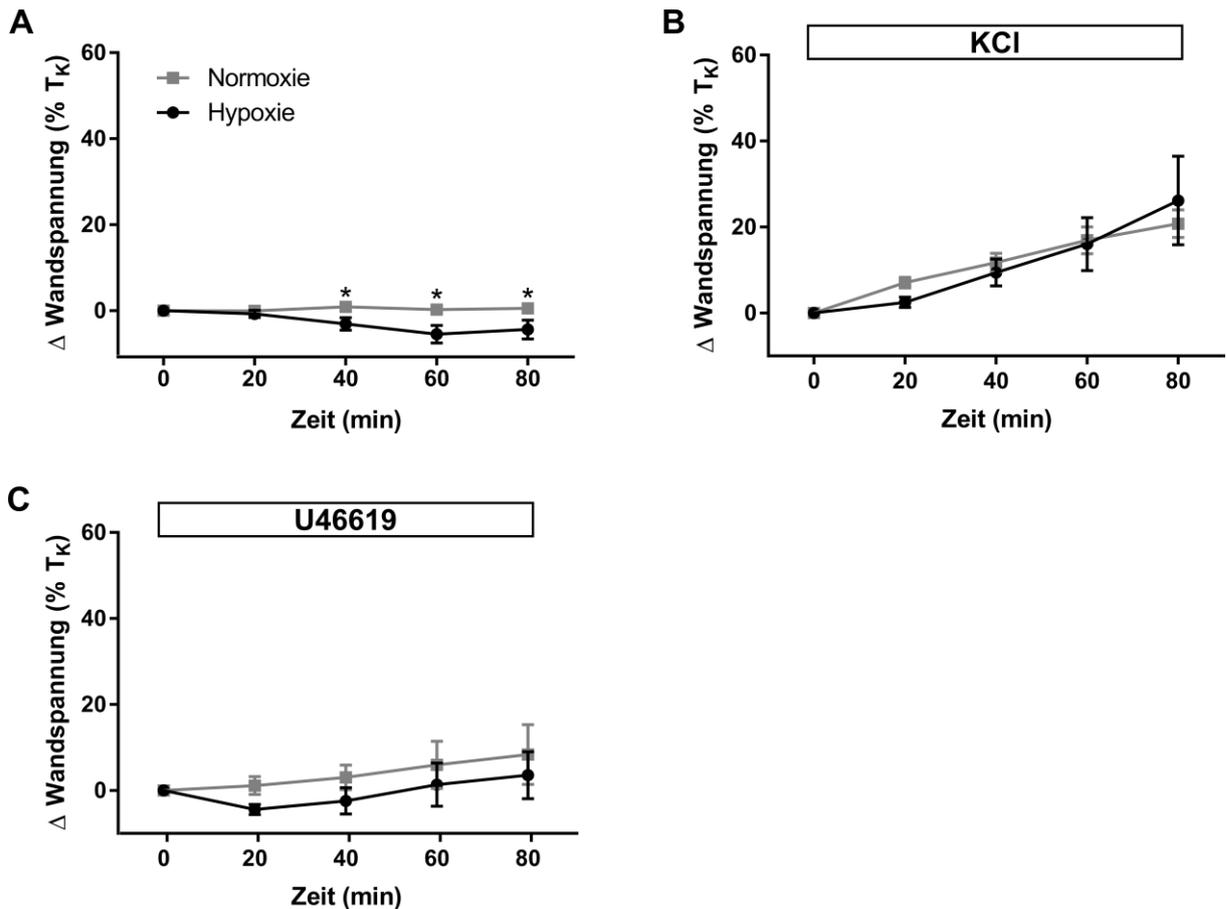


Abbildung 9. Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von extrapulmonalen Arterien (500-700 μm im Durchmesser). Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie ohne *pretone* (A), mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM) (B) und mit U46619-induziertem *pretone* (1-3 nM) (C). $n = 6$ pro Gruppe. * $p < 0,05$ für Hypoxie vs. Normoxie.

In großen intrapulmonalen Arterien (IPAs; 450-650 μm im Durchmesser; siehe Abb. 8) führte die Applikation von KPSL zu Beginn der Experimente zu einer deutlichen Kontraktion auf bis zu $3,4 \pm 0,1$ mN. Der Tonus von großen IPAs veränderte sich ohne *pretone* nach 80-minütiger Inkubation weder unter Normoxie ($-2,8 \pm 0,8$ % T_K), noch unter Hypoxie ($-1,3 \pm 2,9$ % T_K; siehe Abb. 10. A). In großen IPAs, die mit KCl vorstimuliert wurden, erhöhte sich die Wandspannung während der 80-minütigen Inkubation mit Normoxie auf $15,1 \pm 3,2$ % T_K und unter Hypoxie auf $18,4 \pm 5,1$ % T_K. Die Gruppen waren nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abb. 10. B). In Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s kontrahierten die großen IPAs verstärkt, sowohl unter Normoxie ($31,5 \pm 4,2$ % T_K nach 80 min) als auch unter Hypoxie ($34,4 \pm 4,4$ % T_K nach 80 min). Auch dort gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (siehe Abb. 10. C). Demnach hatte Hypoxie keinen Effekt auf den Tonus von großen IPAs.

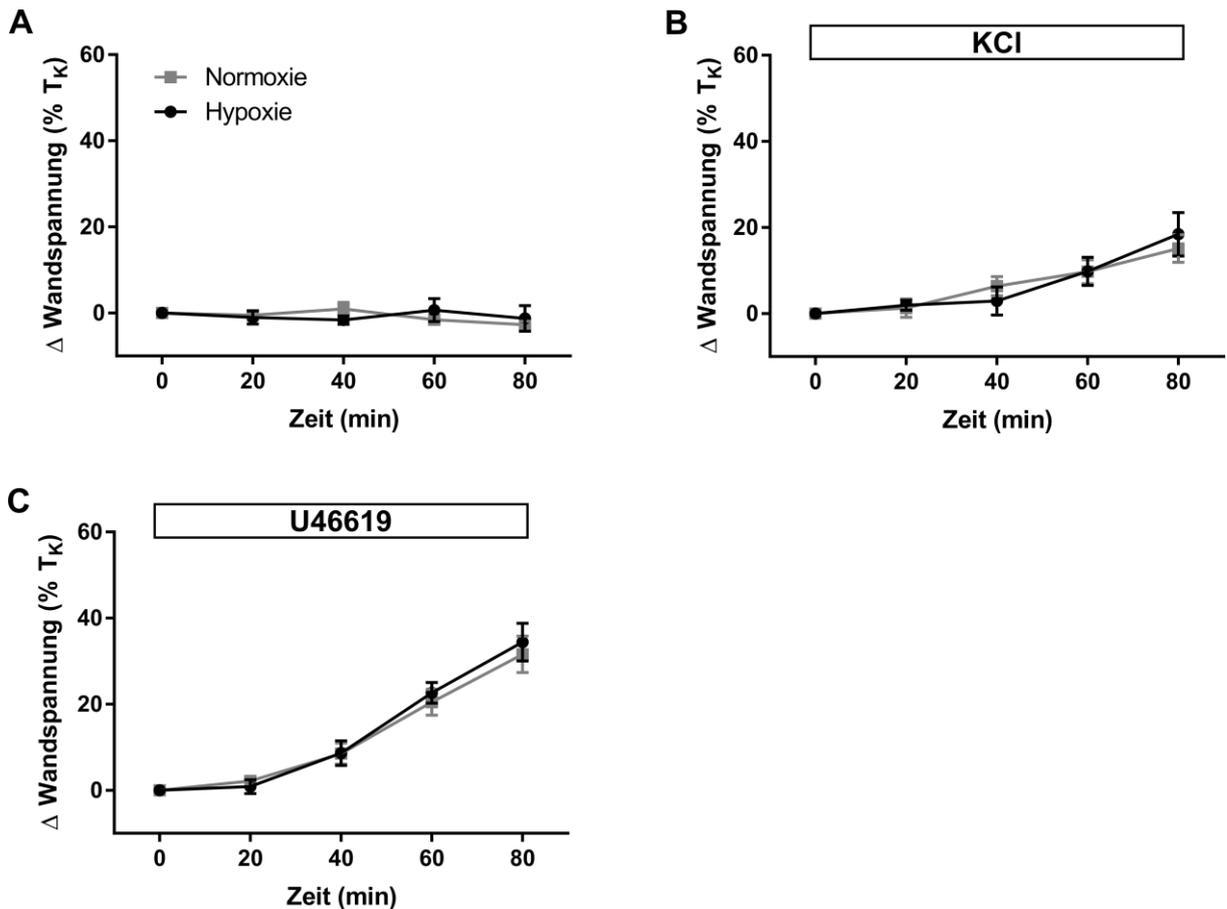


Abbildung 10. Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von großen intrapulmonalen Arterien (450-650 μm im Durchmesser). Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie ohne *pretone* (A), mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM) (B) und mit U46619-induziertem *pretone* (1-3 nM) (C). $n = 8$ pro Gruppe.

In kleinen IPAs (80-200 μm im Durchmesser; siehe Abb. 8) führte die Applikation von KPSL zu Beginn der Experimente zu einer deutlichen Kontraktion auf bis zu $3,3 \pm 0,0$ mN. Die kleinen, unstimulierten IPAs wiesen nach 80-minütiger Inkubation mit Normoxie eine Wandspannung von $2,6 \pm 0,9$ % T_K auf. Unter Hypoxie kontrahierten die kleinen IPAs monophasisch auf $16,2 \pm 2,6$ % T_K nach 80 min, somit waren die Gruppen signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$; siehe Abb. 11. C). Die Kontraktion der kleinen IPAs unter Hypoxie wurde durch einen KCl-induzierten *pretone* verstärkt. Die Wandspannung betrug nach der 80-minütigen Inkubation unter Hypoxie $48,1 \pm 4,3$ % T_K und war signifikant höher im Vergleich zu der Wandspannung unter Normoxie in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s. Diese betrug $7,2 \pm 1,4$ % T_K ($p < 0,001$, siehe Abb. 11. A, B, D). Nach der 80-minütigen Inkubation unter Hypoxie (ohne *pretone* oder mit KCl-induziertem *pretone*) führte die Umstellung auf Normoxie in den kleinen IPAs zu einem Beenden der monophasischen Kontraktion und teilweise zu einer geringen Dilatation (siehe Abb. 11. A, B). Die Wandspannung von den

mit U46619 vorstimulierten kleinen IPAs war nicht stabil unter Normoxie. Sie erhöhte sich nach der 80-minütigen Inkubation auf $22,4 \pm 4,0$ % T_K . Eine ähnliche Erhöhung der Wand-

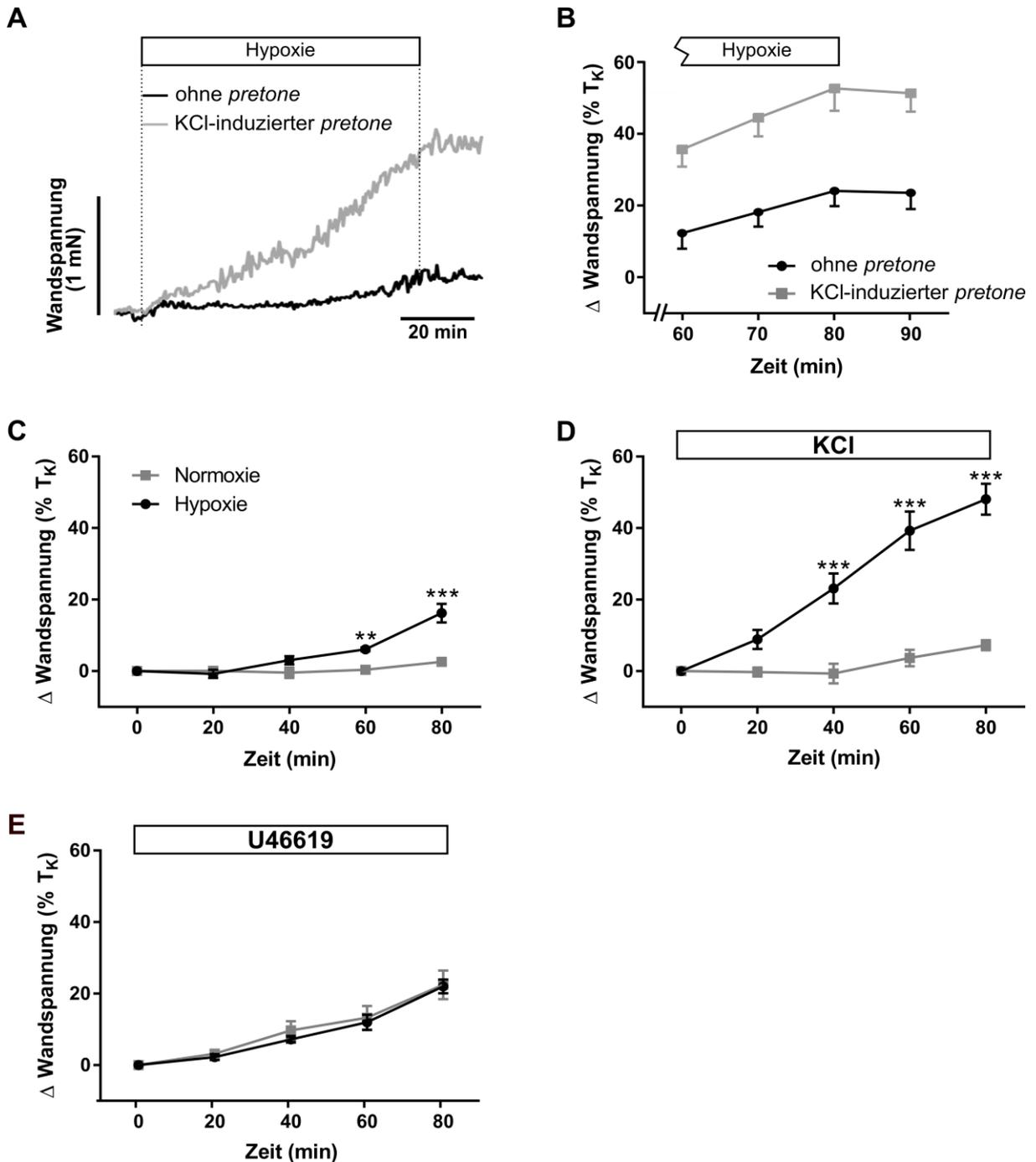


Abbildung 11. Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von kleinen intrapulmonalen Arterien (80-200 μm im Durchmesser). **A)** Repräsentativer Verlauf der Wandspannung über 80 min Hypoxie ohne *pretone* und mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM). **B)** Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung auf Grund der Umstellung auf Normoxie nach 80 min Hypoxie ohne *pretone* und mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM). $n = 6$ pro Gruppe. Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie ohne *pretone* (**C**), mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM) (**D**) und mit U46619-induziertem *pretone* (1-3 nM) (**E**). $n = 8$ pro Gruppe in C-E. ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ für Hypoxie vs. Normoxie.

spannung konnte unter Hypoxie beobachtet werden (auf $22,0 \pm 1,9 \% T_K$). Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (siehe Abb. 11. E). Auf Grund dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass Hypoxie lediglich in den kleinen IPAs aus Mäusen eine monophasische Kontraktion auslöst und diese Kontraktion wird durch einen KCl-induzierten *pretone* verstärkt. Für die weiteren Untersuchungen wurden lediglich die kleinen IPAs verwendet.

3.1.2 Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen nach Entfernung des Endothels

Die nächsten Experimente sollten Aufschluss darüber geben, ob die Kontraktion der kleinen IPAs aus Mäusen unter Hypoxie vom Endothel abhängig ist. Dafür wurde vor den Experimenten das Endothel von den kleinen IPAs entfernt. Um die erfolgreiche Entfernung des Endothels (-E) zu überprüfen, wurde die Reaktion auf $10 \mu\text{M}$ Acetylcholin der IPAs untersucht, in denen ein $3 \mu\text{M}$ Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induzierter *pretone* appliziert wurde. Dabei konnte nach der Applikation von Acetylcholin eine signifikante Dilatation von intakten IPAs festgestellt werden (auf $-25,0 \pm 2,0 \% T_K$), während die -E IPAs keine Reaktion auf Acetylcholin zeigten ($0,5 \pm 1,5 \% T_K$; $p < 0,001$; siehe Abb. 12. B). Die darauffolgenden Experimente zeig-

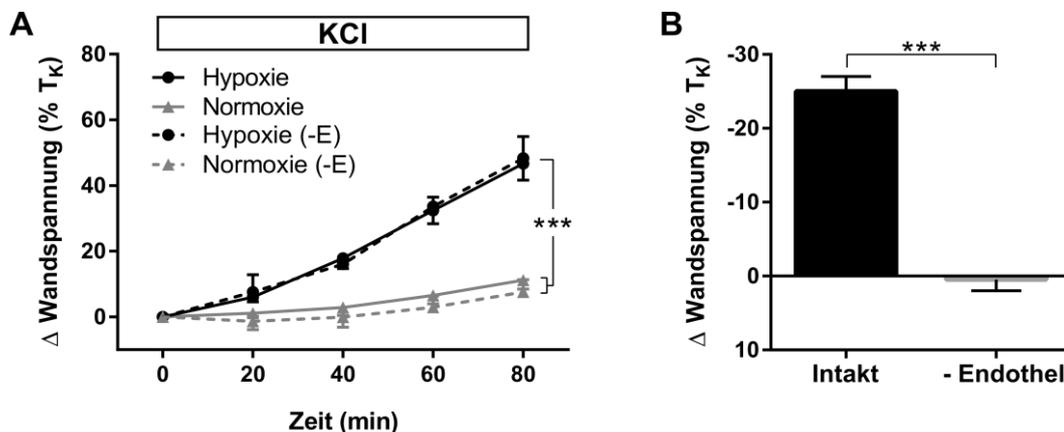


Abbildung 12. Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen nach Entfernung des Endothels. **A)** Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung von IPAs nach Entfernung des Endothels (-E) oder von intakten IPAs über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s (15-20 mM). $n = 6$ für IPAs -E; $n = 8$ für intakte IPAs. **B)** Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung von IPAs nach Entfernung des Endothels und von intakten IPAs nach der Applikation von Acetylcholin ($10 \mu\text{M}$) in Anwesenheit eines Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induzierten *pretone*s ($3 \mu\text{M}$). $n = 12$ pro Gruppe. *** $p < 0,001$.

ten, dass –E IPAs, in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*, auf protrahierte Hypoxie mit einer signifikanten Erhöhung der Wandspannung reagierten ($48,3 \pm 6,6$ % T_K unter Hypoxie vs. $7,6 \pm 3,8$ % T_K unter Normoxie nach 80 min; $p < 0,001$), die sich nicht von der Kontraktion der intakten IPAs unterschied ($46,6 \pm 5,0$ % T_K unter Hypoxie vs. $11,2 \pm 2,7$ % T_K unter Normoxie nach 80 min; $p < 0,001$; siehe Abb. 12. A). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Endothelzellen keinen signifikanten Beitrag für die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen leisten.

3.1.3 Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus TRPC6^{-/-} Mäusen

In der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge führt Hypoxie zu einer biphasischen HPV, mit einer akuten und einer protrahierten Phase (Weissmann *et al.*, 2006). In einer vorherigen Studie wurde gezeigt, dass die akute HPV in Lungen von TRPC6^{-/-} Mäusen nicht vorhanden ist, während die protrahierte Phase der HPV keinen signifikanten Unterschied zu der Reaktion von Wildtyp Mäusen aufweist (Weissmann *et al.*, 2006). Um heraus zu finden, ob die beobachtete monophasische Kontraktion in den kleinen IPAs aus Mäusen der protrahierten HPV in der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge entspricht, wurden Myographie-Experimente mit IPAs von TRPC6^{-/-} Mäusen durchgeführt. Die Wandspannung von TRPC6^{-/-} IPAs war während der 80-minütigen Inkubation mit Normoxie ohne

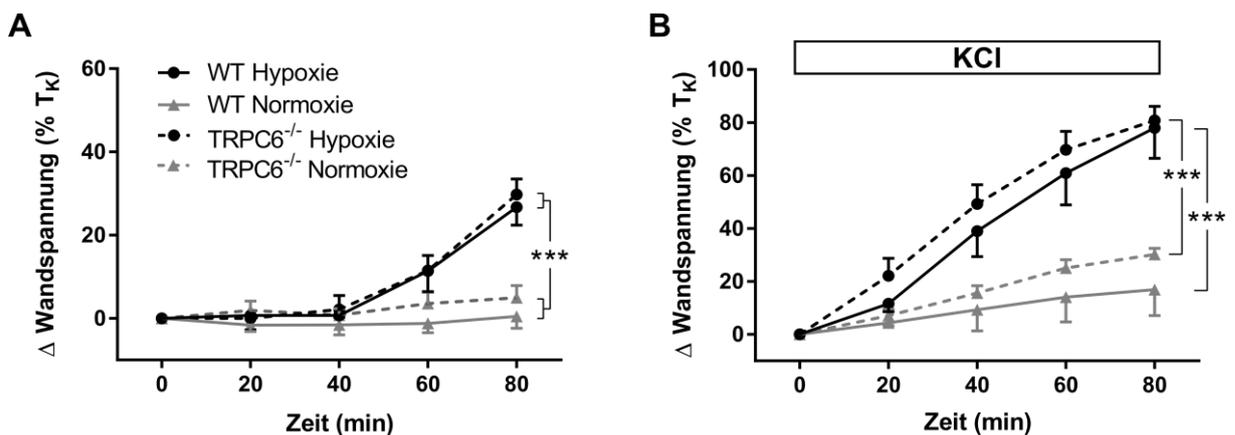


Abbildung 13. Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus TRPC6^{-/-} Mäusen. Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung von IPAs aus TRPC6^{-/-} und WT Mäusen über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie ohne *pretone* **(A)** und mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM) **(B)**. $n = 8$ für TRPC6^{-/-} Hypoxie; $n = 6$ für alle anderen Gruppen. *** $p < 0,001$.

pretone stabil und nicht signifikant unterschiedlich zu der Wandspannung der WT IPAs ($5,0 \pm 3,0$ % T_K von TRPC6^{-/-} IPAs vs. $0,5 \pm 2,8$ % T_K von WT IPAs nach 80 min). Allerdings erhöhte sich die Wandspannung tendenziell geringfügig in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s, dies war jedoch nicht statistisch signifikant ($30,2 \pm 2,2$ % T_K von TRPC6^{-/-} IPAs vs. $16,9 \pm 9,8$ % T_K von WT IPAs nach 80 min). Die Ergebnisse zeigen zudem, dass IPAs von TRPC6^{-/-} Mäusen eine signifikante monophasische Kontraktion unter Hypoxie aufweisen, die sich nicht von der HPV in den IPAs der entsprechenden Wildtyp Wurfgeschwister unterscheidet. Dies war bereits bei Experimenten ohne *pretone* deutlich ($29,8 \pm 3,7$ % T_K von TRPC6^{-/-} IPAs vs. $26,7 \pm 4,3$ % T_K von WT IPAs nach 80 min Hypoxie) und wurde zudem in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s bestätigt ($80,1 \pm 5,3$ % T_K von TRPC6^{-/-} vs. $78 \pm 11,5$ % T_K von WT IPAs; siehe Abb. 13). Die generierten Daten sprechen dafür, dass die beobachtete Kontraktion von kleinen IPAs aus Mäusen unter Hypoxie der protrahierten Phase der HPV entspricht.

3.2 Der Effekt einer inhibierten EET-Synthese-/Degradation auf die protrahierte hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

3.2.1 Die Expression von CYP2J-Epoxygenase-Isoformen in kleinen IPAs aus Mäusen

Nachdem festgestellt wurde, dass nur kleine IPAs aus Mäusen, im Gegensatz zu großen IPAs oder EPAs, auf eine langanhaltende Hypoxie mit einer protrahierten HPV reagieren, wurde im nächsten Schritt die Rolle von Epoxyeicosatriensäuren in der HPV untersucht. EETs werden durch Cytochrom-P450-Epoxygenasen gebildet. Die CYP2C- und CYP2J-Unterfamilienmitglieder dominieren die Synthese von EETs in verschiedenen Geweben, allerdings werden nahezu keine CYP2C-Isoformen in der Mäuselunge exprimiert (Daikh *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1996; Fer *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2004; Graves *et al.*, 2017). Um herauszufinden, ob EETs von kleinen IPAs aus Mäusen gebildet werden, wurde die Expression von CYP2J-Isoformen mittels *Real-Time* PCR und Western Blot untersucht. Anhand der *Real-Time* PCR-Ergebnissen ist zu sehen, dass die mRNA aller CYP2J-Epoxygenase-Isoformen, bis auf CYP2J8, in den kleinen IPAs aus Mäusen exprimiert wird. Dabei war die Expression von CYP2J9, CYP2J11, CYP2J12 und CYP2J13 relativ hoch, im Vergleich zu der geringen Expression von CYP2J5 und CYP2J6 (siehe Abb. 14. A). Da kein spezifischer Antikörper für die verschiedenen Maus CYP2J-Isoformen kommerziell erhältlich war, wurde der humane CYP2J2-Antikörper für die Western Blot-Experimente verwendet. Vorherige Studien haben gezeigt, dass der humane CYP2J2-Antikörper an alle murinen CYP2J-Proteine bindet, jedoch nicht an Proteine der anderen CYP-Unterfamilien. Dabei können, auf Grund der unter-

schiedlichen post-translationalen Modifikationen der verschiedenen CYP2J-Isoformen, multiple Banden auftreten (Ma *et al.*, 2002). Die Ergebnisse zeigen, dass in kleinen IPAs aus Mäusen CYP2J-Proteine gebildet werden (siehe Abb. 14. B). Um die Spezifität des CYP2J2-Antikörpers zu bestätigen, wurde dessen Immunreaktivität auch in anderen Geweben getestet. Immunreaktive Proteine konnten in der Niere und Leber aus Mäusen (Positiv-Kontrollen) detektiert werden, jedoch nicht in den Negativ-Kontrollen Milz und Muskel. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass der CYP2J2-Antikörper spezifisch mit den CYP2J-Isoformen in den IPAs aus Mäusen interagiert.

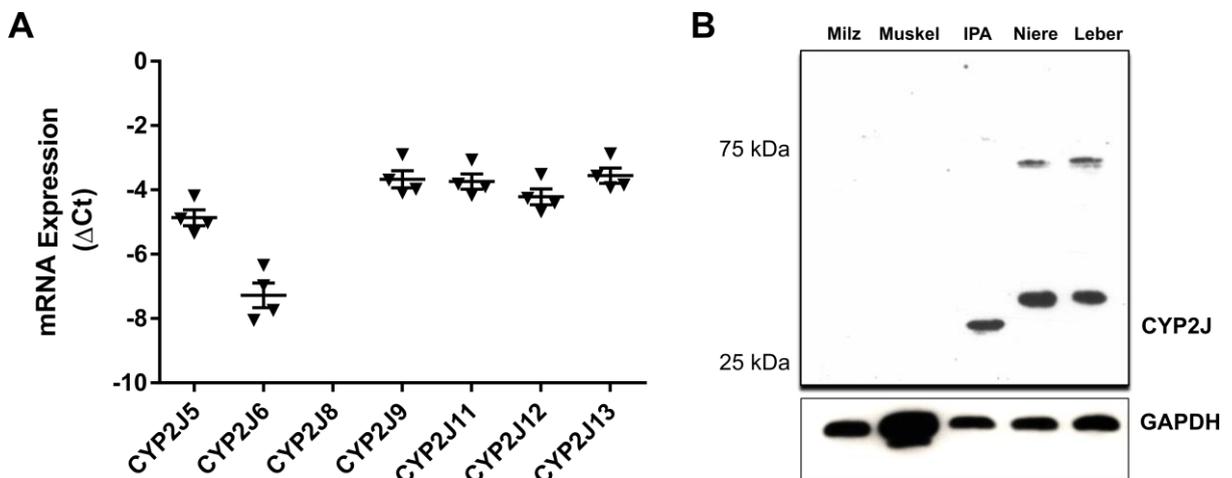


Abbildung 14. Die Expression von CYP2J-Epoxygenase-Isoformen in kleinen IPAs aus Mäusen. **A)** mRNA-Expression von CYP2J-Epoxygenase-Isoformen in kleinen IPAs aus Mäusen. $n = 4$ pro Gruppe. **B)** Repräsentativer Western Blot der CYP2J-Proteine in kleinen IPAs aus Mäusen. GAPDH: Referenzgen. Milz, Muskel: Negativ-Kontrolle. Niere, Leber: Positiv-Kontrolle.

3.2.2 Der Effekt des CYP-Epoxygenase-Inhibitors MS-PPOH auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen

Um die Rolle von EETs in der protrahierten HPV zu überprüfen, wurde der Effekt des CYP-Epoxygenase-Inhibitors MS-PPOH auf die Hypoxie-induzierte Kontraktion von kleinen IPAs aus Mäusen untersucht. Nach der 80-minütigen Inkubation mit 30 μM MS-PPOH und Normoxie ohne *pretone* unterschied sich die Wandspannung nicht signifikant von der Wandspannung der IPAs, welche lediglich mit dem für MS-PPOH verwendeten Lösungsmittel DMSO versetzt waren ($2,3 \pm 3,4$ % T_K vs. $0,5 \pm 3,0$ % T_K in der Kontrolle). Dies wurde auch in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s unter Normoxie beobachtet ($18,0 \pm 4,6$ % T_K vs. $11,2 \pm 2,7$ % T_K in der Kontrolle). Die protrahierte HPV war jedoch durch MS-PPOH signifikant um 66 % reduziert (auf $5,6 \pm 4$ % T_K vs. $17,5 \pm 4$ % T_K in der Kontrolle; $p < 0,01$;

siehe Abb. 15. A). Ein ähnlicher Effekt des Inhibitors wurde auch in Experimenten mit einem KCl-induziertem *pretone* beobachtet. Unter MS-PPOH erhöhte sich die Wandspannung nach 80 min Hypoxie lediglich auf $30,3 \pm 3,1$ % T_K , während sich die Wandspannung von den IPAs in der Kontrolle auf $46,6 \pm 5$ % T_K erhöhte ($p < 0,01$; siehe Abb. 15. B).

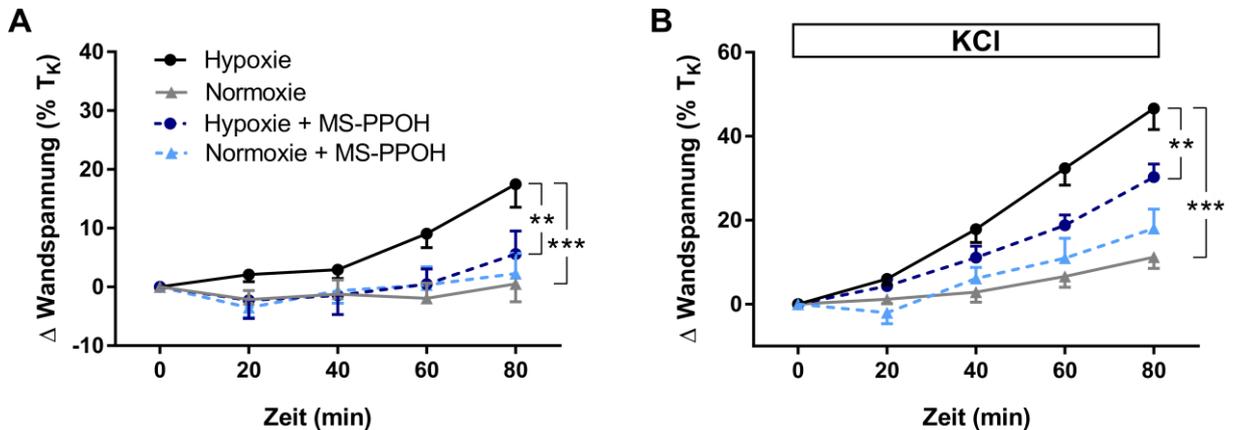


Abbildung 15. Der Effekt des CYP-Epoxygenase-Inhibitors MS-PPOH auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen. Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung von IPAs in An- oder Abwesenheit von MS-PPOH (30 μ M) über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie ohne *pretone* (A) und mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM) (B). In (A) $n = 7$ für Hypoxie; $n = 5$ für Normoxie; $n = 8$ für Hypoxie bzw. Normoxie + MS-PPOH. In (B) $n = 10$ für Hypoxie bzw. Normoxie; $n = 7$ für Hypoxie bzw. Normoxie + MS-PPOH. ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3.2.3 Der Effekt des EET-Antagonisten 14,15-EEZE auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen

Um die Involvierung des EET-Signalweges in der protrahierten HPV weiter zu untersuchen, wurde der EET-Antagonist 14,15-EEZE verwendet. Nach der 80-minütigen Inkubation mit 1,5 μ M 14,15-EEZE und Normoxie ohne *pretone* unterschied sich die Wandspannung nicht signifikant von den IPAs, die nicht mit 14,15-EEZE inkubiert waren ($-3,2 \pm 2,2$ % T_K vs. $0,5 \pm 3,0$ % T_K). Auch in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s gab es keine signifikanten Unterschiede in der Wandspannung unter Normoxie zwischen den Gruppen ($8,7 \pm 5,4$ % T_K mit 14,15-EEZE vs. $11,2 \pm 2,7$ % T_K in der Kontrolle). In Anwesenheit von 14,15-EEZE wurde jedoch die HPV komplett inhibiert. Die Wandspannung betrug dabei nach 80 min Hypoxie ohne *pretone* $-7,1 \pm 1,9$ % T_K , im Vergleich zu $17,5 \pm 3,9$ % T_K in der Kontrolle ($p < 0,001$; siehe Abb. 16. A). Mit einem KCl-induziertem *pretone* betrug die Wandspannung nach 80 min Hypoxie in Anwesenheit von 14,15-EEZE $9,1 \pm 6$ % T_K , im Vergleich zu $46,6 \pm 5,0$ % T_K in der Kontrolle. Demnach war die HPV in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s ebenfalls signifikant inhibiert ($p < 0,001$; siehe Abb. 16. B).

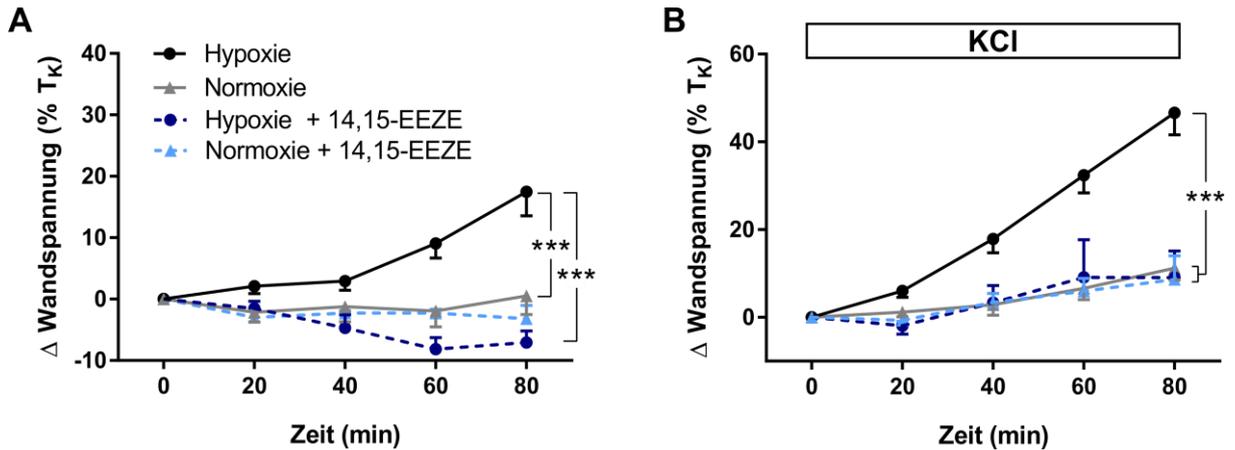


Abbildung 16. Der Effekt des EET-Antagonisten 14,15-EEZE auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen. Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung von IPAs in An- oder Abwesenheit von 14,15-EEZE (1,5 μ M) über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie ohne *pretone* (A) und mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM) (B). In (A) n = 7 für Hypoxie; n = 5 für Normoxie; n = 4 für Hypoxie bzw. Normoxie + 14,15-EEZE. In (B) n = 10 für Hypoxie bzw. Normoxie; n = 4 für Hypoxie bzw. Normoxie + 14,15-EEZE. *** p < 0,001.

3.2.4 Der Effekt des sEH-Inhibitors TPPU auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen

Darauffolgend wurde der Effekt von TPPU, einem Inhibitor für die lösliche Epoxidhydrolase, auf die protrahierte HPV untersucht. In den Experimenten unter Normoxie hatten 3 μ M TPPU weder in Abwesenheit eines *pretone*s (3,8 \pm 3,8 % T_K vs. 0,5 \pm 3,0 % T_K in der Kontrolle),

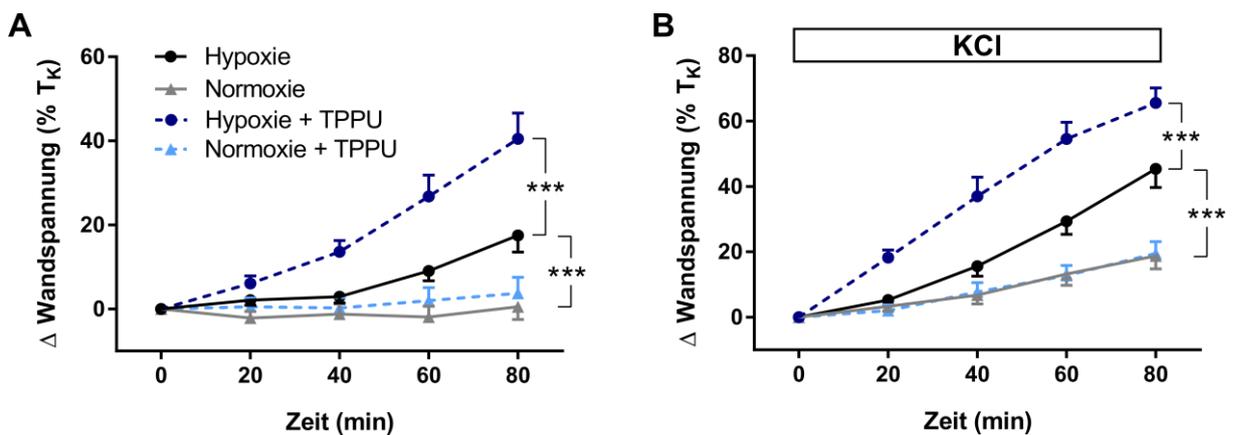


Abbildung 17. Der Effekt des sEH-Inhibitors TPPU auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen. Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung von IPAs in An- oder Abwesenheit von TPPU (3 μ M) über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie ohne *pretone* (A) und mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM) (B). In (A) n = 7 für Hypoxie; n = 5 für Normoxie; n = 7 für Hypoxie bzw. Normoxie + TPPU. In (B) n = 10 für Hypoxie bzw. Normoxie; n = 8 für Hypoxie + TPPU; n = 7 für Normoxie + TPPU. *** p < 0,001.

noch in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s ($19,5 \pm 3,6 \% T_K$ vs. $18,8 \pm 4,0 \% T_K$ in der Kontrolle) einen Effekt auf die Wandspannung. In Anwesenheit von TPPU wurde die HPV signifikant verstärkt. Die Wandspannung erhöhte sich nach 80 min Hypoxie in Anwesenheit von TPPU ohne *pretone* um über 100 % im Vergleich zu der Kontrolle ($40,5 \pm 6,1 \% T_K$ vs. $17,5 \pm 3,9 \% T_K$; $p < 0,001$; siehe Abb. 17. A). Ein ähnlicher Effekt von diesem Inhibitor wurde in Experimenten mit einem KCl-induziertem *pretone* beobachtet ($65,6 \pm 4,5 \% T_K$ vs. $45,4 \pm 5,7 \% T_K$ in der Kontrolle; $p < 0,001$; siehe Abb. 17. B).

3.2.5 Der Effekt von MS-PPOH, 14,15-EEZE und TPPU auf KCl- bzw. U46619-induzierte Kontraktionen von kleinen IPAs aus Mäusen

Um zu überprüfen, ob die verwendeten Inhibitoren spezifisch in den Signalweg der HPV eingreifen, wurde deren Effekt auf die Kontraktion von kleinen IPAs aus Mäusen unter 80 mM KCl und 30 nM U46619 untersucht. Dabei hatten MS-PPOH und TPPU keinen Effekt auf die jeweiligen induzierten Kontraktionen. 14,15-EEZE hatte keinen Effekt auf die KCl-induzierten Kontraktionen, allerdings verringerte es die U46619-induzierten Kontraktionen um 30 % im Vergleich zu der Kontrolle ($p < 0,01$; siehe Tab. 12).

Tabelle 12. Der Effekt von MS-PPOH, 14,15-EEZE und TPPU auf KCl- bzw. U46619-induzierte Kontraktionen von kleinen IPAs aus Mäusen. n = 6 für die Kontroll-Gruppen; n = 4 für alle anderen Gruppen. ** $p < 0,01$.

	KCl (80 mM)	U46619 (30 nM)
Kontrolle	$67,0 \pm 5,1 \% T_K$	$82,3 \pm 5,7 \% T_K$
MS-PPOH (30 μM)	$74,8 \pm 4,5 \% T_K$	$111,6 \pm 1,2 \% T_K$
14,15-EEZE (1,5 μM)	$62,2 \pm 6,7 \% T_K$	$56,5 \pm 3,0 \% T_K^{**}$
TPPU (3 μM)	$64,3 \pm 2,3 \% T_K$	$92,7 \pm 11,4 \% T_K$

3.2.6 Der Effekt von 14,15-EEZE auf die HPV in isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen aus Mäusen

Um den Effekt von 14,15-EEZE auf die HPV zu verifizieren, wurden Experimente mit isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslungen durchgeführt. Der pulmonalarterielle Druck dient dabei als Maß für den Grad der Kontraktion bzw. Dilatation, da die isolierte Mäuselunge mit einem konstanten Volumen perfundiert wird. Unter Hypoxie erhöhte sich der pulmonalarterielle Druck biphasisch, mit einem akuten Maximum während der ersten 8-10 min (auf $1,0 \pm$

0,1 mmHg vs. $-0,0 \pm 0,0$ mmHg unter Normoxie; $p < 0,001$) und einer zweiten, protrahierten Phase (mit einem ansteigenden Druck auf $0,6 \pm 0,1$ mmHg nach 80 min Hypoxie vs. $-0,1 \pm 0,1$ mmHg unter Normoxie; $p < 0,01$). In Anwesenheit von $1,5 \mu\text{M}$ 14,15-EEZE war die akute Phase der HPV in der isolierten Mauslunge nicht signifikant verändert, sprich die Wandspannung erhöhte sich nach etwa 10 min unter Hypoxie signifikant (auf $1,3 \pm 0,4$ mmHg vs. $0,0 \pm 0,1$ mmHg unter Normoxie; $p < 0,001$), allerdings war die protrahierte HPV nach 80 min durch 14,15-EEZE signifikant inhibiert, wodurch es keinen Unterschied in der Wandspannung unter Hypoxie und Normoxie gab ($-0,0 \pm 0,3$ mmHg unter Hypoxie vs. $-0,2 \pm 0,0$ mmHg unter Normoxie; siehe Abb. 18).

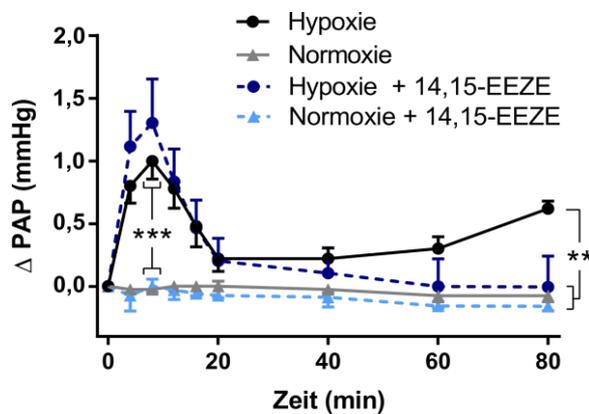


Abbildung 18. Der Effekt von 14,15-EEZE auf die HPV in isolierten, perfundierten und ventilerten Lungen aus Mäusen. Statistische Darstellung von Veränderungen des pulmonalarteriellen Drucks in An- oder Abwesenheit von 14,15-EEZE ($1,5 \mu\text{M}$) über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie. $n = 5$ für Hypoxie; $n = 4$ für Normoxie und Hypoxie + 14,15-EEZE; $n = 3$ für Normoxie + 14,15-EEZE. ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3.2.7 Der Einfluss einer inhibierten Expression von CYP2J-Epoxygenase-Isoformen auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen

Um die Rolle der CYP2J-Epoxygenase in der protrahierten HPV weiter zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine Methode entwickelt, um IPAs mit siRNA zu transfizieren. Dadurch war eine gezielte, transiente Inhibition von Genexpressionen (*knockdown*) in isolierten IPAs möglich. Nach der Transfektion von kleinen IPAs aus Mäusen mit einer *non targeting* siRNA (NT siRNA) oder mit einem Mix aus siRNAs gegen CYP2J5, CYP2J6, CYP2J9, CYP2J11, CYP2J12 und CYP2J13 (CYP2Jx siRNA) wurde zunächst die mRNA-Expression der jeweiligen Isoform analysiert. Anhand der *Real-Time* PCR-Ergebnisse ist zu sehen, dass durch die Behandlung mit den CYP2Jx siRNAs 33,8-73,0 % der mRNA der CYP2J-Epoxygenasen erfolgreich minimiert wurde (siehe Abb. 19. A). Daraufhin wurden Experimente mit transfizierten IPAs im Myographen durchgeführt. In NT siRNA IPAs konnte

eine starke Erhöhung der Wandspannung nach 80 min Hypoxie festgestellt werden (auf $37,7 \pm 4,7 \% T_K$ vs. $5,5 \pm 2,6 \% T_K$ unter Normoxie; $p < 0,001$). Durch den *knockdown* der in IPAs exprimierten CYP2J-Isoformen wurde die HPV zu etwa 46 % reduziert ($p < 0,05$). Die mit CYP2Jx siRNA behandelten IPAs wiesen nach 80 min Hypoxie eine Wandspannung von $20,6 \pm 7,7 \% T_K$ auf und unter Normoxie betrug die Wandspannung $6,5 \pm 2,4 \% T_K$ ($p < 0,001$; siehe Abb. 19. B).

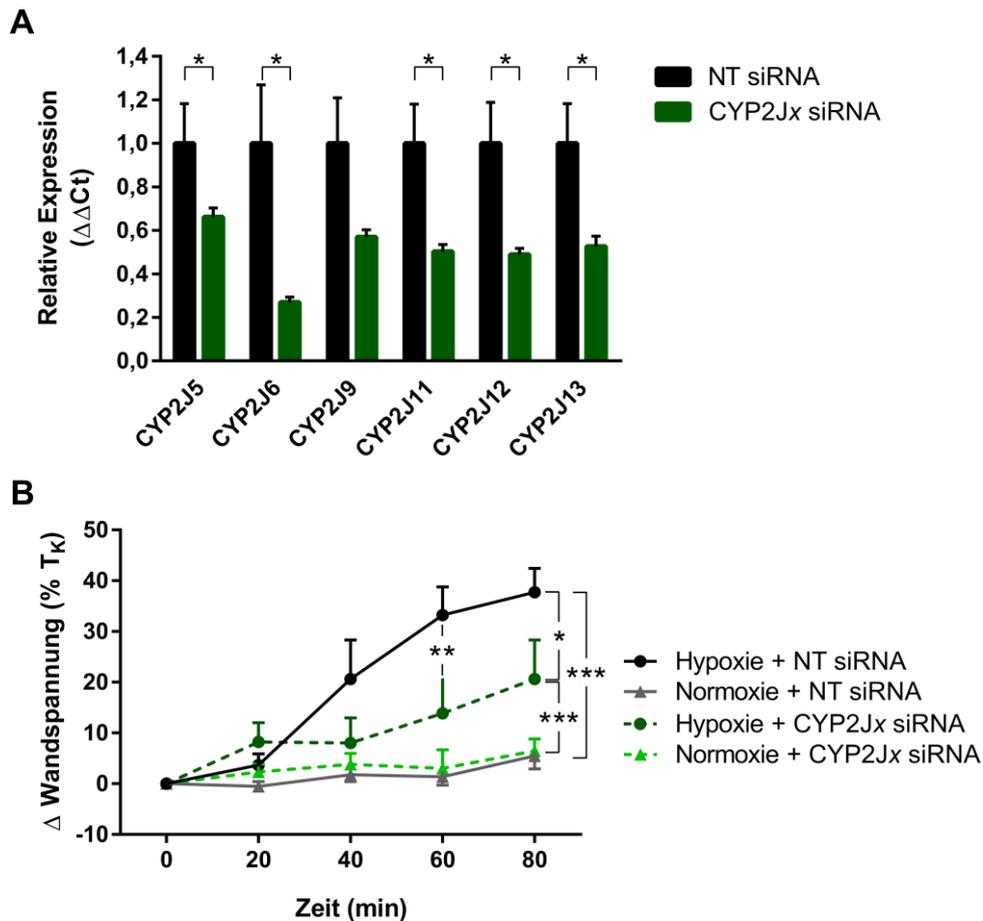


Abbildung 19. Der Effekt von CYP2Jx siRNA auf die prothrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen. A) Relative mRNA-Expression von CYP2J-Epoxygenase-Isoformen in kleinen IPAs aus Mäusen, welche mit CYP2Jx siRNA oder mit *non targeting* siRNA (NT siRNA) transfiziert wurden. $n = 4$ pro Gruppe. * $p < 0,05$. **B)** Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung von transfizierten kleinen IPAs aus Mäusen mit CYP2Jx siRNA oder NT siRNA über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie. $n = 6$ für Hypoxie bzw. Normoxie + CYP2Jx siRNA; $n = 5$ für Hypoxie bzw. Normoxie + NT siRNA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3.2.8 Der Einfluss einer inhibierten Expression der löslichen Epoxidhydrolase auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen

Darauffolgend wurde der Effekt einer inhibierten Expression der löslichen Epoxidhydrolase mittels siRNA (Ephx2 siRNA) auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen untersucht. Die *Real-Time* PCR-Ergebnisse zeigen in diesem Fall, dass durch die Transfektion mit der Ephx2 siRNA 87 % der mRNA der löslichen Epoxidhydrolase in den kleinen IPAs aus Mäusen minimiert wurde ($p < 0,001$; siehe Abb. 20. A). Die IPAs aus Mäusen, die mit Ephx2 siRNA transfiziert wurden, reagierten auf Hypoxie mit einer über 100 %igen Erhöhung der HPV im Vergleich zu den IPAs, die mit NT siRNA transfiziert wurden ($82,4 \pm 5,6$ % T_K vs. $37,7 \pm 4,7$ % T_K ; $p < 0,001$). Die Transfektion mit Ephx2 siRNA hatte keinen Effekt auf die Wandspannung unter Normoxie ($2,8 \pm 6,4$ % T_K vs. $5,5 \pm 2,6$ % T_K in der Kontrolle; siehe Abb. 20. B).

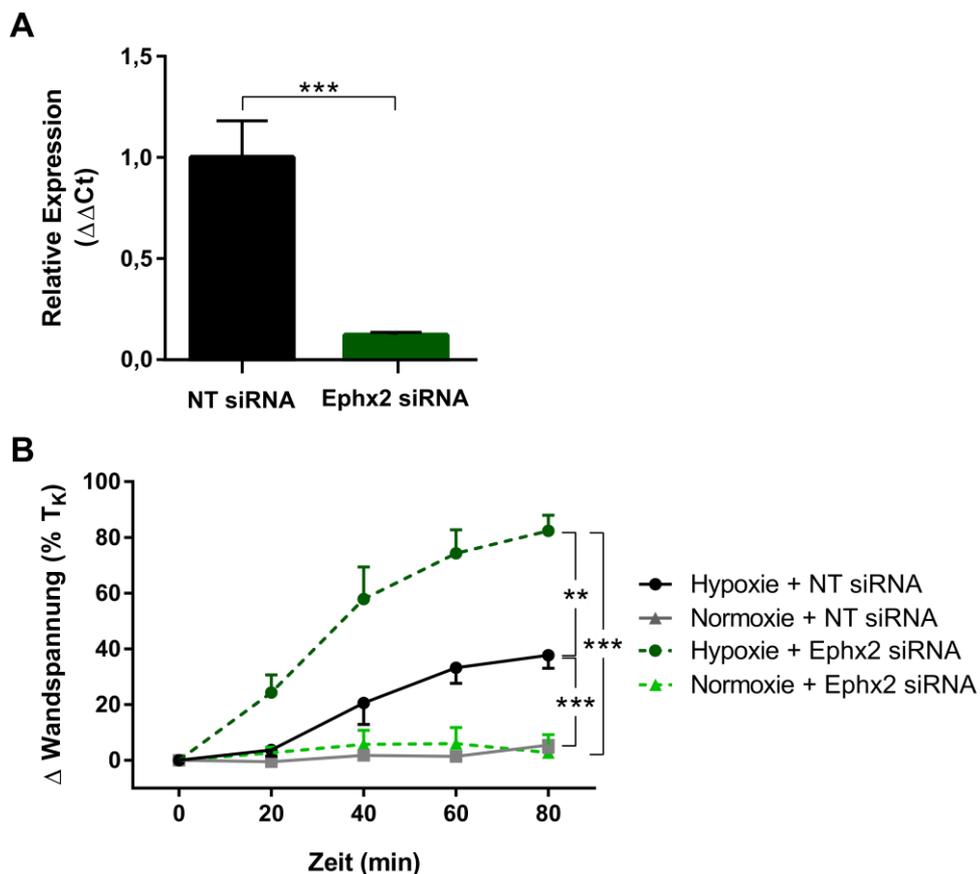


Abbildung 20. Der Effekt von Ephx2 siRNA auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen. A) Relative mRNA-Expression von Ephx2 in kleinen IPAs aus Mäusen, welche mit Ephx2 siRNA oder mit *non targeting* siRNA (NT siRNA) transfiziert wurden. $n = 6$ pro Gruppe. *** $p < 0,001$. **B)** Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung von transfizierten kleinen IPAs aus Mäusen mit Ephx2 siRNA oder NT siRNA über 80 min Hypoxie bzw. Normoxie. $n = 6$ für Hypoxie bzw. Normoxie + Ephx2 siRNA; $n = 5$ für Hypoxie bzw. Normoxie + NT siRNA. ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3.3 Der Effekt von EETs auf den Tonus von pulmonalen Arterien der Maus

Die bisher gezeigten Daten lassen vermuten, dass die Aktivierung der EET-Synthese unter Hypoxie die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen vermittelt. Allerdings ist nicht klar, welches EET-Regioisomer die pulmonale Vasokonstriktion induziert und was der zu Grunde liegende Mechanismus dieser Reaktion ist. Daher wurde im nächsten Schritt der Effekt einer direkten Applikation von exogenen EETs auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen untersucht.

3.3.1 Der Effekt von EETs auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Abwesenheit eines *pretones*

Um zu untersuchen welches EET-Regioisomer für die Hypoxie-induzierte Kontraktion verantwortlich ist, wurde zunächst der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in verschiedenen Konzentrationen von 0,1-3,0 μM nach 4-minütiger Inkubation unter Normoxie untersucht. Die Wandspannung wurde dabei ohne die vorherige Applikation eines *pretones* gemessen. Wie in Tab. 13 zu sehen ist, hat kein EET-Regioisomer, in allen verwendeten Konzentrationen, einen Effekt auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Abwesenheit eines *pretones*.

Tabelle 13. Der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen ohne *pretone*. n = 4-8 pro Gruppe.

Regioisomer	Konzentration (μM)	Δ Wandspannung (% T_K)
5,6-EET	0,1	$-0,5 \pm 0,3$
	1,0	$1,6 \pm 1,8$
	1,5	$0,7 \pm 0,6$
	3,0	$2,6 \pm 0,8$
8,9-EET	0,1	$1,0 \pm 0,8$
	1,0	$2,0 \pm 1,1$
	1,5	$0,5 \pm 0,2$
	3,0	$3,3 \pm 1,3$
11,12-EET	0,1	$-1,2 \pm 1,3$
	1,0	$-1,1 \pm 1,3$
	1,5	$-0,7 \pm 0,3$
	3,0	$-0,9 \pm 1,0$
14,15-EET	0,1	$-0,5 \pm 0,3$
	1,0	$0,2 \pm 0,5$
	1,5	$-0,2 \pm 1,1$
	3,0	$0,7 \pm 1,2$

3.3.2 Der Effekt von EETs auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s

Als nächstes wurde der Effekt von exogenen EETs auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s untersucht. Dabei hatten 8,9-, 11,12- und 14,15-EET in allen verwendeten Konzentrationen keinen Effekt auf die Wandspannung. Interessanterweise erhöhte sich die Wandspannung 4 min nach der Applikation von 5,6-EET signifikant und abhängig von dessen Konzentration (siehe Tab. 14 und Abb. 21. A).

Tabelle 14. Der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s (15-20 mM). n = 4-8 pro Gruppe. * p < 0,001 für 5,6-EET vs. Grundspannung.**

Regioisomer	Konzentration (μM)	Δ Wandspannung (% T_K)
5,6-EET	0,1	$-0,4 \pm 0,9$
	1,0	$9,1 \pm 3,9$
	1,5	$22,3 \pm 3,2$ ***
	3,0	$67,1 \pm 10,9$ ***
8,9-EET	0,1	$2,5 \pm 1,8$
	1,0	$3,2 \pm 0,9$
	1,5	$-0,1 \pm 1,2$
	3,0	$6,7 \pm 1,3$
11,12-EET	0,1	$0,0 \pm 0,9$
	1,0	$-1,6 \pm 2,0$
	1,5	$-2,8 \pm 0,7$
	3,0	$-1,1 \pm 2,1$
14,15-EET	0,1	$-3,2 \pm 1,8$
	1,0	$0,3 \pm 0,7$
	1,5	$1,1 \pm 1,1$
	3,0	$-1,7 \pm 1,2$

Während einer langen Inkubation induzierte 5,6-EET in der geringen Konzentration (0,3 μM) eine monophasische, protrahierte Kontraktion der kleinen IPAs aus Mäusen (auf $20,2 \pm 2,0$ % T_K vs. $11,2 \pm 2,7$ % T_K in der Kontrolle; $p < 0,05$). Ab einer Konzentration $\geq 1,0$ μM führte die Inkubation der IPAs aus Mäusen in 5,6-EET zu einer biphasischen Kontraktion, die ausgezeichnet war durch eine signifikante akute Phase, mit einem Maximum innerhalb der ersten 3-4 min (auf $19,8 \pm 3,3$ % T_K vs. $0,7 \pm 0,8$ % T_K in der Kontrolle; $p < 0,001$) und einer signifikanten protrahierten Phase, mit einem stetigen Anstieg der Wandspannung (auf $25,2 \pm 4,0$ % T_K vs. $11,2 \pm 2,7$ % T_K in der Kontrolle; $p < 0,001$; siehe Abb. 21. B). Da 1,5 μM von 5,6-EET die geringste Konzentration war, die zu einer verlässlichen biphasischen Kontraktion der kleinen IPAs aus Mäusen führte, wurde diese Konzentration für die zukünftigen Experimente verwendet.

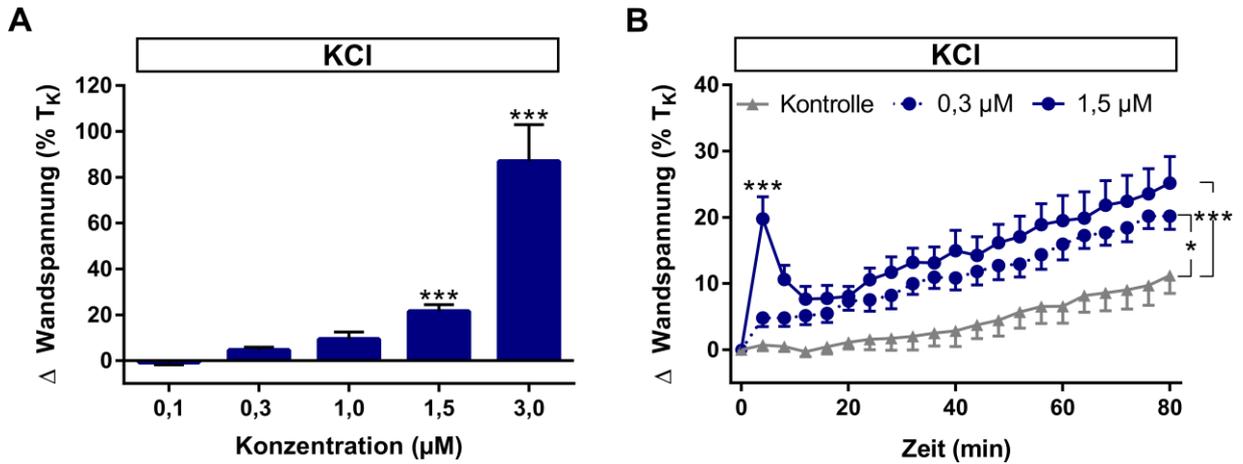


Abbildung 21. Der Effekt von 5,6-EET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretones*. **A)** Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung nach der Applikation von 5,6-EET in den Konzentrationen 0,1-3,0 μM und in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s (15-20 mM). $n = 3$ für 0,1 μM ; $n = 8$ für 0,3 μM ; $n = 6$ für 1,0 μM ; $n = 12$ für 1,5 und 3,0 μM . *** $p < 0,001$ für 5,6-EET vs. Grundspannung. **B)** Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung nach der Inkubation mit 5,6-EET (0,3 und 1,5 μM) in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s (15-20 mM) über 80 min Normoxie. Als Kontrolle diente die 80-minütige Inkubation mit einem KCl-induzierten *pretone* (15-20 mM) ohne die Applikation von 5,6-EET. $n = 7$ für 0,3 μM ; $n = 8$ für 1,5 μM ; $n = 10$ für Kontrolle. * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$.

Die anderen EET-Regioisomere hatten selbst während einer verlängerten Inkubationszeit in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s und in einer Konzentration von 1,5 μM keinen Effekt auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen. Nach der 80-minütigen Inkubation mit 8,9-EET betrug die Wandspannung $10,3 \pm 4,3$ % T_K , in 11,12-EET $7,4 \pm 2,4$ % T_K und in 14,15-EET $10,4 \pm 5,9$ % T_K . Daher gab es keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle, in der die Wandspannung nach 80 min $11,2 \pm 2,7$ % T_K betrug (siehe Abb. 22).

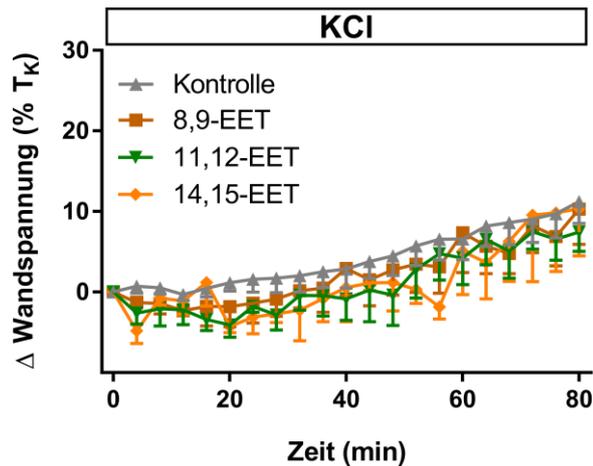


Abbildung 22. Der Effekt von 8,9-, 11,12-, und 14,15-EET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s. Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung nach der Inkubation mit einem der EET-Regioisomere (1,5 μ M) in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s (15-20 mM) über 80 min Normoxie. Als Kontrolle diente die 80-minütige Inkubation mit einem KCl-induzierten *pretone* (15-20 mM) ohne die Applikation eines EET-Regioisomers. $n = 3$ für 8,9-EET, 11,12-EET und 14,15-EET; $n = 10$ für Kontrolle.

3.3.3 Der Effekt von EETs auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s

Der Effekt von EETs wurde ebenfalls auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s untersucht. Unter diesen Bedingungen führten EETs zu einer signifikanten, protrahierten Dilatation der IPAs, die ein Maximum nach 12-20 min erreichte. Die Wandspannung betrug nach der 80-minütigen Inkubation mit 5,6-EET $4,4 \pm 3,0$ % T_K und war damit signifikant geringer, als die Wandspannung unter Kontrollbedingungen, die $22,9 \pm 4$ % T_K betrug ($p < 0,01$). Die Applikation der anderen EET-Regioisomere führte jeweils zu einer stärkeren Dilatation, die nach 12-20 min stabil blieb und die sich signifikant von der Dilatation unter 5,6-EET ($p < 0,001$) und zu der Kontrolle unterschied ($p < 0,001$). So induzierte 8,9-EET eine Verringerung der Wandspannung auf $-16,9 \pm 5,4$ % T_K, 11,12-EET eine Dilatation auf $-12,7 \pm 3,9$ % T_K und 14,15-EET eine Dilatation auf $-20,6 \pm 5,5$ % T_K nach 80-minütiger Inkubation (siehe Abb. 23).

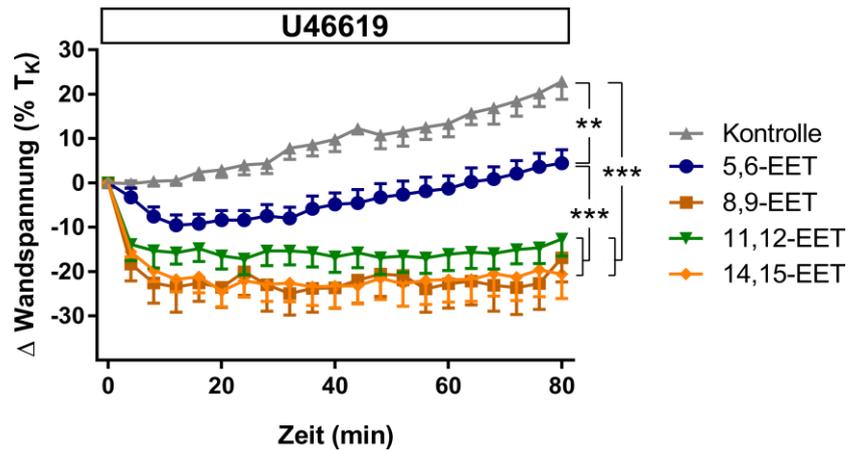


Abbildung 23. Der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12-, und 14,15-EET in Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen. Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung nach der Inkubation mit einem der EET-Regioisomere (1,5 μ M) in Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s (1-3 nM) über 80 min Normoxie. Als Kontrolle diente die 80-minütige Inkubation mit einem U46619-induzierten *pretone* (1-3 nM) ohne die Applikation eines EET-Regioisomers. n = 8 für 5,6-EET; n = 4 für alle anderen Gruppen. ** p < 0,01 und *** p < 0,001.

3.3.4 Die EET-induzierten Reaktionen in isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen von Mäusen

Um den kontrahierenden Effekt von 5,6-EET zu validieren, wurden Experimente mit isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslungen durchgeführt. In Abwesenheit eines *pretone*s hatten alle EET-Regioisomere in einer Konzentration von 1,5 μ M keinen Effekt auf den PAP von isolierten, perfundierten und ventilierten Mäuselungen nach 4-minütiger Inkubation (siehe Tab. 15).

Tabelle 15. Der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET (1,5 μ M) auf den pulmonalarteriellen Druck von isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen aus Mäusen in Ab- oder Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s (15-20 mM). n = 4-5 pro Gruppe. *** p < 0,001 für 5,6-EET vs. Kontrolle.

	Δ PAP (mmHg)	
	Ohne <i>pretone</i>	KCl-induzierter <i>pretone</i>
Kontrolle	-0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
5,6-EET	-0,0 \pm 0,1	2,3 \pm 0,5 ***
8,9-EET	-0,1 \pm 0,1	-0,2 \pm 0,1
11,12-EET	0,0 \pm 0,1	-0,4 \pm 0,1
14,15-EET	-0,1 \pm 0,1	-0,5 \pm 0,1

Durch die Zugabe von 20 mM KCl zu dem Perfusionspuffer, wurde eine signifikante Erhöhung des PAP um $2,2 \pm 0,4$ mmHg induziert ($p < 0,01$). Nachdem der PAP stabil war, wurde jeweils eines der EET-Regioisomere in einer Konzentration von $1,5 \mu\text{M}$ appliziert. Auch in diesem Modell führte lediglich 5,6-EET zu einer signifikanten, biphasischen Erhöhung des PAP, ähnlich zu der Kontraktion von IPAs. 4 min nach der Applikation von 5,6-EET erreichte der PAP ein Maximum bei $2,3 \pm 0,5$ mmHg und unterschied sich damit signifikant von der Kontrolle, die $0,1 \pm 0,0$ mmHg betrug (siehe Tab. 15; $p < 0,001$). Daraufhin verringerte sich der PAP zuerst, woraufhin ein stetiger Anstieg auf $0,7 \pm 0,6$ mmHg nach 40-minütiger Inkubation folgte, der sich ebenfalls signifikant von der Kontrolle, die $-0,8 \pm 0,3$ mmHg betrug, unterschied ($p < 0,01$). Alle anderen EET-Regioisomere hatten keinen Effekt auf den PAP in Anwesenheit von KCl (siehe Abb. 24).

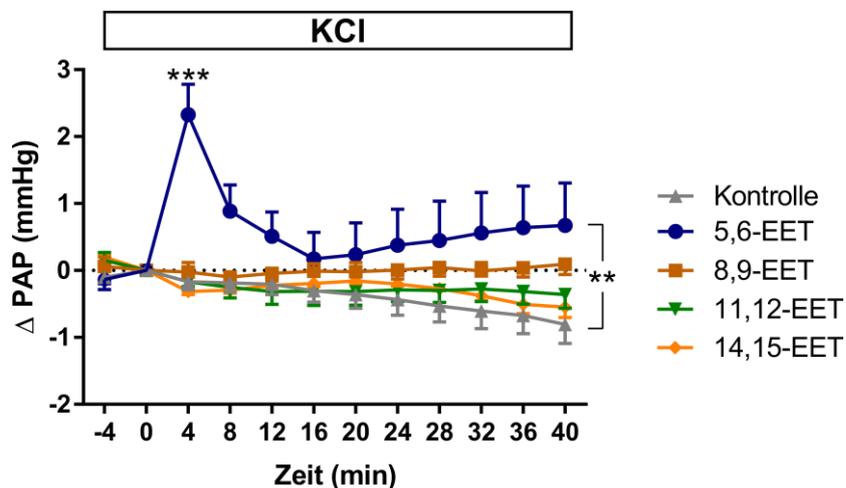


Abbildung 24. Der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET auf den pulmonalarteriellen Druck von isolierten, perfundierten und ventilerten Lungen aus Mäusen. Statistische Darstellung von Veränderungen des pulmonalarteriellen Drucks nach der Inkubation mit einem der EET-Regioisomere ($1,5 \mu\text{M}$) in Anwesenheit von KCl (20 mM) unter 40 min Normoxie. Als Kontrolle diente die 40-minütige Inkubation mit KCl (20 mM) ohne ein EET-Regioisomer. $n = 6$ für 5,6-EET; $n = 4$ für 8,9-EET und 14,15-EET; $n = 5$ für 11,12-EET und Kontrolle. ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3.3.5 Der Effekt von 14,15-EEZE auf die 5,6-EET-induzierten Reaktionen von kleinen IPAs aus Mäusen

Um herauszufinden, ob die vasomotorischen Reaktionen auf 5,6-EET das Resultat einer direkten Aktion von diesem Regioisomer sind, wurde der Effekt von 14,15-EEZE auf die 5,6-EET-induzierten Reaktionen getestet. Nach der 15-minütigen Inkubation mit 14,15-EEZE und der darauffolgenden Applikation von 5,6-EET war die Erhöhung der Wandspannung nach 4 min in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretones* signifikant inhibiert (auf $2,1 \pm 1,7$ % T_K

vs. $21,5 \pm 2,9$ % T_K in der Kontrolle; $p < 0,001$). Nach 80-minütiger Inkubation betrug die Wandspannung lediglich $3,0 \pm 2,9$ % T_K und war demnach hoch signifikant geringer im Vergleich zu der Wandspannung nach der Inkubation mit 5,6-EET in Abwesenheit des Inhibitors. Diese betrug $24,1 \pm 3,6$ % T_K ($p < 0,001$). Die Wandspannung in Anwesenheit von 14,15-EEZE und 5,6-EET war zudem nicht signifikant unterschiedlich zu der Wandspannung der IPAs, die lediglich mit dem Inhibitor inkubiert wurden ($9,6 \pm 7,2$ % T_K nach 80 min) oder der IPAs, bei denen ausschließlich ein KCl-induzierter *pretone* appliziert wurde ($11,2 \pm 2,7$ % T_K nach 80 min; siehe Abb. 25. A). Wie bereits erwähnt inhibiert 14,15-EEZE die U46619-induzierten Kontraktionen von IPAs. Daher musste die Konzentration des U46619-induzierten *pretone*s auf bis zu 5 nM erhöht werden, um den gewünschten Grad an *pretone* in Anwesenheit von 14,15-EEZE zu erreichen. Die Veränderungen in der Wandspannung während der 80-minütigen Inkubation der IPAs in 14,15-EEZE in Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s war nicht signifikant unterschiedlich zu der Wandspannung der IPAs, die lediglich in einem U46619-induzierten *pretone* inkubiert wurden ($9,6 \pm 7,2$ % T_K vs. $22,9 \pm 4,0$ % T_K). In Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s wurde die 5,6-EET-induzierte Dilatation der IPAs signifikant durch 14,15-EEZE inhibiert ($17,6 \pm 7,6$ % T_K mit 14,15-EEZE vs. $4,4 \pm 3,0$ % T_K ohne 14,15-EEZE nach 80 min; $p < 0,01$ siehe Abb. 25. B).

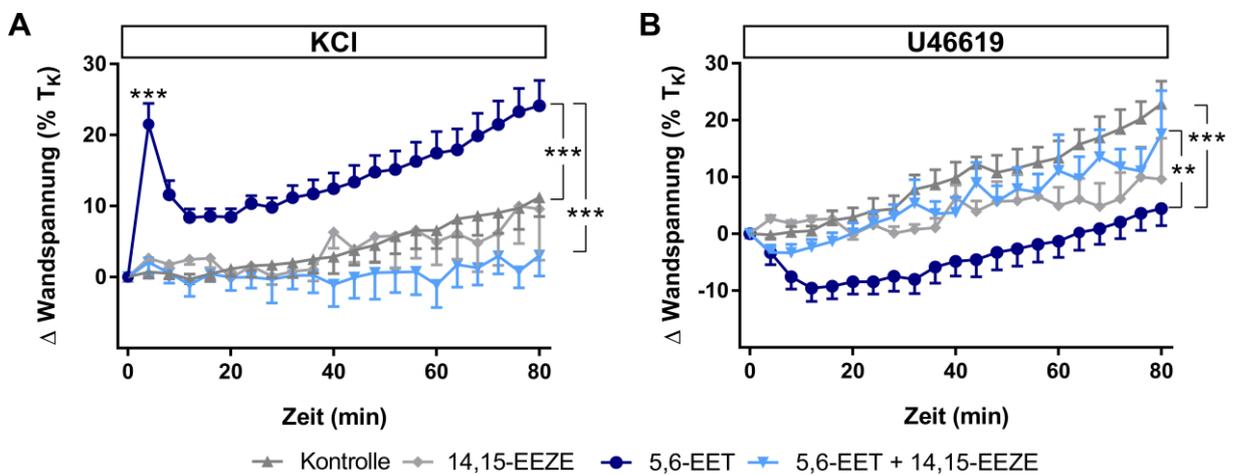


Abbildung 25. Der Effekt von 14,15-EEZE auf die 5,6-EET-induzierten Veränderungen der Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen. Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung nach der Inkubation mit 5,6-EET (1,5 μ M) in An- oder Abwesenheit des EET-Antagonisten 14,15-EEZE (1,5 μ M) und in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s (15-20 mM) (A) bzw. U46619-induzierten *pretone*s (1-3 nM) (B). Zudem wurden IPAs in Anwesenheit eines *pretone*s in 14,15-EEZE ohne 5,6-EET inkubiert. Als Kontrolle diente die 80-minütige Inkubation der IPAs in einem KCl- (15-20 mM) bzw. U46619- (1-3 nM) induzierten *pretone*. In (A) $n = 4$ für 14,15-EEZE und 5,6-EET + 14,15-EEZE; $n = 12$ für 5,6-EET; $n = 10$ für Kontrolle. In (B) $n = 8$ für 5,6-EET; $n = 7$ für 5,6-EET + 14,15-EEZE; $n = 4$ für Kontrolle und 14,15-EEZE. ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Demnach wurden beide Effekte von 5,6-EET, sprich die induzierte Kontraktion in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretones* und die induzierte Dilatation in Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretones*, durch den EET-Antagonisten 14,15-EEZE inhibiert.

3.3.6 Der Effekt von 5,6-Dihydroxyeicosatriensäure auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen

Es ist bekannt, dass 5,6-EET durch die lösliche Epoxidhydrolase zu 5,6-Dihydroxyeicosatriensäure (5,6-DHET) umgewandelt wird (Revermann, 2010). In Anbetracht dessen wurde untersucht, ob dieser Prozess eine Rolle bei der 5,6-EET-induzierten Kontraktion von den kleinen IPAs aus Mäusen spielt. In Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretones* war die Wandspannung während der 80-minütigen Inkubation mit 1,5 μM 5,6-DHET nicht signifikant unterschiedlich zu der Kontrolle ($11,0 \pm 3,6 \% T_K$ vs. $11,2 \pm 2,7 \% T_K$ nach 80 min; siehe Abb. 26). Demnach ist die observierte Kontraktion der kleinen IPAs aus Mäusen in den bisher gezeigten Daten spezifisch durch 5,6-EET induziert.

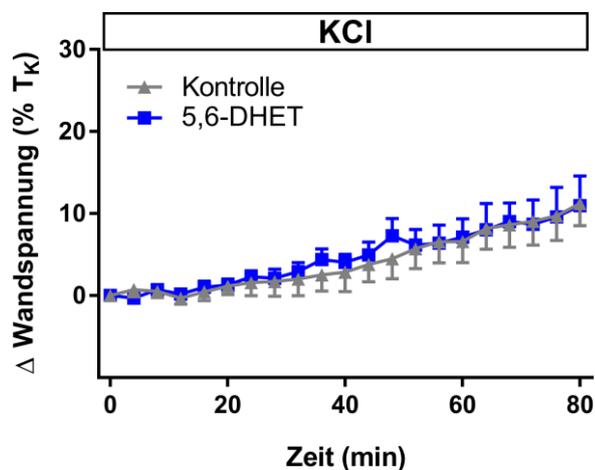


Abbildung 26. Der Effekt von 5,6-DHET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen. Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung nach der Inkubation mit 5,6-DHET (1,5 μM) in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretones* (15-20 mM). Als Kontrolle diente die 80-minütige Inkubation mit einem KCl-induzierten *pretone* (15-20 mM) unter Normoxie. $n = 8$ für 5,6-DHET; $n = 10$ für Kontrolle.

3.3.7 Der Effekt von 5,6-EET auf die Wandspannung von isolierten Aorten und Femoralarterien der Maus

Um die Spezifität der 5,6-EET-induzierten Kontraktion in Bezug auf die Lokalisation der Reaktion zu überprüfen, wurden Myographie-Experimente mit isolierten Aorten und Femoralarterien aus Mäusen durchgeführt. In Aorten hatte die Applikation von 1,5 μM 5,6-EET in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s keinen Effekt auf den Tonus ($15,4 \pm 2,2$ % T_K vs. $17,0 \pm 1,9$ % T_K in der Kontrolle nach 80 min; siehe Abb. 27. A). Die Abwesenheit einer Reaktion auf 5,6-EET war auch in Femoralarterien aus Mäusen zu beobachten ($50,1 \pm 6,8$ % T_K vs. $40,5 \pm 7,2$ % T_K in der Kontrolle nach 80 min; siehe Abb. 27. B). Demnach führt 5,6-EET scheinbar nur in pulmonalen und nicht in systemischen Arterien zu einer Kontraktion in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s.

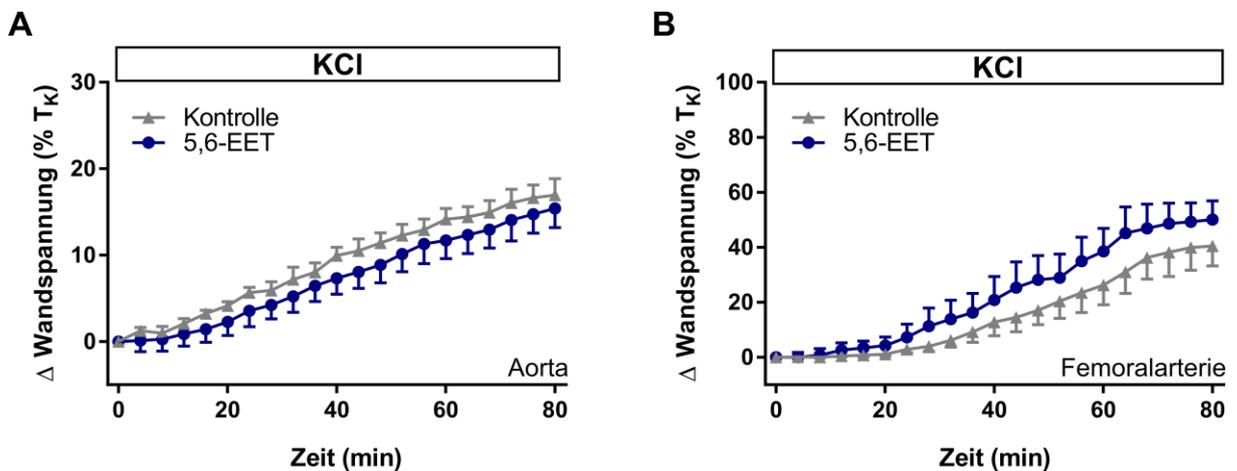


Abbildung 27. Der Effekt von 5,6-EET auf die Wandspannung von Aorten und Femoralarterien aus Mäusen. Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung von isolierten Aorten (A) und Femoralarterien (B) während der 80-minütigen Inkubation mit 5,6-EET (1,5 μM) in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s (15-20 mM). Als Kontrolle diente die 80-minütige Inkubation mit einem KCl-induzierten *pretone* (15-20 mM). In (A) $n = 5$ für 5,6-EET; $n = 4$ für Kontrolle. In (B) $n = 6$ für 5,6-EET; $n = 5$ für Kontrolle.

3.4 Charakterisierung des Mechanismus der 5,6-EET-induzierten Kontraktion

3.4.1 Der Effekt von 5,6-EET auf die Ionenströme in PASMCs von Mäusen

Die Reaktion von isolierten IPAs auf 5,6-EET ist vermutlich abhängig von der Art der Vorstimulierung der Arterien. Es ist bekannt, dass KCl eine Kontraktion durch eine Depolarisation der Plasmamembran induziert, wodurch es zu einem spannungsabhängigen Ca^{2+} -Einstrom

kommt (Coppock *et al.*, 2001). U46619 hingegen induziert in der verwendeten Konzentration eine Kontraktion durch einen Ca^{2+} -Ausstrom aus intrazellulären Calciumspeichern (Snetkov *et al.*, 2006). Daher wurde vermutet, dass die Reaktion von kleinen IPAs aus Mäusen auf 5,6-EET durch das Membranpotential der PASMCs definiert wird. Um dies zu untersuchen, wurden *Patch Clamp*-Experimente durchgeführt. In den *Patch Clamp*-Experimenten wiesen isolierte PASMCs aus Mäusen ein Ruhepotential von $-36,8 \pm 2,0$ mV auf. Vergleichbar zu ei-

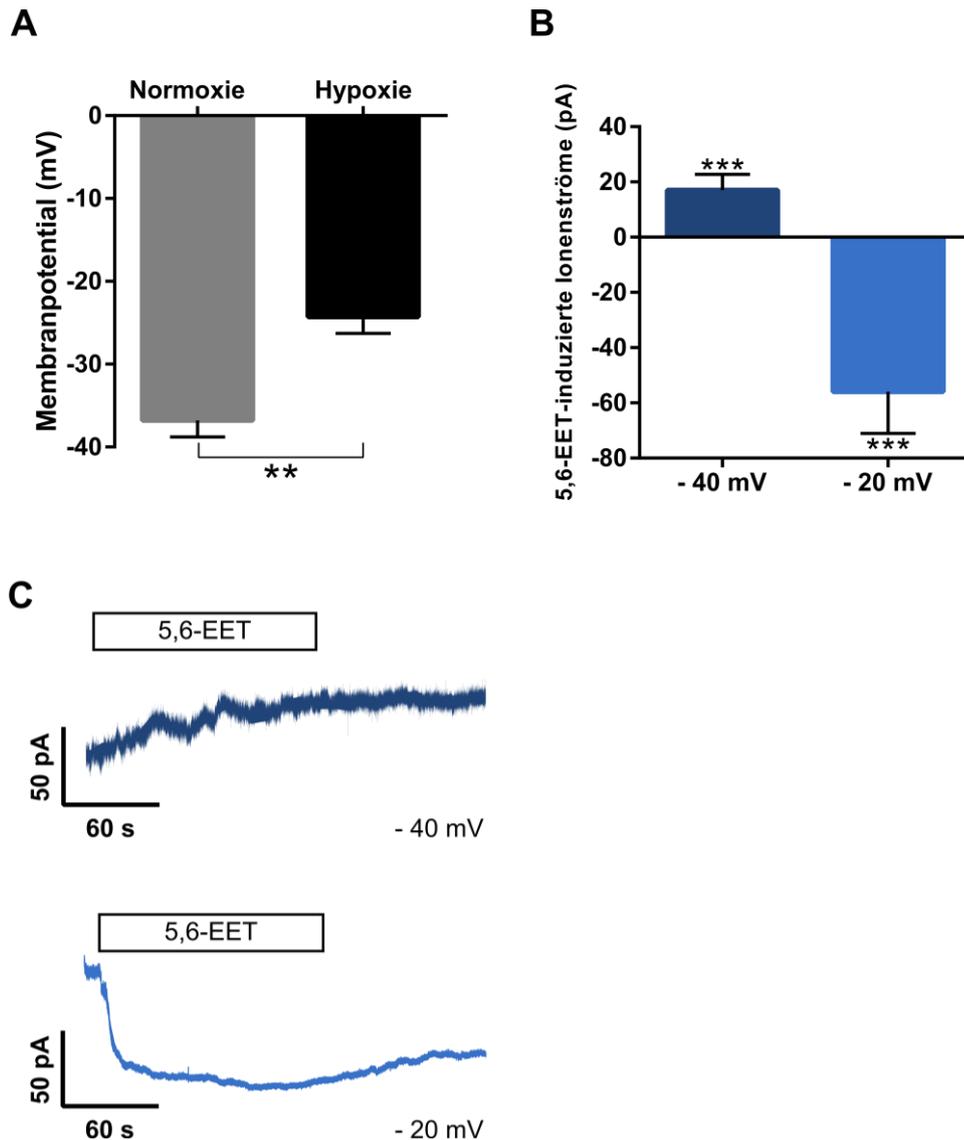


Abbildung 28. Der Effekt von 5,6-EET auf die Ionenströme in PASMCs aus Mäusen. A) Statistische Darstellung des Membranpotentials von PASMCs aus Mäusen unter Hypoxie bzw. Normoxie. $n = 8$ pro Gruppe. $** p < 0,01$. **B)** Statistische Darstellung von *Whole Cell*-Ionenströmen induziert durch 5,6-EET ($1,5 \mu\text{M}$) bei einem Haltepotential von -40 mV und -20 mV. $n = 8$ pro Gruppe. $*** p < 0,001$ für Haltepotential vs. Grundlinie. **C)** Repräsentative Stromspuren von *Whole Cell*-Ionenströme über eine Maus PASMC-Membran bei einem Haltepotential von -40 mV (oben) und -20 mV (unten) in Reaktion auf 5,6-EET ($1,5 \mu\text{M}$).

ner vorherigen Studie von Sommer *et al.* (2017), induzierte Hypoxie eine Depolarisation der PASMC-Membran auf $-24,3 \pm 2,0$ mV ($p < 0,01$; siehe Abb. 28. A). Daraufhin wurde der Effekt von 5,6-EET auf den transmembranen Ionenstrom von PASMCs untersucht, in denen das Membranpotential auf die Werte angeglichen wurde, die dem gemessenen Membranpotential unter Normoxie/Hypoxie entsprachen (-40 mV und -20 mV). Die Ergebnisse zeigen, dass 5,6-EET bei einem Haltepotential von -40 mV einen signifikanten Auswärtsstrom induziert ($17,0 \pm 5,7$ pA; $p < 0,001$). Bei einem Haltepotential von -20 mV führte die Applikation von 5,6-EET zu einem signifikanten Einwärtsstrom ($-56,0 \pm 15,1$ pA; $p < 0,001$; siehe Abb. 28. B, C). Die Reaktion von kleinen IPAs aus Mäusen auf 5,6-EET ist demnach sehr wahrscheinlich durch das Membranpotential der PASMCs definiert.

3.4.2 Der Effekt von 5,6-EET auf $[Ca^{2+}]_i$ in kleinen IPAs aus Mäusen

Im nächsten Schritt wurde der Effekt von 5,6-EET auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration untersucht. Dafür wurden Ca^{2+} -Messungen mit dem 360CW Konfokalen Myographensystem durchgeführt. Dieses erlaubt die simultane Messung der Wandspannung und der Fluoreszenz. Die Experimente zeigen, dass die Applikation von 5,6-EET keinen Effekt auf die Wandspannung und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Abwesenheit eines KCl-induzierten *pretones* hatte ($1,9 \pm 0,8$ % F_K). Im Gegenteil dazu führte die Applikation von 5,6-EET in IPAs, die mit KCl vorstimuliert wurden, zu einer signifikanten Erhöhung der Wandspannung und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (auf $65,6 \pm 7,4$ % F_K ; $p < 0,001$; siehe Abb. 29).

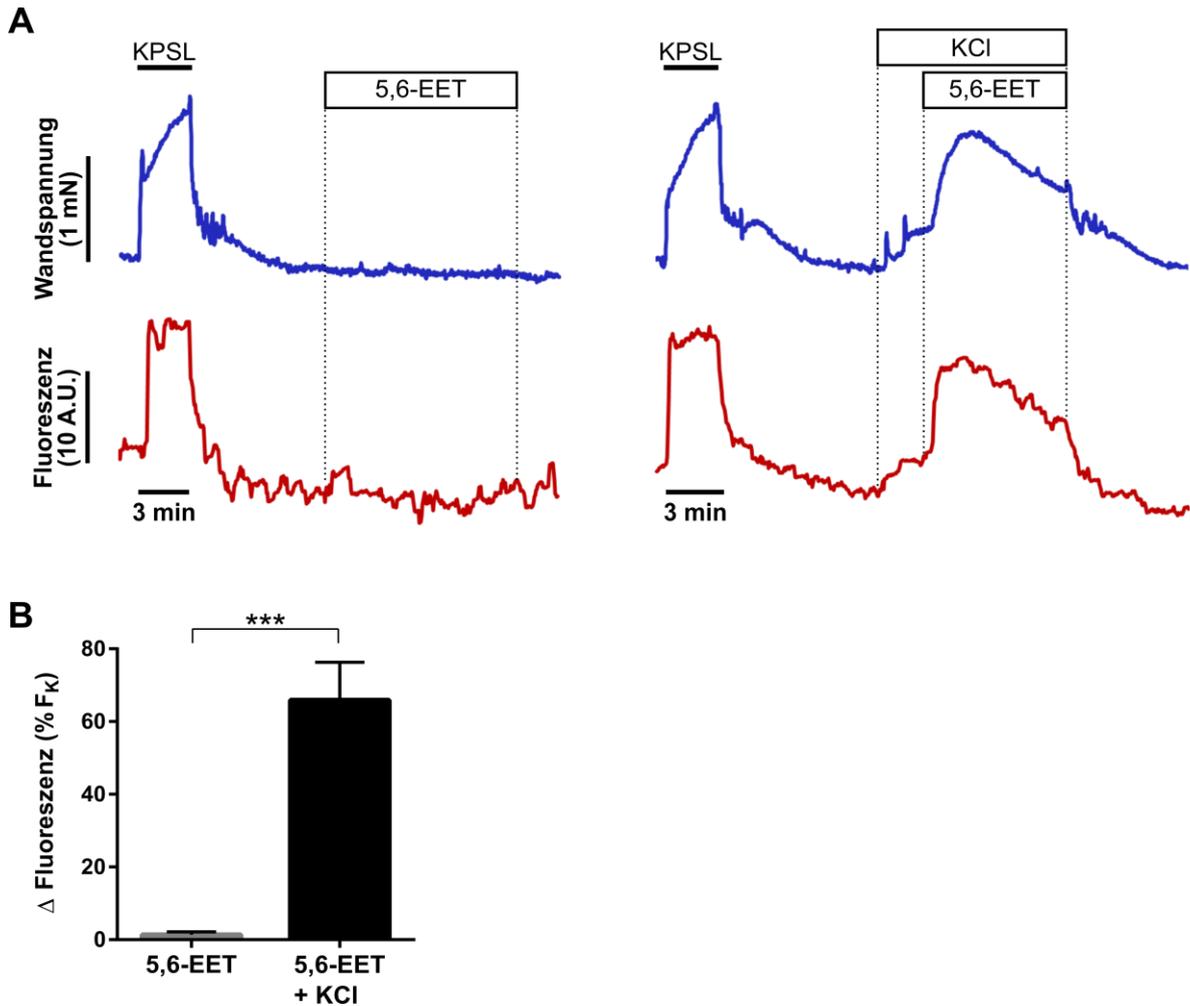


Abbildung 29. Der Effekt von 5,6-EET auf $[Ca^{2+}]_i$ in kleinen IPAs aus Mäusen. A) Repräsentativer Verlauf der Wandspannung und der Fluoreszenz unter KPSL und 5,6-EET (1,5 μ M) ohne *pretone* (links) bzw. mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM) (rechts). **B)** Statistische Darstellung der Fluoreszenz in Anwesenheit von 5,6-EET (1,5 μ M) ohne *pretone* bzw. mit KCl-induziertem *pretone* (15-20 mM). n = 3 pro Gruppe. *** p < 0,001.

3.4.3 Der Effekt von H₂O₂ und 4-Aminopyridin auf die 5,6-EET-induzierten Reaktionen in kleinen IPAs aus Mäusen

Zusätzlich wurde untersucht, ob die 5,6-EET-induzierte Vasokonstriktion durch ROS (H₂O₂) oder durch einen K_V-Kanal-Inhibitor (4-Aminopyridin, 4-AP) gefördert werden kann. In einem Konzentrationsbereich von 0,1-3,0 μ M hatte H₂O₂ keinen Effekt auf die Wandspannung von IPAs, wohingegen Konzentrationen über 10 μ M geringe, aber irreversible Kontraktionen auslösten, die die IPAs unempfindlich für andere Stimuli machten. Daher wurde für die folgenden Experimente 3 μ M H₂O₂ verwendet. Wie erwartet, hatte 5,6-EET in Abwesenheit einer Vorstimulierung keinen Effekt auf die Wandspannung von IPAs (3,1 \pm 1,1 % T_K nach 4-minütiger Inkubation). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Wandspannung signifikant unter

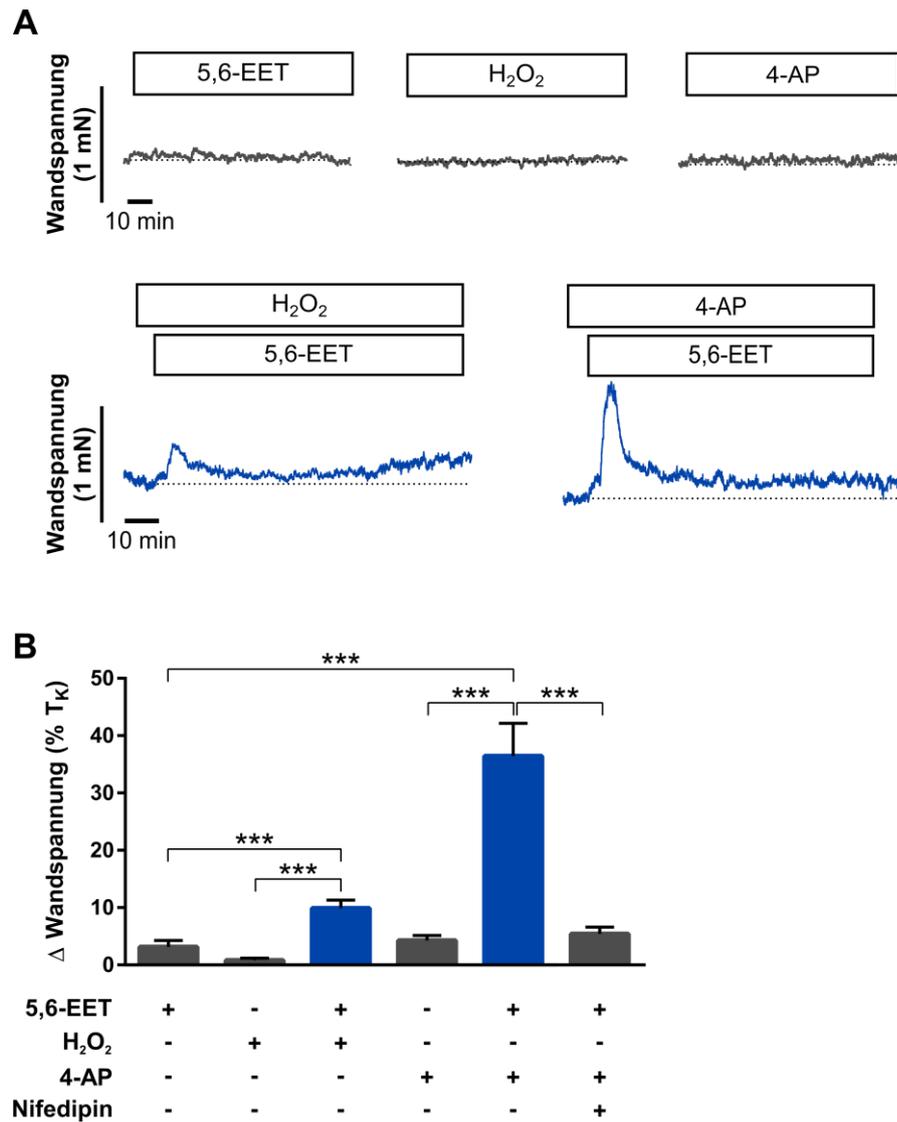


Abbildung 30. Der Effekt von H₂O₂ und 4-AP auf die 5,6-EET-induzierten Reaktionen von kleinen IPAs aus Mäusen. A) Repräsentativer Verlauf der Wandspannung unter 5,6-EET (1,5 μM), H₂O₂ (3 μM) oder 4-AP allein (1 mM; oben) und nach der Applikation von 5,6-EET in Anwesenheit von entweder H₂O₂ oder 4-AP (unten). **B)** Statistische Darstellung von Veränderungen der Wandspannung in Antwort auf 5,6-EET (1,5 μM) in Anwesenheit von H₂O₂ (3 μM), 4-AP (1 mM) und Nifedipin (1 μM) nach 4 min. n = 8 für 5,6-EET; n = 7 für 5,6-EET + 4-AP + Nifedipin; n = 12 für alle anderen Gruppen. *** p < 0,001.

5,6-EET, wenn die kleinen IPAs vorher mit H₂O₂ stimuliert wurden (auf $9,9 \pm 1,4$ % T_K vs. $0,8 \pm 0,4$ % T_K nach 4-minütiger Inkubation mit H₂O₂; p < 0,001). Die Applikation von 1 mM 4-AP allein führte zu einer leichten Erhöhung der Wandspannung, die jedoch nicht statistisch signifikant war (auf $4,3 \pm 0,9$ % T_K nach 4-minütiger Inkubation). In Anwesenheit von 4-AP induzierte 5,6-EET eine starke, signifikante Kontraktion (auf $36,5 \pm 5,7$ % T_K nach 4-minütiger Inkubation; p < 0,001). Diese Kontraktion wurde durch 1 μM Nifedipin, einem L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Inhibitor, nahezu komplett blockiert ($5,0 \pm 1,1$ % T_K nach 4-minütiger Inkubation; p < 0,001; siehe Abb. 30). Die 5,6-EET-induzierte Kontraktion der kleinen IPAs aus Mäusen ist

demnach scheinbar von einer simultanen Erhöhung der ROS-Konzentration und der Schließung von K_V -Kanälen abhängig.

4. Diskussion

Intrapulmonale Arterien kontrahieren unter alveolarer Hypoxie, um das Blut zu besser ventilierten Arealen der Lunge zu leiten. Dadurch wird die Perfusion an die Ventilation angepasst, um so einer systemischen Hypoxämie vorzubeugen. Obwohl die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion seit mehr als 60 Jahren bekannt ist, sind die zellulären Sauerstoffsensoren und die Signalkaskaden, die zur Vasokonstriktion unter Hypoxie führen, immer noch umstritten (Strielkov *et al.*, 2017). Findet die HPV jedoch auf Grund einer generalisierten Hypoxie, wie bei der Lungenerkrankung COPD oder bei einem Aufstieg in großer Höhe, über Wochen oder sogar Monaten statt, kann sie zur Ausbildung einer Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie beitragen (Dunham-Snary *et al.*, 2017; Sylvester *et al.*, 2012). Da bisher alle Therapien gegen pulmonale Hypertonie nur mildernd sind, besteht ein dringender Bedarf an geeigneteren Therapie-Möglichkeiten (Humbert *et al.*, 2004). Die vorgelegte Thesis dient daher der Untersuchung zur Rolle des Epoxyeicosatriensäure-Signalwegs in der HPV, welcher ein neues Ziel für die pharmakologische Behandlung von HPV-bedingten Erkrankungen darstellen könnte.

4.1 Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion in pulmonalen Arterien von Mäusen

Für die Durchführung dieser Studie wurde die Myographen-Technik als Methode verwendet, um die HPV in isolierten Arterien aus der Mauslunge untersuchen zu können. Diese Methode bietet den Vorteil die kontraktilen Eigenschaften von isolierten pulmonalen Arterien, in denen die Interaktionen zwischen den PASMCs und Endothelzellen intakt sind, unter isometrischen Bedingungen untersuchen zu können. Der Vorteil des Mausmodells ist zudem, dass dies die Durchführung von Experimenten mit isolierten Gefäßen aus genetisch modifizierten Tieren ermöglicht. Bislang gibt es, bis auf wenige Ausnahmen, kaum Studien zur HPV in isolierten Pulmonalarterien der Maus (Archer *et al.*, 2001; Korde *et al.*, 2011). Dies mag daran liegen, dass die Isolation von Pulmonalarterien aus Mäusen und deren Einspannung in den Myographen auf Grund ihrer sehr geringen Durchmesser technisch herausfordernd und zeitaufwendig ist. Außerdem ist es mit den Standardprotokollen, die bisher für die Untersuchung der HPV in anderen Spezies verwendet wurden, schwierig eine HPV in isolierten IPAs aus Mäusen zu induzieren (Connolly *et al.*, 2013; Manoury *et al.*, 2011). Dafür wurde zu Beginn der vorgelegten Studie die Reaktionen der isolierten Pulmonalarterien aus Mäusen auf Hypoxie charakterisiert, um ein geeignetes Protokoll für die Untersuchung der HPV in Mäusen etablieren zu können. Zunächst wurde der Effekt von Hypoxie (in Ab- oder Anwesenheit ei-

nes *pretone*s) auf unterschiedliche Generationen der pulmonalen Arterien der Maus untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass es große Unterschiede zwischen den verschiedenen Arterien-Generationen in den Reaktionen auf Hypoxie gibt, die abhängig von der Größe der Arterien und der Art des *pretone*s sind. In Abwesenheit eines *pretone*s dilatieren extrapulmonale Arterien (500-700 μm im Durchmesser) unter Hypoxie. Dies lässt vermuten, dass die EPAs aus Mäusen zum Teil Eigenschaften die denen systemischer Arterien ähneln: Systemische Arterien dilatieren unter Hypoxie, um die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf, wie z.B. bei einer Muskelbewegung, zu gewährleisten. Studien belegen, dass dies durch eine NO-abhängige Erniedrigung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in glatten Muskelzellen vermittelt wird (Totzeck *et al.*, 2014; Totzeck *et al.*, 2012). Andere Studien zeigen, dass Hypoxie eine Hyperpolarisation in systemischen Arterien induziert. Dies resultiert aus der Aktivierung von Ca^{2+} - und/oder ATP-abhängigen K^+ -Kanälen (K_{Ca} - bzw. K_{ATP} -Kanäle) und der darauffolgenden Inaktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen in glatten Muskelzellen (Armstead, 1997; Dart & Standen, 1995; Daut *et al.*, 1990; Gebremedhin *et al.*, 1994; Shankar & Armstead, 1995). Da der Effekt von der Hypoxie-induzierten K_{Ca} -Kanalaktivität durch Antioxidantien gehemmt werden konnte, wird vermutet, dass dieser Kanal durch den Redoxstatus der Zelle reguliert wird (Gebremedhin *et al.*, 2008). Die K_{ATP} -Kanäle werden hingegen durch den Verlust von ATP bzw. dem Anstieg von Adenosin durch Hypoxie aktiviert, wodurch es ebenfalls zu einer Vasodilatation kommt (Kalsner, 1995; Gauthier-Rein *et al.*, 1997; Nakhostine & Lamontagne, 1993).

In den eigenen Myographie-Experimenten wurde die durch Hypoxie-induzierte Dilatation der EPAs aus Mäusen durch einen KCl-induzierten *pretone* verhindert. Möglicherweise wurde die Dilatation durch die KCl-induzierte Depolarisation außer Kraft gesetzt. In den mit U46619 vorstimulierten EPAs war eine Tendenz in Richtung einer Dilatation zu sehen, allerdings war diese auf Grund der Variationen der Daten nicht signifikant.

Die großen intrapulmonalen Arterien (450-650 μm im Durchmesser) reagierten weder in Abwesenheit, noch in Anwesenheit eines *pretone*s auf Hypoxie. Es ist anzunehmen, dass diese Arterien als eine Art „Übergangs-Arterien“ fungieren, die auf Hypoxie weder mit einer vorherrschenden Vasodilatation, noch mit einer vorherrschenden Vasokonstriktion reagieren.

Im Vergleich dazu reagierten kleine intrapulmonale Arterien (80-200 μm im Durchmesser) bereits in Abwesenheit eines *pretone*s mit einer signifikanten protrahierten Kontraktion auf Hypoxie, passend zu der bisherigen Vermutung, dass die HPV in kleinen intrapulmonalen Arterien am stärksten ausgeprägt ist (Sylvester *et al.*, 2012). Diese Reaktion war monophasisch und startete nach etwa 30-40 min. In den Experimenten dieser Thesis mit isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslungen führte Hypoxie zu einer bereits bekannten biphasischen HPV, mit einer akuten und einer protrahierten Phase (Veith *et al.*, 2016; Sommer *et al.*, 2017). Auch dort startete die protrahierte Phase nach etwa 40 min. Es ist bekannt, dass

die akute Phase der HPV in isolierten Lungen aus TRPC6^{-/-} Mäusen inhibiert ist, während die protrahierte Phase intakt ist (Weissmann *et al.*, 2006). Um zu überprüfen, ob die beobachtete monophasische, protrahierte Kontraktion der kleinen IPAs aus Mäusen, der protrahierten HPV in der isolierten Mauslunge entspricht, wurde der Effekt von Hypoxie auf kleine intrapulmonale TRPC6^{-/-} IPAs untersucht. In der Tat war auch in den TRPC6^{-/-} IPAs eine protrahierte HPV unter Hypoxie zu beobachten, die vergleichbar mit der protrahierten HPV der Wildtyp-Mäuse war. Dies bestätigt die Annahme, dass die protrahierte Kontraktion von kleinen IPAs aus Mäusen der protrahierten Phase der HPV, welche in der isolierten Mäuselunge und anderen Tiermodellen beobachtet wurde, entspricht. Warum die akute HPV in IPAs aus Mäusen nicht vorhanden ist, ist nicht geklärt. Möglicherweise sind andere bzw. kleinere Arterien in der Lunge für die Generierung der akuten HPV verantwortlich. Auf Grund der angewandten Technik war es nicht möglich Arterien zu verwenden, die kleiner als 80 µm im Durchmesser sind. Die *precision cut lung slices* (PCLS)-Technik bietet die Möglichkeit die Reaktionen von IPAs aus Mäusen mit einem Durchmesser von 20-100 µm zu untersuchen. In Studien mit dieser Technik reagierten die untersuchten Gefäße auf Hypoxie mit einer monophasischen akuten HPV, die nach etwa 15 min ihr Maximum erreichte und für 30-40 min anhielt, bis die Gefäße dilatierten (Paddenberg *et al.*, 2014). Demnach scheinen IPAs mit einem Durchmesser kleiner als 100 µm für die Generierung der akuten HPV verantwortlich zu sein. Zu erklären sind die Reaktionen der unterschiedlich großen Gefäße womöglich anhand der Verteilung von glatten Muskelzellen. Die Arterien in der Lunge verlaufen entlang der Atemwege, teilen sich entsprechend der Bifurkationen und verringern demnach fortlaufend ihren Durchmesser, bis sie schließlich das Kapillarsystem in den alveolaren Wänden mit Blut versorgen. Diese arterielle Zirkulation besteht aus unterschiedlichen anatomischen und funktionalen Segmenten. Die proximalen, leitenden Arterien sind durch elastische Fasern gekennzeichnet, während die intrapulmonalen Arterien voll muskularisiert sind. IPAs gehen jedoch Schritt für Schritt in Segmente über, wo die Schicht mit glatten Muskelzellen unvollständig ist. Auf Kapillarebene sind die Gefäße völlig frei von PSMCs (Paddenberg *et al.*, 2014). Die sogenannten intraazinaren Arterien, die einen individuellen pulmonalen Azinus mit Blut versorgen, sind nur teilweise muskularisiert (Paddenberg *et al.*, 2006). Demnach repräsentiert das pulmonalarterielle System keine einheitliche Struktur und weist stattdessen eine ausgeprägte regionale Vielfalt auf, die zudem unterschiedliche Eigenschaften aufweisen könnte (Archer *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 1998). Ein weiterer Grund für die Abwesenheit einer akuten HPV in den isolierten IPAs aus Mäusen könnte das Fehlen einer Verbindung zu den Kapillaren sein. In einer Studie von Wang *et al.* (2012) wurde vermutet, dass der Sauerstoffsensoren in den alveolaren Kapillaren liegt und dass die Hypoxie-induzierte Depolarisation der Endothelmembran durch Connexin 40-enthaltende *gap junctions* von der alveolaren Region zu den Endothelzellen von intrapulmonalen Arterien geleitet wird, wo schließlich die

Freisetzung eines Vasokonstriktor veranlasst wird. In Anbetracht der Tatsache, dass in dieser Studie nur für 10 min Hypoxie appliziert wurde, ist der vorgeschlagene Mechanismus möglicherweise spezifisch ausschlaggebend für die Generierung einer akuten HPV in IPAs. In den eigenen Myographie-Experimenten hatten die Pulmonalarterien keinen Kontakt zu den Kapillaren, was die Abwesenheit einer akuten, transienten Phase der HPV erklären könnte. Erwähnenswert ist, dass Hypoxie in isolierten IPAs aus Kaninchen, Rindern und Schweinen ebenfalls eine monophasische, protrahierte Kontraktion auslöst (Talbot *et al.*, 2003; Gupte *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2001).

Die kleinen IPAs aus Mäusen reagierten in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s mit einer viel stärkeren, monophasischen und protrahierten Kontraktion. Dies war in Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s jedoch nicht der Fall. Folglich erhöht eine exogene Depolarisation die Generierung der HPV in IPAs aus Mäusen. Dies passt zu den Ergebnissen einer vorangehenden Studie, die gezeigt hat, dass die HPV von einer ROS-vermittelten Depolarisation der PASMCs aus Mäusen abhängig ist (Sommer *et al.*, 2017). In Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s erhöhte sich die Wandspannung der IPAs aus Mäusen nach 80 min sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie, signifikant. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Womöglich induziert U46619 eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bereits durch ähnliche Mechanismen wie Hypoxie, sodass Hypoxie keinen zusätzlichen Effekt haben konnte. U46619 führt in der verwendeten Konzentration bekanntlich zu einer erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Snetkov *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass die HPV zum Teil von einer Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern abhängig ist (Gelband & Gelband, 1997; Jabr *et al.*, 1997; Dipp *et al.*, 2001). Dieser Mechanismus könnte durch den Eintritt von extrazellulärem Ca^{2+} , auf Grund der Depolarisation unter Hypoxie, aktiviert werden. Da U46619 bereits eine Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern induzierte, war dieser Effekt von Hypoxie außer Kraft gesetzt.

Interessanterweise ist in isolierten IPAs aus Ratten eine andere Reaktion auf Hypoxie zu sehen. In Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s reagieren IPAs aus der Rattenlunge mit einer biphasischen Kontraktion auf Hypoxie, die durch eine schnelle, akute Kontraktion gekennzeichnet ist und nach einer vollständigen Dilatation von einer langsamen, protrahierten Kontraktion gefolgt wird (Bennie *et al.*, 1991; Strielkov *et al.*, 2013). In Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s ist diese biphasische Kontraktion der Ratten IPAs sogar verstärkt (Strielkov *et al.*, 2013). Warum die Reaktion auf Hypoxie von IPAs aus Ratten so unterschiedlich zu der Reaktion von IPAs aus Mäusen ist, liegt daher wahrscheinlich an entscheidenden Unterschieden in den Eigenschaften von PASMCs. Ein Unterschied ist z.B., dass das synthetische Analogon von Diacylglycerol, welches für die Aktivierung von TRPC-Kanälen bekannt ist, die Ionenströme durch diese nicht-selektiven Kationenkanäle in PAS-

MCs aus Mäusen erhöht, während es keinen Effekt in PASMCs aus Ratten hat (Weissmann *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2011). Außerdem wird das Membranpotential in PASMCs aus Ratten hauptsächlich durch den *acid sensitive tandem-pore domain* K⁺-Kanal (TASK-1) reguliert, während dieser in IPAs aus Mäusen keine wesentliche Rolle spielt (Manoury *et al.*, 2011).

Die HPV in IPAs aus Mäusen scheint unabhängig vom Endothel zu sein. Die erfolgreiche Entfernung des Endothels von den kleinen IPAs konnte durch die fehlende Dilatation unter ACh bestätigt werden, auf Grund der Abwesenheit von muskarinergen ACh-Rezeptoren in PASMCs (Furchgott, 1983). Da die IPAs auch nach der Entfernung des Endothels mit einer protrahierten Kontraktion auf Hypoxie reagierten, scheint die protrahierte HPV in IPAs aus Mäusen hauptsächlich von PASMCs abhängig zu sein, mit keinem oder nur einem geringen Einfluss von Endothelzellen auf die Grundmechanismen der HPV. Die Abwesenheit von vasodilatierenden Faktoren, die vom Endothel freigesetzt werden (z.B. NO), könnte dennoch einen Einfluss auf die Grundspannung der IPAs haben, in denen das Endothel entfernt wurde. Da jedoch alle untersuchten Arterien auf eine äquivalente Vorspannung gedehnt wurden, konnten derartige Einflüsse nicht beurteilt werden. Interessanterweise ist die HPV in Rindern ebenfalls unabhängig vom Endothel, während die protrahierte HPV in IPAs aus Ratten oder Schweinen nach einer Denudation des Endothels inhibiert ist (Kizub *et al.*, 2016; Chettimada *et al.*, 2012; Robertson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2001). Dies weist auf unterschiedliche Eigenschaften der Endothelzellen in den verschiedenen Spezies hin. Für die HPV in Mäusen scheinen jedoch PASMCs für die Hypoxie-induzierte Kontraktion hauptverantwortlich zu sein. Interessant ist, dass die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass das Maus-Modell wichtige Charakteristika mit humanen intrapulmonalen Arterien gemein hat. Humane IPAs kontrahieren ebenfalls, auch bereits in Abwesenheit eines *pretone*, mit einer monophasischen, protrahierten Kontraktion auf Hypoxie (Ohe *et al.*, 1992). Die HPV in humanen IPAs wird außerdem durch einen *pretone*, der eine Depolarisation induziert, verstärkt (Hoshino *et al.*, 1988). Außerdem ist diese Kontraktion von einem spannungsabhängigen Einstrom von Ca²⁺ und der Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern abhängig und durch eine Denudation des Endothels erhöht, sprich die HPV in humanen IPAs wird nicht durch einen vom Endothel-abhängigen Signalweg induziert (Ohe *et al.*, 1992; Hoshino *et al.*, 1988). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse zur Charakterisierung der HPV in IPAs aus Mäusen, dass die protrahierte HPV in kleinen intrapulmonalen Arterien lokalisiert ist. Diese ist durch eine monophasische, protrahierte Kontraktion gekennzeichnet, die unabhängig von einem funktionalen Endothel ausgebildet wird und durch eine exogene Depolarisation verstärkt werden kann. Die generierten Daten könnten demnach für die Untersuchung der Mechanismen der HPV in isolierten IPAs aus Mäusen nützlich für weitere Studien sein.

4.2 Der Einfluss einer inhibierten EET-Synthese/-Degradation auf die protrahierte hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

Die Cytochrom-P450-Epoxygenase metabolisiert die Arachidonsäure zu vier verschiedenen Epoxyeicosatriensäure-Regioisomeren: 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET (EETs). EETs sind bisher für ihre anti-inflammatorischen, schmerzlindernden und vasodilatatorischen Eigenschaften bekannt (Spector, 2009; Schmelzer *et al.*, 2006). Die vasodilatatorischen Eigenschaften wurden hauptsächlich in Gefäßen des systemischen Kreislaufs festgestellt, wo die Freisetzung von EETs zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen führt (Spector, 2009). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass die EET-Konzentration in der Mauslunge unter Hypoxie erhöht ist (Keserü *et al.*, 2008), allerdings ist die Rolle von EETs im pulmonalen Kreislauf auf Grund der Diskrepanzen in der Literatur sehr kontrovers. Manche Studien zeigen, dass EETs bei der akuten Phase der HPV eine Rolle spielen (Keserü *et al.*, 2008; Pokreisz *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2013). Andere Studien konnten Evidenz dafür erbringen, dass EETs eine Vasodilatation in Pulmonalarterien induzieren (Stephenson *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1997). Allerdings ist die Rolle von EETs in der protrahierten HPV bis heute nicht untersucht worden. Um zu untersuchen, ob die EET-Synthese in der Generierung der protrahierten HPV in Mäusen involviert ist, wurde zunächst die Expression der CYP2J-Isoformen in den kleinen IPAs aus Mäusen untersucht. Vorherige Studien haben gezeigt, dass CYP2J-Isoformen in humanen PSMCs und PSMCs aus Ratten, sowie in der Mauslunge exprimiert werden und dass CYP2J-Isoformen mit die Hauptverantwortlichen für die Produktion von EETs im Menschen und in Mäusen sind (Zeldin *et al.*, 1996; Graves *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 1996; de Montellano, 2005).

Die *Real-Time* PCR-Ergebnisse in dieser Thesis haben gezeigt, dass alle CYP2J-Isoformen, bis auf CYP2J8, auf mRNA-Ebene in den kleinen IPAs aus Mäusen exprimiert werden. Da es keinen kommerziell erwerblichen und spezifischen Antikörper für die verschiedenen CYP2J-Isoformen von Mäusen gibt, wurde der humane CYP2J2-Antikörper für die Western Blot-Experimente verwendet. Vorherige Studien haben gezeigt, dass ein humaner CYP2J2-Antikörper an alle CYP2J-Proteine von Mäusen bindet, jedoch nicht an Proteine der anderen CYP-Unterfamilien (Ma *et al.*, 2002). Dadurch konnten immunoreaktive Proteine in den isolierten IPAs festgestellt werden, sowie in den anderen bekanntlich CYP2J-exprimierenden Organen (Leber und Niere), während keine immunoreaktiven Proteine in den nicht-CYP2J-exprimierenden Geweben (Milz und Skelettmuskel) detektiert wurden (Zhou *et al.*, 2013; Graves *et al.*, 2015). Diese Daten beweisen, dass CYP2J-Epoxygenasen in kleinen IPAs aus Mäusen exprimiert werden.

Die pharmakologische Inhibition der CYP-Epoxygenasen erfolgte mit MS-PPOH, einem Inhibitor, der speziell die Epoxidation von Arachidonsäure blockiert (Wang *et al.*, 1998). MS-PPOH führte in der verwendeten Konzentration (30 µM) zu einer Reduzierung der HPV in

IPAs aus Mäusen, jedoch nicht zu einer kompletten Inhibition der HPV. In der Studie von Brand-Schieber *et al.* (2000) wurde gezeigt, dass MS-PPOH in einer Konzentration von 30 μM die Epoxygenase-Aktivität um ca. 60 % verringert, wodurch die ledigliche Reduzierung der HPV erklärt wird. Die inhibierte Expression der CYP2J-Isoformen, die in den kleinen IPAs durch die Inkubation mit siRNA induziert wurde, führte ebenfalls zu einer Reduzierung der HPV um etwa 50 %. Durch die Behandlung mit den siRNAs gegen die CYP2J-Isoformen wurden lediglich 34–73 % der mRNA der CYP2J-Enzyme erfolgreich minimiert. Die mRNA der meist exprimierten CYP2J-Isoformen in den kleinen IPAs aus Mäusen (CYP2J9, CYP2J11, CYP2J12 und CYP2J13) wurden zu 49-57 % reduziert, was mit dem Ausmaß der Inhibition der HPV korreliert. Möglicherweise sind auch noch andere CYP-Isoformen für die EET-Synthese in der protrahierten HPV von IPAs aus Mäusen verantwortlich.

Komplett inhibiert wurde die HPV in den IPAs aus Mäusen durch den EET-Antagonisten 14,15-EEZE. 14,15-EEZE ist ein synthetisches, strukturelles Analogon zu 14,15-EET und unterscheidet sich insofern von der Struktur der originalen Version, dass die Doppelbindungen am Kohlenstoff 8,9 und 11,12 gesättigt sind. Es wurde gezeigt, dass 14,15-EEZE nicht nur die Reaktionen von 14,15-EET inhibiert, sondern auch die der anderen EET-Regioisomere (Gauthier *et al.*, 2002). In den Experimenten dieser Thesis mit isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslungen inhibierte 14,15-EEZE nicht die akute HPV. Die nicht vorhandene Inhibition der akuten HPV in der Mauslunge durch 14,15-EEZE war bereits in der Studie von Keserü *et al.* (2008) zu sehen. Erst nachdem dort zusätzlich die lösliche Epoxidhydrolase inhibiert wurde, konnte ein Effekt auf die akute HPV durch 14,15-EEZE erzielt werden, da die EET-Synthese generell erhöht war (sprich bereits unter Normoxie) (Keserü *et al.*, 2008). Dies lässt vermuten, dass der Einfluss von EETs auf die akute HPV nicht sonderlich groß ist. Widersprüchlich dazu wurde in Studien von Pokreisz *et al.* (2006) und Zhou *et al.* (2013) gezeigt, dass die gehemmte Aktivität der CYP-Epoxygenase die akute HPV in Mäusen signifikant reduziert. Der Grund für die Widersprüche in der Literatur ist jedoch unklar. Im Gegensatz dazu wurde in den Experimenten dieser Thesis mit isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslungen die protrahierte HPV durch 14,15-EEZE komplett inhibiert.

Die lösliche Epoxidhydrolase metabolisiert Epoxide, durch eine katalytische Addition eines Wassermoleküls, zu ihren entsprechenden Diolen (Rose *et al.*, 2010). Die Inaktivität der sEH führt demnach zu einem Anstieg der EET-Konzentration und einer Potenzierung der damit verbundenen Reaktionen. Im Rahmen dieser Studie wurde der Inhibitor TPPU und eine gegen Ephx2 gerichtete siRNA für die Inhibition der sEH verwendet. TPPU ist ein substituierter, Phenyl-enthaltender und auf Harnstoff basierender Inhibitor, der laut vorheriger Studien metabolisch stabil und effektiv für die Blockierung der sEH in Mäusen und Menschen geeignet ist (Rose *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). Sowohl die Inkubation mit TPPU, als auch der *knock-down* des Gens der löslichen Epoxidhydrolase mit siRNA, führte zu einer Erhöhung der HPV

in Mäusen um über 100 %. Sprich eine erhöhte Konzentration von EETs führt unter hypoxischen Begebenheiten zu einer verstärkten protrahierten HPV. Theoretisch könnte dies auch bedeuten, dass Hypoxie zu einer Inhibition der sEH-Aktivität führt, anstatt zu einer Erhöhung der Aktivität von CYP2J-Epoxygenasen. Zu beachten ist jedoch, dass TPPU keinen Einfluss auf die Wandspannung unter Normoxie hatte, sprich die alleinige Erhöhung der EET-Konzentration reicht nicht aus, um eine Kontraktion auszulösen. Außerdem würde dies bedeuten, dass eine pharmakologische Inhibition der sEH-Aktivität zu einer Verringerung der hypoxischen Reaktion führen müsste, da Hypoxie keinen weiteren Effekt auf die sEH-Aktivität haben könnte, wenn diese bereits herabgesetzt wurde. Dies war jedoch nicht der Fall. Stattdessen wurde die HPV durch die Inaktivität der sEH um über 100 % verstärkt.

Zu erwähnen ist, dass die verwendeten Inhibitoren MS-PPOH und TPPU keinen Einfluss auf KCl- oder U46619-induzierte Kontraktionen hatten und somit vermutlich spezifisch in den Signalweg der HPV eingegriffen haben. Der EET-Antagonist 14,15-EEZE hatte keinen Einfluss auf KCl-induzierte Kontraktionen, allerdings führte er zu einer Verringerung der U46619-induzierten Kontraktionen. Dies mag daran liegen, dass 14,15-EEZE auch teilweise als Agonist fungiert. Darauf wird später näher eingegangen.

Folglich zeigen diese Ergebnisse, dass Hypoxie scheinbar eine vermehrte EET-Synthese durch CYP2J-Epoxygenasen induziert (und womöglich auch noch durch andere CYP-Epoxygenasen), woraus die Entwicklung der protrahierten HPV in kleinen IPAs aus Mäusen resultiert.

4.3 Der Effekt von EETs auf den pulmonalen Tonus von Mäusen

Alle EET-Regioisomere hatten in Abwesenheit eines *pretone*s keinen Effekt auf die Wandspannung der kleinen IPAs. Die exogene Applikation von EETs auf IPAs aus Mäusen und Mauslungen hat gezeigt, dass die Reaktion auf EETs von der Art der Vorstimulierung und vom EET-Regioisomer abhängig ist. So wurde in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretone*s nur durch 5,6-EET (und nicht durch das 5,6-EET-Metabolit (5,6-DHET) oder durch die anderen EET-Regioisomere) eine Vasokonstriktion von IPAs aus Mäusen ausgelöst, während in Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s alle EET-Regioisomere eine Dilatation auslösten. In diesem Fall war jedoch die Dilatation unter 5,6-EET am geringsten ausgeprägt. Interessant ist auch, dass in Anwesenheit von U46619 die Applikation von 14,15-EEZE ebenfalls zu einer Dilatation der kleinen IPAs aus Mäusen führte. Demnach scheint 14,15-EEZE auch teilweise als Agonist zu fungieren. Dies wurde bereits in vorherigen Studien beschrieben (Gauthier *et al.*, 2002; Harrington *et al.*, 2004). Anhand dieser Daten scheint 5,6-EET eine besondere Rolle in der Regulation des Tonus von pulmonalen Arterien zu spielen. Die Tatsache, dass ein EET-Regioisomer unterschiedliche Effekte hat (ab-

hängig von der Art der Vorstimulierung der Gefäße), erklärt zudem die Diskrepanzen in der Literatur, in denen sowohl eine Vasodilatation als auch eine Vasokonstriktion nach der Applikation von EETs beschrieben wurde (Tan *et al.*, 1997; Stephenson *et al.*, 1998; Fuloria *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2002; Keserü *et al.*, 2008). Z. B. induzierte 5,6-EET in den Studien von Tan *et al.* eine Vasodilatation von isolierten Kaninchenlungen, die mit U46619 vorstimuliert wurden. Diese Dilatation konnte durch einen Inhibitor für die NO-Synthase inhibiert werden (Tan *et al.*, 1997). Vergleichbar dazu beobachteten Stephenson *et al.*, dass 5,6-EET eine Verringerung des pulmonalen vaskulären Widerstands in isolierten und perfundierten Lungen aus Hunden verursacht, die ebenfalls mit U46619 vorstimuliert wurden. Diese Verringerung des pulmonalen vaskulären Widerstands durch 5,6-EET war nicht in Abwesenheit eines U46619-induzierten *pretones* zu sehen (Stephenson *et al.*, 1998). Erklärt wurden die vasodilatierenden Eigenschaften von EETs bisher hauptsächlich anhand von Untersuchungen in systemischen Gefäßen. Dort wurde vermutet, dass EETs als hyperpolarisierende Faktoren fungieren, die vom Endothel freigesetzt werden und eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und die Aktivierung von Calcium-aktivierten K⁺-Kanälen in PASMCs induzieren (Spector, 2009). Möglicherweise ist dies auch der zu Grunde liegende Mechanismus der EET-induzierten Vasodilatation in Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretones* in den kleinen IPAs aus Mäusen.

Im Folgenden konzentriert sich die Thesis auf die Mechanismen der EET-induzierten Kontraktion von kleinen IPAs aus Mäusen: In den Untersuchungen dieser Thesis löste 5,6-EET nur in IPAs eine Kontraktion aus und nicht in isolierten Aorten oder Femoralarterien. Dies lässt vermuten, dass 5,6-EET möglicherweise spezifisch eine Kontraktion in pulmonalen und nicht in systemischen Arterien auslöst. Die Tatsache, dass scheinbar eine Erhöhung der EET-Synthese in der HPV involviert und in Mäusen unabhängig vom Endothel ist, bedeutet, dass spezifisch 5,6-EET unter hypoxischen Bedingungen in den PASMCs produziert wird und dort wahrscheinlich als autokriner Faktor fungiert. Der mögliche Mechanismus der EET-induzierten pulmonalen Vasokonstriktion ist jedoch unbekannt. Die vasokontrahierenden Eigenschaften von 5,6-EET in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretones* weisen darauf hin, dass die Reaktion der IPAs auf 5,6-EET abhängig vom Membranpotential der PASMCs ist. Es ist bekannt, dass eine erhöhte extrazelluläre K⁺-Konzentration eine Depolarisation in PASMCs auslöst, wodurch Ca²⁺ in die Zelle einströmt. Das Thromboxan-Mimetikum U46619 führt in der verwendeten Konzentration jedoch zu einer erhöhten [Ca²⁺]_i durch die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern und hat demnach keinen signifikanten Einfluss auf das Membranpotential der PASMCs (Snetkov *et al.*, 2006). In Anbetracht der Tatsache, dass 5,6-EET nur in Anwesenheit eines KCl-induzierten *pretones* eine Kontraktion der kleinen IPAs aus Mäusen auslöste, kann angenommen werden, dass eine Depolarisation der PASMC-Membran ausschlaggebend für diese Reaktion ist.

4.4 Die Mechanismen der 5,6-EET-induzierten Kontraktion

Anhand der *Patch Clamp*-Experimente war zu sehen, dass Hypoxie eine Depolarisation der Zellmembran in PASMCs von etwa -37 mV auf -24 mV induziert. Daraufhin wurde der Effekt von 5,6-EET bei einem Haltepotential von -40 mV und -20 mV untersucht. Dabei war zu sehen, dass 5,6-EET nur in depolarisierten PASMCs aus Mäusen signifikante Einwärtsströme in die Zelle induziert und nicht in PASMCs, deren Membranpotential ähnlich dem Ruhepotential war. Außerdem konnte eine Kontraktion durch 5,6-EET in Anwesenheit von 4-AP, einem Inhibitor für K_V -Kanäle, induziert werden. Diese Daten sprechen dafür, dass die 5,6-EET-induzierte Kontraktion eindeutig von einer Depolarisation der PASMC-Membran abhängt. Diese Schlussfolgerung ist passend zu der Tatsache, dass Hypoxie eine signifikante Erhöhung des Membranpotentials von PASMCs aus Mäusen induzierte. Es wird vermutet, dass Hypoxie zu einer Depolarisation der PASMC-Membran durch die Schließung von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen führt. Dabei sind wahrscheinlich die Redox-sensitiven K^+ -Kanäle $K_V1.5$ und $K_V2.1$ in die Mechanismen der HPV involviert (Archer *et al.*, 1998; Firth *et al.*, 2011). Zudem wurde vor kurzem berichtet, dass die Hypoxie-induzierte Schließung der K_V -Kanäle durch eine COX4i2-vermittelte ROS-Produktion in PASMCs aus Mäusen ausgelöst wird (Sommer *et al.*, 2017). Paddenberg *et al.* (2012) haben ebenfalls gezeigt, dass die monophasische HPV in den PCLS von Mäusen mit einer erhöhten ROS-Produktion korreliert, die einen funktionalen Komplex II und III der mitochondrialen Atmungskette benötigt. Daher kann angenommen werden, dass eine erhöhte mitochondriale ROS-Produktion eine Grundvoraussetzung für die 5,6-EET-induzierte pulmonale Vasokonstriktion unter Hypoxie ist. Die Hauptfunktion von Mitochondrien ist die Produktion von Energie in Form von ATP. Während der Elektronentransportkette werden jedoch ROS (vor allem Superoxid) gebildet, welche von der Superoxiddismutase 2 zu H_2O_2 umgewandelt werden (Dunham-Snary *et al.*, 2017). H_2O_2 ist ein diffusionsfähiger Redox-Mediator, welcher die Aktivität von Redox-sensitiven Ionenkanälen und Enzymen verändern kann (Michelakis *et al.*, 2002; Michelakis *et al.*, 2004). In der Tat führte die vorherige Applikation von H_2O_2 in den IPAs aus Mäusen zu einer Kontraktion als Antwort auf 5,6-EET (vergleichbar zu den Experimenten mit einem KCl-induzierten *pretone*). Zu beachten ist, dass die vasodilatorischen Eigenschaften von EETs wahrscheinlich unter hypoxischen Bedingungen inhibiert sind, da diese von einer Hyperpolarisation der PASMC-Membran abhängen.

Die erhöhte Konzentration von 5,6-EET unter Hypoxie könnte durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) initiiert sein. Es wurde gezeigt, dass Hypoxie zu einer Aktivierung der G6PD führt, wodurch es zu einer Erhöhung der NADPH-Konzentration in pulmonalen Arterien kommt (Gupte *et al.*, 2010). Der *knockdown* von G6PD führte zudem zu einer inhibierten HPV in IPAs aus Rindern (Rawat *et al.*, 2010). Es ist bekannt, dass NADPH ein Co-Faktor für die EET-Synthese durch CYP-Epoxygenasen ist (Capdevila *et al.*, 2000),

daher ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Hypoxie-induzierte Aktivierung der G6PD zu der erhöhten EET-Konzentration führt. Dies bedarf jedoch weiterer Studien.

Die 5,6-EET-induzierten Einwärtströme sind wahrscheinlich Einstöme von Ca^{2+} -Ionen, da 5,6-EET die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in depolarisierten PSMCs erhöhte. In der Tat konnte die 5,6-EET-induzierte Kontraktion durch den Inhibitor für L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Nifedipin) gehemmt werden, was darauf hinweist, dass der 5,6-EET-induzierte Ca^{2+} -Einstrom durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle vermittelt wird. Der exakte Mechanismus, wie 5,6-EET die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in depolarisierten PSMCs erhöht und eine Kontraktion induziert, ist unerforscht. Die induzierte Schließung der K_V -Kanäle durch 4-AP und H_2O_2 hatte keinen Einfluss auf die Wandspannung der IPAs aus Mäusen in Abwesenheit von 5,6-EET. Demnach führt allein die Schließung von K_V -Kanälen in PSMCs, ohne zusätzliche Kationenströme, nicht zu einer Kontraktion. Dies ist auch in vorherigen Studien vermutet worden (Cha *et al.*, 2008; Sylvester *et al.*, 2012; Bonnet *et al.*, 2002). Außerdem scheinen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in PSMCs aus Mäusen nur teilweise durch die Hypoxie-induzierte Depolarisation aktiviert zu werden. Ko *et al.* (2013) haben beschrieben, dass L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in PSMCs aus Mäusen zwar bei einem Membranpotential von etwa -30 mV aktiviert werden, jedoch ist die maximale Aktivität bei +10 mV erreicht. Die Hypoxie-induzierte Depolarisation auf -24 mV aktiviert die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle demnach nur teilweise. Da die 5,6-EET-induzierte Kontraktion abhängig vom Membranpotential war und durch Nifedipin inhibiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass 5,6-EET die Öffnung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen unter Hypoxie in geringeren Spannungen verstärkt und so zu einem Eintritt von Ca^{2+} führt. So wurde z.B. in Herzmuskelzellen von Mäusen, die die humane CYP2J2-Epoxygenase überexprimieren, ein erhöhter Ionenstrom durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle festgestellt, was zudem durch den Epoxygenase-Inhibitor MS-PPOH reduziert werden konnte (Xiao *et al.*, 2004). Es wurde zudem gezeigt, dass EETs direkt mit L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen in Herzmuskelzellen von Schweinen interagieren können und dass dies durch eine Interaktion über die Lipid-Phase entsteht (Chen *et al.*, 1999). Hypothetisch gesehen, könnte 5,6-EET Ca^{2+} - und/oder Na^+ -Einstöme in PSMCs auch durch andere Ionenkanäle induzieren. Watanabe *et al.* (2003) haben festgestellt, dass 5,6-EET (aber kein anderes EET-Regioisomer) den Ionenstrom durch TRPV4-Kanäle (nicht-selektive Kationen-Kanäle) erhöht. Dies soll ebenfalls durch spezifische Bindestellen für 5,6-EET im TRPV4-Kanal entstehen (Berna-Erro *et al.*, 2017). Die Involvierung dieses Kanals in der protrahierten HPV wurde jedoch bisher nicht untersucht. Interessant ist auch, dass 5,6-EET in Anwesenheit von KCl eine Kontraktion von intrapulmonalen Arterien aus Kaninchen auslöste, die zudem mit einer erhöhten Phosphorylierung der leichten Myosin-Kette einherging und die durch den Rho Kinase-Inhibitor Y-27632 gehemmt werden konnte (Zeldin *et al.*, 1995; Losapio *et al.*, 2005). Der Identifizierung des exakten Mechanismus der 5,6-induzierten pulmonalen Vasokonstriktion bedarf jedoch weiterer Studien.

4.5 Fazit

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse im Rahmen dieser Thesis, dass die protrahierte HPV in Mäusen durch eine Aktivierung der EET-Synthese initiiert wird. Dabei ist vermutlich spezifisch 5,6-EET in die HPV involviert, da nur dieses EET-Regioisomer eine Kontraktion in IPAs aus Mäusen auslösen konnte. Die 5,6-EET-induzierte Vasokonstriktion scheint außerdem von einer Depolarisation der Zellmembran von PASMCs abhängig zu sein, welche unter Hypoxie auftritt. Die 5,6-EET-induzierte Kontraktion wird zudem höchstwahrscheinlich durch den Eintritt von Ca^{2+} über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle vermittelt (siehe Abb. 31). Der exakte

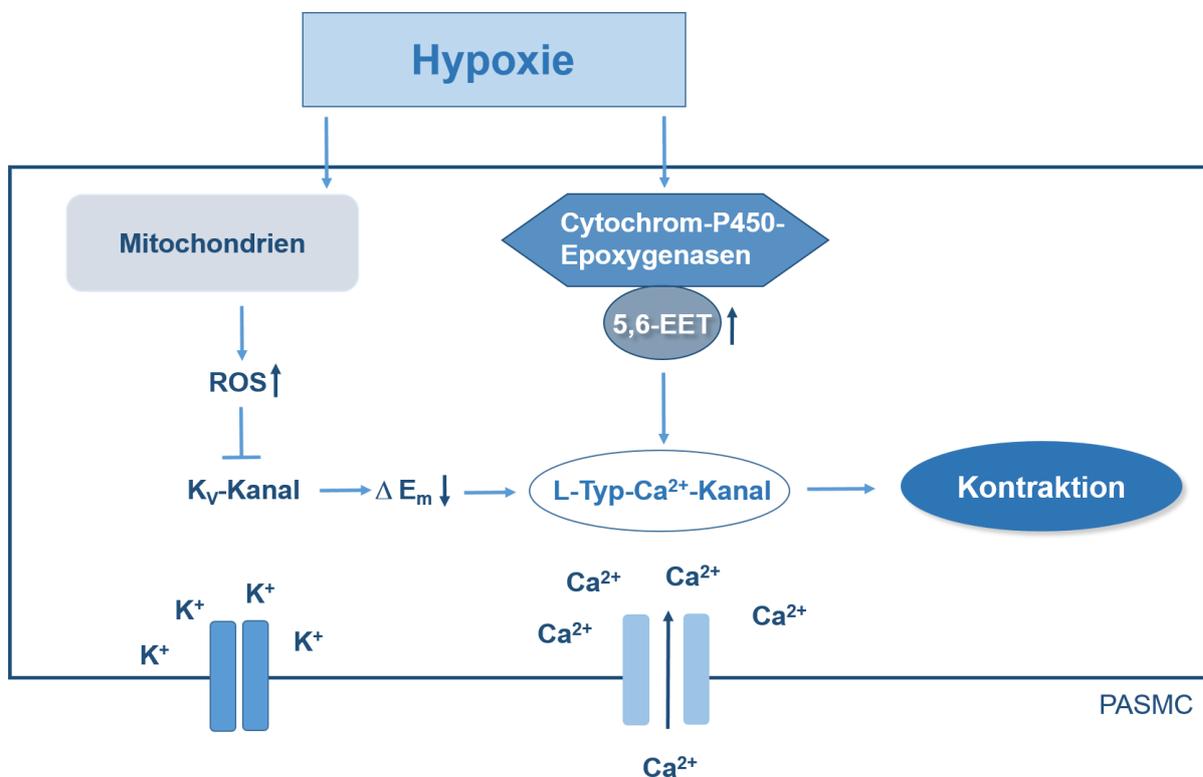


Abbildung 31. Vorgeschlagener Mechanismus der protrahierten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. Hypoxie induziert in PASMCs eine erhöhte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus Mitochondrien, wodurch es zu einer Inhibition der spannungsabhängigen K⁺-Kanäle (K_v-Kanal) und dadurch zu einer Verringerung des Membranpotentials (ΔE_m) kommt. Gleichzeitig werden Cytochrom-P450-Epoxygenasen aktiviert, die vermehrt 5,6-EET bilden und in Anwesenheit eines depolarisierten Membranpotentials führt dies zu einer verstärkten Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ansteigt und es folglich zu einer Kontraktion kommt.

Mechanismus, der zur Aktivierung der EET-Synthese unter Hypoxie führt, bleibt zu untersuchen. Die Daten dieser Thesis bieten eine Basis für weitere Studien zur Rolle des EET-Signalwegs in der Entwicklung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.

4.6 Relevanz der Ergebnisse

Die HPV ist ein wichtiger physiologischer Mechanismus, der unter lokaler alveolärer Hypoxie die Ventilation an die Perfusion anpasst. Bestehen jedoch globale hypoxische Bedingungen in der Lunge, wie es bei chronischen Atemwegserkrankungen oder einem Aufstieg in großen Höhenlagen gegeben ist, kann die generalisierte, protrahierte HPV zu der Entwicklung einer Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie beitragen (Strielkov *et al.*, 2017). Das Vorkommen der pulmonalen Hypertonie (Gruppe 1-4) steigt weiter an und betraf im Jahr 2012 127,3 Patienten in einer Population von 100.000 adulten Menschen, während es im Jahr 1993 noch 99,8 Patienten waren. Zudem steigt die Mortalitätsrate weiter an und liegt 5 Jahre nach der Diagnose von PH bei ca. 63 % und ist in der PH-Gruppe 2 und 3 am höchsten (Wijeratne *et al.*, 2018). Verfügbare Therapien gegen diese Krankheit bieten keine Heilung, sondern lindern lediglich die Beschwerden. Die meisten angewandten Medikamente verstärken dafür den Signalweg der Vasodilatation, um so der protrahierten Vasokonstriktion entgegen zu wirken (Stasch *et al.*, 2011; Ghofrani *et al.*, 2013). Allerdings sind die bisherigen Therapien auf Grund der geringen Verbesserung des Krankheitsverlaufs und der zahlreichen Nebenwirkungen alles andere als optimal (Badesch *et al.*, 2002; Badesch *et al.*, 2004; Karatza *et al.*, 2005; Rosenkranz *et al.*, 2015; Archer *et al.*, 2010).

Eine beeinträchtigte HPV trägt stattdessen zu einer systemischen Hypoxämie bei, welche in Patienten mit dem akuten Atemnotsyndrom, einer Sepsis und einer Pneumonie aufreten kann. Die Ursache davon ist wahrscheinlich eine akute Entzündungsreaktion in der Lunge mit einer verstärkten Vasodilatation (Fischer *et al.*, 1997; McCormack & Paterson, 1993; Rouby *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 1994). In Anbetracht dessen sind für die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung von HPV-bedingten Krankheiten weitere Untersuchungen wichtig, die zu einem umfassenden Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen der HPV führen. Die Daten dieser Thesis zeigen zum ersten Mal, dass die protrahierte HPV stark von einer Aktivierung der EET-Synthese abhängt (zumindest in IPAs aus Mäusen). 5,6-EET scheint spezifisch für die Vasokonstriktion der kleinen IPAs aus Mäusen verantwortlich zu sein, da alle anderen EET-Regioisomere keinen Effekt in Anwesenheit einer Depolarisation-induzierten Vorstimulierung hatten. In Anwesenheit eines U44619-induzierten *pretones* führte 5,6-EET zu einer Vasodilatation der kleinen IPAs aus Mäusen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Reaktion von PSMCs auf 5,6-EET von deren Membranpotential abhängt. Dieser Mechanismus erklärt die Diskrepanzen in der Literatur, da bisher so-

wohl vasodilatierende, als auch vasokontrahierende Eigenschaften von EETs in der pulmonalen Zirkulation beschrieben wurden (Tan *et al.*, 1997; Stephenson *et al.*, 1998; Fuloria *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2002; Keserü *et al.*, 2008). Zudem könnte dieses Wissen für die Manipulation des vasomotorischen Tonus von IPAs unter pathophysiologischen Bedingungen genutzt werden. So könnte z.B. ein „Umschalten“ des EET-Signalweges zur Vasodilatation in Hypoxie-bedingten Krankheiten von Vorteil sein, um die protrahierte Kontraktion zu verhindern. Andererseits wäre eine erhöhte EET-Konzentration durch eine Inhibition der löslichen Epoxidhydrolase für Krankheiten von Vorteil, in denen die HPV verringert ist. Die vorgestellte Studie erweitert damit das Wissen über den möglichen Mechanismus der protrahierten HPV und könnte so Teil einer Basis für die Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten zur Behandlung von HPV-bedingten Krankheiten sein.

5. Zusammenfassung

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) ist eine physiologische, intrinsische Reaktion in pulmonalen Arterien, die den Blutfluss von schlecht belüfteten Azini zu besser ventilierten Arealen der Lunge umleitet, um so den Gasaustausch zu optimieren. Bei langanhaltender, generalisierter Hypoxie, z.B. hervorgerufen durch Lungen- oder neuromuskuläre Erkrankungen oder durch einen Aufstieg in großer Höhe, trägt eine verstärkte protrahierte HPV zur Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie (PH) und einem Rechtsherzversagen bei. Bisherige Therapien gegen PH lindern die Symptome, versprechen jedoch keine Heilung und sind zudem mit starken Nebenwirkungen verbunden. In Anbetracht dessen ist es wichtig, ein weiteres Verständnis für die zu Grunde liegenden physiologischen Mechanismen der HPV zu erlangen, um neue therapeutische Strategien entwickeln zu können. Frühere Studien zeigen, dass die protrahierte HPV durch einen bisher unbekanntem Vasokonstriktor, welcher in pulmonalen Arterien freigesetzt wird, induziert wird. Vermutlich handelt es sich dabei um Metabolite der Cytochrom-P450 (CYP)-Epoxygenase, sogenannte Epoxyeicosatriensäuren (EETs). Das Ziel der vorliegenden Thesis war es, die Involvierung von EETs in der protrahierten HPV zu untersuchen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde das Modell der HPV in isolierten, pulmonalen Arterien der Maus etabliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass kleine intrapulmonale Arterien (IPAs; 80-200 µm im Durchmesser), jedoch nicht große intrapulmonale Arterien (450-650 µm) oder extrapulmonale Arterien (EPAs; 500-700 µm), eine protrahierte, sich langsam entwickelnde HPV aufweisen. Die Reaktion auf Hypoxie war unabhängig von der Anwesenheit des Endothels und konnte durch eine Vorstimulierung der Arterien mit Kaliumchlorid potenziert werden. Von sieben Isoformen der EET-produzierenden CYP2J-Epoxygenasen wurden sechs in den IPAs aus Mäusen exprimiert. Die pharmakologische Inhibition der EET-Synthese, durch MS-PPOH oder durch den *knockdown* der CYP2J-Isoformen, unterdrückte die HPV in den kleinen IPAs aus Mäusen. Zudem wurde die protrahierte HPV durch den EET-Antagonisten 14,15-EEZE in den kleinen IPAs aus Mäusen und in isolierten, perfundierten und ventilerten Mäuselungen aufgehoben. Die HPV wurde durch den *knockdown* des EET-degradierenden Enzyms, der löslichen Epoxidhydrolase (sEH), oder in Anwesenheit des sEH-Inhibitors (TPPU) verstärkt. Die exogene Applikation der EET-Regioisomere (5,6-, 8,9-, 11,12-, 14,15-EET) hatte keinen Effekt auf die Wandspannung in Abwesenheit eines *pretone*s, verursachte jedoch eine Dilatation der IPAs in Anwesenheit eines U46619-induzierten *pretone*s. Im Gegensatz dazu verursachte 5,6-EET, aber kein anderes Regioisomer, in Anwesenheit eines Kaliumchlorid-induzierten *pretone*s eine biphasische Kontraktion der IPAs und eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks in isolierten Mäuselungen. Zu beachten ist, dass 5,6-EET keine Kontraktion in isolierten Segmenten der Aorta und der Femoralarterien induzieren konnte.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass die HPV entscheidend von einer Inhibition der spannungsabhängigen Kaliumkanäle in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs) abhängig ist, welche unter Hypoxie durch eine Cytochrom C Oxidase Untereinheit 4 Isoform 2-vermittelte Erhöhung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies entsteht. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass Wasserstoffperoxid oder der Inhibitor für spannungsabhängige Kaliumkanäle, namens 4-Aminopyridin (4-AP), allein in der verwendeten Konzentration keinen Effekt auf den Tonus der IPAs haben. Jedoch führte 5,6-EET in Anwesenheit von einer der beiden Substanzen zu einer signifikanten Kontraktion. Die Reaktion auf 5,6-EET in IPAs, die mit 4-AP vorstimuliert wurden, wurde komplett durch den L-Typ-Calciumkanal-Antagonisten Nifedipin inhibiert. In den *Patch Clamp*-Experimenten induzierte Hypoxie eine Depolarisation in PASMCs. Die Applikation von 5,6-EET führte zu *Whole Cell*-Einwärtsströmen in PASMCs, die auf das hypoxische Niveau depolarisiert wurden, aber nicht in deren Ruhemembranpotential, welches unter normoxischen Bedingungen gegeben ist. Außerdem führte 5,6-EET in depolarisierten IPAs zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die prothrahierte HPV in IPAs aus Mäusen durch eine Aktivierung der EET-Synthese vermittelt wird. Unter allen anderen EETs scheint 5,6-EET spezifisch eine Rolle in der prothrahierten HPV zu spielen, da nur dieses Regioisomer in der Lage war eine Kontraktion von IPAs auszulösen. Die generierten Daten lassen vermuten, dass die Depolarisation in PASMCs, welche unter Hypoxie auftritt, der Schlüsselfaktor für die vasokontrahierende Antwort auf 5,6-EET ist. Womöglich fördert 5,6-EET den Eintritt von Calcium über L-Typ-Calcium-Kanäle. Der exakte Mechanismus dieser Reaktion, sowie die beitragenden Faktoren zur Aktivierung der EET-Synthese unter Hypoxie sollten in weitergehenden Untersuchungen adressiert werden. Die eigenen Ergebnisse schaffen Ansatzpunkte für weitere Studien zur Rolle des EET-Signalwegs in der Entwicklung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.

6. Summary

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is a physiological reaction intrinsic to pulmonary arteries, which redirects blood flow from poorly ventilated acini to well ventilated areas of the lung in order to optimize pulmonary gas exchange. However, in cases of prolonged generalized hypoxia, caused e.g. by lung or neuromuscular diseases or at high altitude, exaggerated sustained HPV contributes to the development of pulmonary hypertension (PH) and right heart failure. Current treatment options can help to ameliorate PH symptoms, but they provide no cure and are often associated with significant side effects. In view of this, further understanding of the underlying physiological mechanisms of HPV is important for the development of novel therapeutic strategies. Earlier reports indicate that sustained HPV may be induced by a yet unidentified vasoconstrictor, which is released in pulmonary arteries. It has been suggested that this factor may be a cytochrome P450 (CYP) epoxygenase-derived arachidonic acid metabolites, epoxyeicosatrienoic acids (EETs). The aim of the thesis was to investigate the involvement of EETs in sustained HPV. In order to achieve the aim, the model of HPV in isolated mouse pulmonary arteries was established. It was found that small intrapulmonary arteries (IPAs, 80–200 μm in diameter), but not large intrapulmonary arteries or extrapulmonary arteries (450–650 and 500–700 μm), exhibit sustained, slowly developing HPV. This hypoxic response was not dependent on the presence of intact endothelium and could be potentiated by precontraction of IPAs with potassium chloride. Six out of seven isoforms of EET-producing CYP2J epoxygenases were found to be expressed in mouse IPAs. The pharmacological inhibition of EET synthesis with MS-PPOH or deficiency of CYP2J isoforms suppressed HPV in small IPAs. Furthermore, an EET antagonist 14,15-EEZE abolished sustained HPV in small IPAs and isolated perfused and ventilated mouse lungs. HPV in IPAs was enhanced by knockdown of the EET-degrading enzyme the soluble epoxide hydrolase (sEH) or in the presence of sEH inhibitor (TPPU). Application of exogenous EET regioisomers (5,6-, 8,9-, 11,12-, 14,15-EET) had no effect in the absence of pretone, but provoked relaxation in the presence of U46619-precontracted IPAs. In contrast, in the presence of potassium chloride-induced pretone, 5,6-EET, but not other regioisomers, caused a biphasic contraction in IPAs and an increase in pulmonary artery pressure in isolated mouse lungs. Of note, 5,6-EET was not able to elicit contraction in isolated aorta and femoral artery segments.

It has been shown recently that HPV is critically dependent on inhibition of voltage-gated potassium channels in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) induced in hypoxia by an cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2-mediated increase in reactive oxygen species production. In the present study, it has been found that hydrogen peroxide and a voltage-gated potassium channel inhibitor, called 4-aminopyridine (4-AP), had no effect on IPA

tone alone at their applied concentrations. However, in the presence of each of those agents, 5,6-EET induced significant contraction. The response to 5,6-EET in IPAs pretreated with 4-AP was completely abolished by L-type calcium channel antagonist nifedipine. In patch clamp experiments, hypoxia induced depolarization in PSMCs. The application of 5,6-EET evoked inward whole cell currents in the cells depolarized to the hypoxic level, but not at their resting membrane potential, which is given under normoxic conditions. Furthermore, 5,6-EET evoked an increase in intracellular calcium concentration in depolarized IPAs. In conclusion, the obtained results indicate that sustained HPV in mouse IPAs is mediated by activation of EET synthesis. Among all EETs, 5,6-EET specifically appears to be responsible for HPV, as only this regioisomer was able to cause contraction in IPAs. The obtained data suggest that depolarization in PSMCs, which occurs in hypoxia, is the key factor that enables vasoconstrictor response to 5,6-EET. It may be speculated that 5,6-EET facilitates calcium entry via L-type channels. The exact mechanisms of this response as well as the factors contributing to the activation of EET formation in hypoxia remain to be investigated. The own findings provide a basis for future studies on the role of the EET signaling pathway in the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension.

7. Literaturverzeichnis

- Allison, D. J., & Stanbrook, H. S. (1980).** 1979 George Simon Memorial Fellowship Award. A radiologic and physiologic investigation into hypoxic pulmonary vasoconstriction in the dog. *Investigative Radiology*, 15(3), 178-190.
- Angus, J. A., & Wright, C. E. (2000).** Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(2), 395-407.
- Archer, S. L., Huang, J. M., Reeve, H. L., Hampl, V., Tolarová, S., Michelakis, E., & Weir, E. K. (1996).** Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circulation Research*, 78(3), 431-442.
- Archer, S. L., Huang, J., Henry, T., Peterson, D., & Weir, E. K. (1993).** A redox-based O₂ sensor in rat pulmonary vasculature. *Circulation Research*, 73(6), 1100-1112.
- Archer, S. L., London, B., Hampl, V., Wu, X., Nsair, A., Puttagunta, L., Hashimoto, K., Waite, R. E., & Michelakis, E. D. (2001).** Impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice lacking the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *The FASEB Journal*, 15(10), 1801-1803.
- Archer, S. L., Nelson, D. P., & Weir, E. K. (1989).** Detection of activated O₂ species in vitro and in rat lungs by chemiluminescence. *Journal of Applied Physiology*, 67(5), 1912-1921.
- Archer, S. L., Nelson, D. P., & Weir, E. K. (1989).** Simultaneous measurement of O₂ radicals and pulmonary vascular reactivity in rat lung. *Journal of Applied Physiology*, 67(5), 1903-1911.
- Archer, S. L., Souil, E., Dinh-Xuan, A. T., Schremmer, B., Mercier, J. C., El Yaagoubi, A., Nguyen-Huu, L., Reeve, H. L., & Hampl, V. (1998).** Molecular identification of the role of voltage-gated K⁺ channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(11), 2319-2330.
- Archer, S. L., Weir, E. K., & Wilkins, M. R. (2010).** Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation*, 121(18), 2045-2066.
- Archer, S. L., Weir, E. K., Reeve, H. L., & Michelakis, E. (2000).** Molecular identification of O₂ sensors and O₂-sensitive potassium channels in the pulmonary circulation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 475, 219-240.
- Archer, S., & Michelakis, E. (2002).** The mechanism (s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O₂ sensors, and controversies. *Physiology*, 17(4), 131-137.
- Armstead, W. M. (1997).** Role of activation of calcium-sensitive K⁺ channels in NO- and hypoxia-induced pial artery vasodilation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 272(4), H1785-H1790.
- Badesch, D. B., Bodin, F., Channick, R. N., Frost, A., Rainisio, M., Robbins, I. M., Roux, S., Rubin, L. J., Simonneau, G., Sitbon, O., & Tapson, V. F. (2002).** Complete results of

the first randomized, placebo-controlled study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, in pulmonary arterial hypertension. *Current Therapeutic Research*, 63(4), 227-246.

Badesch, D. B., McLaughlin, V. V., Delcroix, M., Vizza, C., Olschewski, H., Sitbon, O., & Barst, R. J. (2004). Prostanoid therapy for pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(12 Supplement), S56-S61.

Barst, R. J., Rubin, L. J., Long, W. A., McGoon, M. D., Rich, S., Badesch, D. B., Groves, B. M., Tapson, V. F., Bourge, R. C., Brundage, B. H., Koerner, S. K., Langleben, D., Keller, C. A., Murali, S., Uretsky, B. F., Clayton, L. M., Jöbsis, M. M., Blackburn, S. D., Shortino, D., & Crow, J. W. (1996). A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*, 334(5), 296-301.

Bennie, R. E., Packer, C. S., Powell, D. R., Jin, N., & Rhoades, R. A. (1991). Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 261(2), L156-L163.

Berna-Erro, A., Izquierdo-Serra, M., Sepúlveda, R. V., Rubio-Moscardo, F., Doñate-Macián, P., Serra, S. A., Carrillo-García, J., Perálvarez-Marín, A., González-Nilo, F., Fernández-Fernández, J. M., & Valverde, M. A. (2017). Structural determinants of 5', 6'-epoxyeicosatrienoic acid binding to and activation of TRPV4 channel. *Scientific Reports*, 7(1), 10522.

Bevan, J. A., & Osher, J. V. (1972). A direct method for recording tension changes in the wall of small blood vessels in vitro. *Inflammation Research*, 2(5), 257-260.

Bonnet, S., Dubuis, E., Vandier, C., Martin, S., Marthan, R., & Savineau, J. P. (2002). Reversal of chronic hypoxia-induced alterations in pulmonary artery smooth muscle electro-mechanical coupling upon air breathing. *Cardiovascular Research*, 53(4), 1019-1028.

Brand-Schieber, E., Falck, J. F., & Schwartzman, M. (2000). Selective inhibition of arachidonic acid epoxidation in vivo. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 51(4, 1).

Campbell, W. B., Gebremedhin, D., Pratt, P. F., & Harder, D. R. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circulation Research*, 78(3), 415-423.

Capdevila, J. H., Falck, J. R., & Harris, R. C. (2000). Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *Journal of Lipid Research*, 41(2), 163-181.

Capdevila, J. H., Zeldin, D., Makita, K., Karara, A., & Falck, J. R. (1995). Cytochrome P450 and the metabolism of arachidonic acid and oxygenated eicosanoids. In *Cytochrome P450* (pp. 443-471). Springer, Boston, MA.

Cha, C. Y., Earm, K. H., Youm, J. B., Baek, E. B., Kim, S. J., & Earm, Y. E. (2008). Electrophysiological modelling of pulmonary artery smooth muscle cells in the rabbits—special consideration to the generation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 96(1-3), 399-420.

Chen, J. K., Chen, J., Imig, J. D., Wei, S., Hachey, D. L., Guthi, J. S., Falck, J. R., Capdevila, J. H., & Harris, R. C. (2008). Identification of novel endogenous cytochrome p450 arachidonate metabolites with high affinity for cannabinoid receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 24514-24524.

- Chen, J., Capdevila, J. H., Zeldin, D. C., & Rosenberg, R. L. (1999).** Inhibition of cardiac L-type calcium channels by epoxyeicosatrienoic acids. *Molecular Pharmacology*, 55(2), 288-295.
- Chettimada, S., Rawat, D. K., Dey, N., Kobelja, R., Simms, Z., Wolin, M. S., Lincoln, T. M., & Gupte, S. A. (2012).** Glc-6-PD and PKG contribute to hypoxia-induced decrease in smooth muscle cell contractile phenotype proteins in pulmonary artery. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(1), L64-L74.
- Comroe, J. H. (1966).** The main functions of the pulmonary circulation. *Circulation*, 33(1), 146-158.
- Connolly, M. J., Prieto-Lloret, J., Becker, S., Ward, J. P., & Aaronson, P. I. (2013).** Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the absence of pretone: essential role for intracellular Ca^{2+} release. *The Journal of Physiology*, 591(18), 4473-4498.
- Coppock, E. A., Martens, J. R., & Tamkun, M. M. (2001).** Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated K^+ channels. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(1), L1-L12.
- Daikh, B. E., Lasker, J. M., Raucy, J. L., & Koop, D. R. (1994).** Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 2C8 and 2C9. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271(3), 1427-1433.
- Dart, C., & Standen, N. B. (1995).** Activation of ATP-dependent K^+ channels by hypoxia in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *The Journal of Physiology*, 483(1), 29-39.
- Daut, J., Maier-Rudolph, W., von Beckerath, N., Mehrke, G., Gunther, K., & Goedel-Meinen, L. (1990).** Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science*, 247(4948), 1341-1344.
- de Montellano, P. R. O. (1995).** Oxygen activation and reactivity. In *Cytochrome P450* (pp. 245-303). Springer, Boston, MA.
- de Montellano, P. R. O. (2005).** *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Desireddi, J. R., Farrow, K. N., Marks, J. D., Waypa, G. B., & Schumacker, P. T. (2010).** Hypoxia increases ROS signaling and cytosolic Ca^{2+} in pulmonary artery smooth muscle cells of mouse lungs slices. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(5), 595-602.
- Di Augustine, R. P., & Fouts, J. R. (1969).** The effects of unsaturated fatty acids on hepatic microsomal drug metabolism and cytochrome P-450. *Biochemical Journal*, 115(3), 547-554.
- Dietrich, A., y Schnitzler, M. M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaja, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., Essin, K., Pinkenburg, O., Luft, F. C., Gudermann, T., & Birnbaumer, L. (2005).** Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), 6980-6989.
- Dipp, M., Nye, P. C., & Evans, A. M. (2001).** Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of pulmonary artery smooth muscle. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(2), L318-L325.

- Dunham-Snary, K. J., Wu, D., Sykes, E. A., Thakrar, A., Parlow, L. R., Mewburn, J. D., Parlow, J. L., & Archer, S. L. (2017).** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: from molecular mechanisms to medicine. *Chest*, 151(1), 181-192.
- Edelstein, A. D., Tsuchida, M. A., Amodaj, N., Pinkard, H., Vale, R. D., & Stuurman, N. (2014).** Advanced methods of microscope control using μ Manager software. *Journal of Biological Methods*, 1(2).
- Euler, U. V., & Liljestrand, G. (1946).** Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 12(4), 301-320.
- Evans, A. M., Osipenko, O. N., & Gurney, A. M. (1996).** Properties of a novel K^+ current that is active at resting potential in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *The Journal of Physiology*, 496(2), 407-420.
- Fang, X., Kaduce, T. L., Weintraub, N. L., & Spector, A. A. (1997).** Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid: rapid incorporation and hydration of 14, 15-epoxyeicosatrienoic acid in arterial smooth muscle cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 57(4-5), 367-371.
- Fang, X., Kaduce, T. L., Weintraub, N. L., Harmon, S., Teesch, L. M., Morisseau, C., Thompson, D. A., Hammock, B. D., & Spector, A. A. (2001).** Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells: implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14867-14874.
- Fang, X., Weintraub, N. L., Stoll, L. L., & Spector, A. A. (1999).** Epoxyeicosatrienoic acids increase intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 34(6), 1242-1246.
- Faraci, F. M., Kilgore Jr, D. L., & Fedde, M. R. (1984).** Attenuated pulmonary pressor response to hypoxia in bar-headed geese. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 247(2), R402-R403.
- Fer, M., Dréano, Y., Lucas, D., Corcos, L., Salaün, J. P., Berthou, F., & Amet, Y. (2008).** Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 471(2), 116-125.
- Firth, A. L., Gordienko, D. V., Yuill, K. H., & Smirnov, S. V. (2009).** Cellular localization of mitochondria contributes to Kv channel-mediated regulation of cellular excitability in pulmonary but not mesenteric circulation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 296(3), L347-L360.
- Firth, A. L., Remillard, C. V., Platoshyn, O., Fantozzi, I., Ko, E. A., & Yuan, J. X. J. (2011).** Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. *Pulmonary Circulation*, 1(1), 48-71.
- Fischer, S. R., Deyo, D. J., Bone, H. G., McGuire, R. O. Y., Traber, L. D., & Traber, D. L. (1997).** Nitric oxide synthase inhibition restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156(3), 833-839.
- Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D. R., Fleming, I., & Busse, R. (1999).** Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, 401(6752), 493.
- Fleming, I. (2004).** Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase (s). *Pharmacological Research*, 49(6), 525-533.

- Fuloria, M., Kovacs, N., Smith, T. K., & Aschner, J. L. (1998).** The Effects of 11, 12-Epoxyeicosatrienoic Acid (11, 12-EET) on Isolated Blood Vessels from the Newborn Pulmonary Circulation† 1651. *Pediatric Research*, 43(S4), 282.
- Furchgott, R. F. (1983).** Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation Research*, 53(5), 557-573.
- Gaine, S. P., Hales, M. A., & Flavahan, N. A. (1998).** Hypoxic pulmonary endothelial cells release a diffusible contractile factor distinct from endothelin. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 274(4), L657-L664.
- Gauthier, K. M., Deeter, C., Krishna, U. M., Reddy, Y. K., Bondlela, M., Falck, J. R., & Campbell, W. B. (2002).** 14, 15-Epoxyeicosa-5 (Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circulation Research*, 90(9), 1028-1036.
- Gauthier-Rein, K. M., Bizub, D. M., Lombard, J. H., & Rusch, N. J. (1997).** Hypoxia-induced hyperpolarization is not associated with vasodilation of bovine coronary resistance arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 272(3), H1462-H1469.
- Gebremedhin, D., Bonnet, P., Greene, A. S., England, S. K., Rusch, N. J., Lombard, J. H., & Harder, D. R. (1994).** Hypoxia increases the activity of Ca²⁺-sensitive K⁺ channels in cat cerebral arterial muscle cell membranes. *Pflügers Archiv*, 428(5-6), 621-630.
- Gebremedhin, D., Yamaura, K., & Harder, D. R. (2008).** Role of 20-HETE in the hypoxia-induced activation of Ca²⁺-activated K⁺ channel currents in rat cerebral arterial muscle cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(1), H107-H120.
- Gelband, C. H., & Gelband, H. (1997).** Ca²⁺ release from intracellular stores is an initial step in hypoxic pulmonary vasoconstriction of rat pulmonary artery resistance vessels. *Circulation*, 96(10), 3647-3654.
- Ghofrani, H. A., Galiè, N., Grimminger, F., Grünig, E., Humbert, M., Jing, Z. C., Keogh, A. M., Langleben, D., Kilama, M. O., Fritsch, A., Neuser, D., & Rubin, L. J. (2013).** Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, 369(4), 330-340.
- Goldenberg, N. M., Wang, L., Ranke, H., Liedtke, W., Tabuchi, A., & Kuebler, W. M. (2015).** TRPV4 is required for hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 122(6), 1338-1348.
- Graves, J. P., Gruzdev, A., Bradbury, J. A., DeGraff, L. M., Edin, M. L., & Zeldin, D. C. (2017).** Characterization of the Tissue Distribution of the Mouse Cyp2c Subfamily by Quantitative PCR Analysis. *Drug Metabolism and Disposition*, 45(7), 807-816.
- Graves, J. P., Gruzdev, A., Bradbury, J. A., DeGraff, L. M., Li, H., House, J. S., Hoopes, S. L., Edin, M. L., & Zeldin, D. C. (2015).** Quantitative polymerase chain reaction analysis of the mouse Cyp2j subfamily: Tissue distribution and regulation. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(8), 1169-1180.
- Gupte, R. S., Rawat, D. K., Chettimada, S., Cioffi, D. L., Wolin, M. S., Gerthoffer, W. T., Mcmurtry, I. F., & Gupte, S. A. (2010).** Activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase promotes acute hypoxic pulmonary artery contraction. *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19561-19571.

- Gutierrez, G., Venbrux, A., Ignacio, E., Reiner, J., Chawla, L., & Desai, A. (2007).** The concentration of oxygen, lactate and glucose in the central veins, right heart, and pulmonary artery: a study in patients with pulmonary hypertension. *Critical Care*, 11(2), R44.
- Haimes, J., & Kelley, M. (2010).** Demonstration of a $\Delta\Delta Cq$ calculation method to compute relative gene expression from qPCR data. *Thermo Scientific Tech Note*, 1-4.
- Harrington, L. S., Falck, J. R., & Mitchell, J. A. (2004).** Not so EEZE: the 'EDHF' antagonist 14, 15 epoxyeicosa-5 (Z)-enoic acid has vasodilator properties in mesenteric arteries. *European Journal of Pharmacology*, 506(2), 165-168.
- Hercule, H. C., Schunck, W. H., Gross, V., Seringer, J., Leung, F. P., Weldon, S. M., da Costa Goncalves, A. C., Huang, Y., Luft, F. C., & Gollasch, M. (2009).** Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(1), 54-60.
- Hlastala, M. P., Lamm, W. J., Karp, A., Polissar, N. L., Starr, I. R., & Glenny, R. W. (2004).** Spatial distribution of hypoxic pulmonary vasoconstriction in the supine pig. *Journal of Applied Physiology*, 96(5), 1589-1599.
- Hoshino, Y., Obara, H., Kusunoki, M., Fujii, Y., & Iwai, S. (1988).** Hypoxic contractile response in isolated human pulmonary artery: role of calcium ion. *Journal of Applied Physiology*, 65(6), 2468-2474.
- Huang, H., Morisseau, C., Wang, J., Yang, T., Falck, J. R., Hammock, B. D., & Wang, M. H. (2007).** Increasing or stabilizing renal epoxyeicosatrienoic acid production attenuates abnormal renal function and hypertension in obese rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(1), F342-F349.
- Hukkanen, J., Pelkonen, O., Hakkola, J., & Raunio, H. (2002).** Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Critical Reviews in Toxicology*, 32(5), 391-411.
- Humbert, M., Sitbon, O., & Simonneau, G. (2004).** Treatment of pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, 351(14), 1425-1436.
- Humbert, M., Yaici, A., Sztrymf, B., & Montani, D. (2004).** Pulmonary hypertension: from genetics to treatments. *Revue de Pneumologie Clinique*, 60(4), 196-201.
- Jabr, R. I., Toland, H., Gelband, C. H., Xia Wang, X., & Hume, J. R. (1997).** Prominent role of intracellular Ca^{2+} release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology*, 122(1), 21-30.
- Jeffery, T. K., & Morrell, N. W. (2002).** Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 45(3), 173-202.
- Jiang, J. G., Chen, C. L., Card, J. W., Yang, S., Chen, J. X., Fu, X. N., Ning, Y. G.; Xiao, X., Zeldin, D. C., & Wang, D. W. (2005).** Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. *Cancer Research*, 65(11), 4707-4715.
- Kalsner, S. (1995).** Hypoxic relaxation in functionally intact cattle coronary artery segments involves K^+ ATP channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275(3), 1219-1226.

- Kamm, K. E., & Stull, J. T. (1985).** The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 25(1), 593-620.
- Karatza, A. A., Bush, A., & Magee, A. G. (2005).** Safety and efficacy of sildenafil therapy in children with pulmonary hypertension. *International Journal of Cardiology*, 100(2), 267-273.
- Kaspera, R., & Totah, R. A. (2009).** Epoxyeicosatrienoic acids: formation, metabolism and potential role in tissue physiology and pathophysiology. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 5(7), 757-771.
- Keserü, B., Barbosa-Sicard, E., Popp, R., Fisslthaler, B., Dietrich, A., Gudermann, T., Hammock, B. D., Falck, J. R., Weissmann, N., Busse, R., & Fleming, I. (2008).** Epoxyeicosatrienoic acids and the soluble epoxide hydrolase are determinants of pulmonary artery pressure and the acute hypoxic pulmonary vasoconstrictor response. *The FASEB Journal*, 22(12), 4306-4315.
- Keserü, B., Barbosa-Sicard, E., Schermuly, R. T., Tanaka, H., Hammock, B. D., Weissmann, N., Fisslthaler, B., & Fleming, I. (2009).** Hypoxia-induced pulmonary hypertension: comparison of soluble epoxide hydrolase deletion vs. inhibition. *Cardiovascular Research*, 85(1), 232-240.
- Kikuta, Y., Sogawa, K., Haniu, M., Kinoshita, M., Kusunose, E., Nojima, Y., Yamamoto, S., Ichihara, K., Kusunose, M., & Fujii-Kuriyama, Y. (1991).** A novel species of cytochrome P-450 (P-450ib) specific for the small intestine of rabbits. cDNA cloning and its expression in COS cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(27), 17821-17825.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Kaibuchi, K. (1996).** Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho Kinase). *Science*, 273(5272), 245-248.
- Kizub, I. V., Lakhkar, A., Dhagia, V., Joshi, S. R., Jiang, H., Wolin, M. S., Falck, J. R., Koduru, S. R., Errabelli, R., Jacobs, E. R., Schwartzman, M. L., & Gupte, S. A. (2016).** Involvement of gap junctions between smooth muscle cells in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction development: a potential role for 15-HETE and 20-HETE. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310(8), L772-L783.
- Knöpp, F. (2015).** Die Beteiligung der extrazellulären Matrix an der Mechanosensitivität des humanen Epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC). Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Ko, E. A., Wan, J., Yamamura, A., Zimnicka, A. M., Yamamura, H., Yoo, H. Y., Tang, H., Smith, K. A., Sundivakkam, P. C., Zeifman, A., Ayon, R. J., Makino, A., & Yuan, J. X. J. (2013).** Functional characterization of voltage-dependent Ca²⁺ channels in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells: divergent effect of ROS. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 304(11), C1042-C1052.
- Konkel, A., & Schunck, W. H. (2011).** Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814(1), 210-222.
- Korde, A. S., Yadav, V. R., Zheng, Y. M., & Wang, Y. X. (2011).** Primary role of mitochondrial Rieske iron-sulfur protein in hypoxic ROS production in pulmonary artery myocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(8), 945-952.

- Kotloff, R. M., & Thabut, G. (2011).** Lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(2), 159-171.
- Leach, R. M., Hill, H. M., Snetkov, V. A., Robertson, T. P., & Ward, J. P. (2001).** Divergent roles of glycolysis and the mitochondrial electron transport chain in hypoxic pulmonary vasoconstriction of the rat: identity of the hypoxic sensor. *The Journal of Physiology*, 536(1), 211-224.
- Lee, G. D. J. (1971).** Regulation of the pulmonary circulation. *Heart*, 33(Suppl), 15-26.
- Lee, H. C., Lu, T., Weintraub, N. L., VanRollins, M., Spector, A. A., & Shibata, E. F. (1999).** Effects of epoxyeicosatrienoic acids on the cardiac sodium channels in isolated rat ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*, 519(1), 153-168.
- Lee, H., Kim, B. W., Lee, J. W., Hong, J., Lee, J. W., Kim, H. L., Lee, J. S., & Ko, Y. G. (2017).** Extracellular reactive oxygen species are generated by a plasma membrane oxidative phosphorylation system. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 504-514.
- Li, P. L., & Campbell, W. B. (1997).** Epoxyeicosatrienoic acids activate K⁺ channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. *Circulation Research*, 80(6), 877-884.
- Liao, B., Zheng, Y. M., Yadav, V. R., Korde, A. S., & Wang, Y. X. (2011).** Hypoxia induces intracellular Ca²⁺ release by causing reactive oxygen species-mediated dissociation of FK506-binding protein 12.6 from ryanodine receptor 2 in pulmonary artery myocytes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(1), 37-47.
- Lin, M. J., Yang, X. R., Cao, Y. N., & Sham, J. S. (2007).** Hydrogen peroxide-induced Ca²⁺ mobilization in pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292(6), L1598-L1608.
- Lindgren, L., Marshall, C., & Marshall, B. E. (1985).** Hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat lungs perfused with perfluorocarbon emulsion. *Acta Physiologica Scandinavica*, 123(3), 335-338.
- Liu, J. Y., Lin, Y. P., Qiu, H., Morisseau, C., Rose, T. E., Hwang, S. H., Chiamvimonvat, N., & Hammock, B. D. (2013).** Substituted phenyl groups improve the pharmacokinetic profile and anti-inflammatory effect of urea-based soluble epoxide hydrolase inhibitors in murine models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(4-5), 619-627.
- Liu, Q., Sham, J. S. K., Shimoda, L. A., & Sylvester, J. T. (2001).** Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(5), L856-L865.
- Liu, X., Qian, Z. Y., Xie, F., Fan, W., Nelson, J. W., Xiao, X., Kaul, S., Barnes, A. P., & Alkayed, N. J. (2017).** Functional screening for G protein-coupled receptor targets of 14, 15-epoxyeicosatrienoic acid. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 132, 31-40.
- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002).** Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 80(5), 780-787.
- López-López, J. R., & Pérez-García, M. T. (2007).** Oxygen sensitive Kv channels in the carotid body. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 157(1), 65-74.

- Losapio, J. L., Sprague, R. S., Lonigro, A. J., & Stephenson, A. H. (2005).** 5,6-EET-induced contraction of intralobar pulmonary arteries depends on the activation of Rho Kinase. *Journal of Applied Physiology*, 99(4), 1391-1396.
- Lu, T., Hoshi, T., Weintraub, N. L., Spector, A. A., & Lee, H. C. (2001).** Activation of ATP-sensitive K⁺ channels by epoxyeicosatrienoic acids in rat cardiac ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*, 537(3), 811-827.
- Lumb, A. B., & Slinger, P. (2015).** Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: Physiology and Anesthetic Implications. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 122(4), 932-946.
- Ma, J., Bradbury, J. A., King, L., Maronpot, R., Davis, L. S., Breyer, M. D., & Zeldin, D. C. (2002).** Molecular cloning and characterization of mouse CYP2J6, an unstable cytochrome P450 isoform. *Biochemical Pharmacology*, 64(10), 1447-1460.
- Madden, J. A., Dawson, C. A., & Harder, D. R. (1985).** Hypoxia-induced activation in small isolated pulmonary arteries from the cat. *Journal of Applied Physiology*, 59(1), 113-118.
- Madden, J. A., Vadula, M. S., & Kurup, V. P. (1992).** Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 263(3), L384-L393.
- Makita, K., Falck, J. R., & Capdevila, J. H. (1996).** Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *The FASEB Journal*, 10(13), 1456-1463.
- Malczyk, M. (2017).** Die Rolle von TRPC-Kanälen in der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in der Maus. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Malvin, G. M., & Walker, B. R. (2001).** Sites and ionic mechanisms of hypoxic vasoconstriction in frog skin. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(5), R1308-R1314.
- Mannino, D. M., & Buist, A. S. (2007).** Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *The Lancet*, 370(9589), 765-773.
- Manoury, B., Lamalle, C., Oliveira, R., Reid, J., & Gurney, A. M. (2011).** Contractile and electrophysiological properties of pulmonary artery smooth muscle are not altered in TASK-1 knockout mice. *The Journal of Physiology*, 589(13), 3231-3246.
- Marshall, B. E., Hanson, C. W., Frasch, F., & Marshall, C. (1994).** Role of hypoxic pulmonary vasoconstriction in pulmonary gas exchange and blood flow distribution. *Intensive Care Medicine*, 20(5), 379-389.
- McCormack, D. G., & Paterson, N. A. (1993).** Loss of hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronic pneumonia is not mediated by nitric oxide. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 265(5), H1523-H1528.
- Michaelis, U. R., & Fleming, I. (2006).** From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(3), 584-595.
- Michelakis, E. D., Hampl, V., Nsair, A., Wu, X., Harry, G., Haromy, A., Gurtu, R., & Archer, S. L. (2002).** Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. *Circulation Research*, 90(12), 1307-1315.

- Michelakis, E. D., McMurtry, M. S., Wu, X. C., Dyck, J. R., Moudgil, R., Hopkins, T. A., Lopaschuk, G. D., Puttagunta, L., Waite, R., & Archer, S. L. (2002).** Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation*, 105(2), 244-250.
- Michelakis, E. D., Rebeyka, I., Wu, X., Nsair, A., Thébaud, B., Hashimoto, K., Dyck, J. R. B., Haromy, A., Harry, G., Barr, A., & Archer, S. L. (2002).** O₂ sensing in the human ductus arteriosus: regulation of voltage-gated K⁺ channels in smooth muscle cells by a mitochondrial redox sensor. *Circulation Research*, 91(6), 478-486.
- Michelakis, E. D., Thébaud, B., Weir, E. K., & Archer, S. L. (2004).** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37(6), 1119-1136.
- Morio, Y., & McMurtry, I. F. (2002).** Ca²⁺ release from ryanodine-sensitive store contributes to mechanism of hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *Journal of Applied Physiology*, 92(2), 527-534.
- Mulvany, M. J., & Halpern, W. (1977).** Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*, 41(1), 19-26.
- Murray, T. R., Chen, L., Marshall, B. E., & Macarak, E. J. (1990).** Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 3(5), 457-465.
- Nakhostine, N., & Lamontagne, D. (1993).** Adenosine contributes to hypoxia-induced vasodilation through ATP-sensitive K⁺ channel activation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 265(4), H1289-H1293.
- Nelson, D. R. (2009).** The cytochrome p450 homepage. *Human genomics*, 4(1), 59.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I. C. & Nebert, D. W. (1996).** P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1), 1-42.
- Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M., Maltais, L. J., Wain, H. M., & Nebert, D. W. (2004).** Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics and Genomics*, 14(1), 1-18.
- Ohe, M., Ogata, M., Katayose, D., & Takishima, T. (1992).** Hypoxic contraction of pre-stretched human pulmonary artery. *Respiration Physiology*, 87(1), 105-114.
- Oliw, E. H. (1994).** Oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450 monooxygenases. *Progress in Lipid Research*, 33(3), 329-354.
- Omata, K., Abraham, N. G., Escalante, B., & Schwartzman, M. L. (1992).** Age-related changes in renal cytochrome P-450 arachidonic acid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 262(1), F8-F16.

- Osipenko, O. N., Alexander, D., MacLean, M. R., & Gurney, A. M. (1998).** Influence of chronic hypoxia on the contributions of non-inactivating and delayed rectifier K currents to the resting potential and tone of rat pulmonary artery smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 124(7), 1335-1337.
- Paddenberg, R., König, P., Faulhammer, P., Goldenberg, A., Pfeil, U., & Kummer, W. (2006).** Hypoxic vasoconstriction of partial muscular intra-acinar pulmonary arteries in murine precision cut lung slices. *Respiratory Research*, 7(1), 93.
- Paddenberg, R., Mermer, P., Goldenberg, A., & Kummer, W. (2014).** Videomorphometric analysis of hypoxic pulmonary vasoconstriction of intra-pulmonary arteries using murine precision cut lung slices. *Journal of Visualized Experiments*, (83), e50970.
- Paddenberg, R., Tiefenbach, M., Faulhammer, P., Goldenberg, A., Gries, B., Pfeil, U., Lips, K. S., Piruat, J. I., López-Barneo, J., Schermuly, R. T., Weissmann, N., & Kummer, W. (2012).** Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction of intra-but not of pre-acinar arteries. *Cardiovascular Research*, 93(4), 702-710.
- Peake, M. D., Harabin, A. L., Brennan, N. J., & Sylvester, J. T. (1981).** Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species. *Journal of Applied Physiology*, 51(5), 1214-1219.
- Peng, W., Karwande, S. V., Hoidal, J. R., & Farrukh, I. S. (1996).** Potassium currents in cultured human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Journal of Applied Physiology*, 80(4), 1187-1196.
- Pérez-García, M. T., López-López, J. R., & González, C. (1999).** Kv β 1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O₂ sensitivity to Kv4.2 but not to Shaker channels. *The Journal of General Physiology*, 113(6), 897-907.
- Platoshyn, O., Brevnova, E. E., Burg, E. D., Yu, Y., Remillard, C. V., & Yuan, J. X. J. (2006).** Acute hypoxia selectively inhibits KCNA5 channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(3), C907-C916.
- Pokreisz, P., Fleming, I., Kiss, L., Barbosa-Sicard, E., Fisslthaler, B., Falck, J. R., Hammock, B. D., Kim, I. H., Szelid, Z., Vermeersch, P., Gillijns, H., Pellens, M., Grimminer, F., van Zonneveld, A. J., Collen, D., Busse, R., & Janssens, S. (2006).** Cytochrome P450 epoxygenase gene function in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary vascular remodeling. *Hypertension*, 47(4), 762-770.
- Post, J. M., Gelband, C. H., & Hume, J. R. (1995).** [Ca²⁺]_i inhibition of K⁺ channels in canine pulmonary artery: novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circulation Research*, 77(1), 131-139.
- Post, J. M., Hume, J. R., Archer, S. L., & Weir, E. K. (1992).** Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 262(4), C882-C890.
- Pozeg, Z. I., Michelakis, E. D., McMurtry, M. S., Thébaud, B., Wu, X. C., Dyck, J. R., Hashimoto, K., Wang, S., Moudgil, R., Harry, G., Sultanian, R., Koshal, A., & Archer, S. L. (2003).** In vivo gene transfer of the O₂-sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Circulation*, 107(15), 2037-2044.
- Ravenhill, T. H. (1913).** Some experiences of mountain sickness in the Andes. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 16(20).

- Rawat, D. K., Gupte, R. S., Chettimada, S., McMurtry, I. F., & Gupte, S. A. (2010).** Activation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Promotes Acute Hypoxic Pulmonary Artery Contraction. *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19561-19571.
- Redfield, A. C., Bock, A. V., & Meakins, J. C. (1922).** The measurement of the tension of oxygen and carbon dioxide in the blood of the pulmonary artery in man. *The Journal of Physiology*, 57(1-2), 76-81.
- Renz-Polster, H., Krautzing, S., & Braun, J. (2004).** Basislehrbuch Innere Medizin. 3. Aufl.: Urban und Fischer, S. 413-417.
- Revermann, M. (2010).** Pharmacological inhibition of the soluble epoxide hydrolase—from mouse to man. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(2), 173-178.
- Robertson, T. P., Aaronson, P. I., & Ward, J. P. (1995).** Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca^{2+} in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca^{2+} sensitization. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 268(1), H301-H307.
- Robertson, T. P., Aaronson, P. I., & Ward, J. P. (2003).** Ca^{2+} sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(6), L1121-L1126.
- Robertson, T. P., Dipp, M., Ward, J. P., Aaronson, P. I., & Evans, A. M. (2000).** Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. *British Journal of Pharmacology*, 131(1), 5-9.
- Robertson, T. P., Ward, J. P., & Aaronson, P. I. (2001).** Hypoxia induces the release of a pulmonary-selective, Ca^{2+} -sensitising, vasoconstrictor from the perfused rat lung. *Cardiovascular Research*, 50(1), 145-150.
- Rose, T. E., Morisseau, C., Liu, J. Y., Inceoglu, B., Jones, P. D., Sanborn, J. R., & Hammock, B. D. (2010).** 1-Aryl-3-(1-acylpiperidin-4-yl) urea inhibitors of human and murine soluble epoxide hydrolase: structure– activity relationships, pharmacokinetics, and reduction of inflammatory pain. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(19), 7067-7075.
- Rosenkranz, S., Ghofrani, H. A., Beghetti, M., Ivy, D., Frey, R., Fritsch, A., Weimann, G., Saleh, S., & Apitz, C. (2015).** Riociguat for pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. *Heart*, 101(22), 1792-1799.
- Rosolowsky, M., & Campbell, W. B. (1996).** Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1299(2), 267-277.
- Rouby, J. J., Puybasset, L., Cluzel, P., Richecoeur, J., Lu, Q., Grenier, P., & CT Scan ARDS Study Group. (2000).** Regional distribution of gas and tissue in acute respiratory distress syndrome. II. Physiological correlations and definition of an ARDS Severity Score. *Intensive Care Medicine*, 26(8), 1046-1056.
- Rubin, L. J. (1997).** Primary pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*, 336(2), 111-117.
- Rudolph, A. M., & Yuan, S. (1966).** Response of the pulmonary vasculature to hypoxia and H^+ ion concentration changes. *The Journal of Clinical Investigation*, 45(3), 399-411.

- Runo, J. R., & Loyd, J. E. (2003).** Primary pulmonary hypertension. *The Lancet*, 361(9368), 1533-1544.
- Salvaterra, C. G., & Goldman, W. F. (1993).** Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 264(3), L323-L328.
- Schmelzer, K. R., Inceoglu, B., Kubala, L., Kim, I. H., Jinks, S. L., Eiserich, J. P., & Hammock, B. D. (2006).** Enhancement of antinociception by coadministration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13646-13651.
- Schumacker, P. T. (2011).** Lung cell hypoxia: role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8(6), 477-484.
- Sham, J. S., Crenshaw Jr, B. R., Deng, L. H., Shimoda, L. A., & Sylvester, J. T. (2000).** Effects of hypoxia in porcine pulmonary arterial myocytes: roles of K_v channel and endothelin-1. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(2), L262-L272.
- Shankar, V., & Armstead, W. M. (1995).** Opioids contribute to hypoxia-induced pial artery dilation through activation of ATP-sensitive K^+ channels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 269(3), H997-H1002.
- Shirai, M., Ninomiya, I., & Sada, K. (1991).** Constrictor response of small pulmonary arteries to acute pulmonary hypertension during left atrial pressure elevation. *The Japanese Journal of Physiology*, 41(1), 129-142.
- Shirai, M., Sada, K., & Ninomiya, I. (1986).** Effects of regional alveolar hypoxia and hypercapnia on small pulmonary vessels in cats. *Journal of Applied Physiology*, 61(2), 440-448.
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Williams, P.G. & Souza, R. (2019).** Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 53(1), 1801913.
- Skovgaard, N., Abe, A. S., Andrade, D. V., & Wang, T. (2005).** Hypoxic pulmonary vasoconstriction in reptiles: a comparative study of four species with different lung structures and pulmonary blood pressures. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(5), R1280-R1288.
- Snetkov, V. A., Knock, G. A., Baxter, L., Thomas, G. D., Ward, J. P., & Aaronson, P. I. (2006).** Mechanisms of the prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced rise in $[Ca^{2+}]_i$ in rat intrapulmonary arteries. *The Journal of Physiology*, 571(1), 147-163.
- Snyder, G. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., & Spector, A. A. (2002).** Evidence for a membrane site of action for 14, 15-EET on expression of aromatase in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(5), H1936-H1942.
- Sommer, N., Dietrich, A., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Gudermann, T., Schulz, R., Seeger, W., Grimminger, F., & Weissmann, N. (2008).** Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *European Respiratory Journal*, 32(6), 1639-1651.
- Sommer, N., Hüttemann, M., Pak, O., Scheibe, S., Knoepp, F., Sinkler, C., Malczyk, M., Gierhardt, M., Esfandiary, A., Kraut, S., Jonas, F., Veith, C., Aras, S., Sydykov, A., Alebrahimdehordi, N., Giehl, K., Hecker, M., Brandes, R. P., Seeger, W., Grimminger, F.,**

- Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Grossman, L. I., & Weissmann, N. (2017).** Mitochondrial Complex IV Subunit 4 Isoform 2 Is Essential for Acute Pulmonary Oxygen Sensing. *Circulation Research*, 121(4), 424-438.
- Sommer, N., Pak, O., Schörner, S., Derfuss, T., Krug, A., Gnaiger, E., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Huckstorf, C., Seeger, W., Grimminger, F., & Weissmann, N. (2010).** Mitochondrial cytochrome redox states and respiration in acute pulmonary oxygen sensing. *European Respiratory Journal*, 36(5), 1056-1066.
- Sommer, N., Strielkov, I., Pak, O., & Weissmann, N. (2016).** Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *European Respiratory Journal*, 47(1), 288-303.
- Spector, A. A. (2009).** Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), S52-S56.
- Spector, A. A., & Norris, A. W. (2006).** Action of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) on cellular function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(3), C996-C1012.
- Spector, A. A., Fang, X., Snyder, G. D., & Weintraub, N. L. (2004).** Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Progress in Lipid Research*, 43(1), 55-90.
- Stasch, J. P., Pacher, P., & Evgenov, O. V. (2011).** Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation*, 123(20), 2263-2273.
- Stephenson, A. H., Sprague, R. S., & Lonigro, A. J. (1998).** 5,6-Epoxyeicosatrienoic acid reduces increases in pulmonary vascular resistance in the dog. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 275(1), H100-H109.
- Stephenson, A. H., Sprague, R. S., Losapio, J. L., & Lonigro, A. J. (2003).** Differential effects of 5,6-EET on segmental pulmonary vasoactivity in the rabbit. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 284(6), H2153-H2161.
- Strielkov, I. V., Kizub, I. V., Khromov, A. S., & Soloviev, A. I. (2013).** Evidence for the role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Vascular Pharmacology*, 58(4), 292-298.
- Strielkov, I., Pak, O., Sommer, N., & Weissmann, N. (2017).** Recent advances in oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Journal of Applied Physiology*, 123(6), 1647-1656.
- Sun, P., Liu, W., Lin, D. H., Yue, P., Kemp, R., Satlin, L. M., & Wang, W. H. (2009).** Epoxyeicosatrienoic acid activates B_K channels in the cortical collecting duct. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(3), 513-523.
- Swenson, E. R. (2013).** Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *High Altitude Medicine & Biology*, 14(2), 101-110.
- Sydykov, A. (2009).** Characterization of the ROS production in ischemia/reperfusion-induced lung injury. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Sylvester, J. T., Shimoda, L. A., Aaronson, P. I., & Ward, J. P. (2012).** Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiological Reviews*, 92(1), 367-520.

- Talbot, N. P., Robbins, P. A., & Dorrington, K. L. (2003).** Release by hypoxia of a soluble vasoconstrictor from rabbit small pulmonary arteries. *British Journal of Anaesthesia*, 91(4), 592-594.
- Tan, J. Z., Kaley, G., & Gurtner, G. H. (1997).** Nitric oxide and prostaglandins mediate vasodilation to 5, 6-EET in rabbit lung. In *Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury 3* (pp. 561-566). Springer, Boston, MA.
- Totzeck, M., Hendgen-Cotta, U. B., Kelm, M., & Rassaf, T. (2014).** Crosstalk between nitrite, myoglobin and reactive oxygen species to regulate vasodilation under hypoxia. *PLoS one*, 9(8), e105951.
- Totzeck, M., Hendgen-Cotta, U. B., Luedike, P., Berenbrink, M., Klare, J. P., Steinhoff, H. J., Semmler, D., Shiva, S., Williams, D., Kipar, A., Gladwin, M. T., Schrader, J., Kelm, M., Cossins, A. R., & Rassaf, T. (2012).** Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation. *Circulation*, 126(3), 325-334.
- Townsley, M. I. (2011).** Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Comprehensive Physiology*, 2(1), 675-709.
- Tsai, B. M., Wang, M., Turrentine, M. W., Mahomed, Y., Brown, J. W., & Meldrum, D. R. (2004).** Hypoxic pulmonary vasoconstriction in cardiothoracic surgery: basic mechanisms to potential therapies. *The Annals of Thoracic Surgery*, 78(1), 360-368.
- Veith, C., Kraut, S., Wilhelm, J., Sommer, N., Quanz, K., Seeger, W., Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2016).** NADPH oxidase 4 is not involved in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Pulmonary Circulation*, 6(3), 397-400.
- Vriens, J., Owsianik, G., Fisslthaler, B., Suzuki, M., Janssens, A., Voets, T., Morisseau, C., Hammock, B. D., Fleming, I., Busse, R., & Nilius, B. (2005).** Modulation of the Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circulation Research*, 97(9), 908-915.
- Wang, J., Shimoda, L. A., & Sylvester, J. T. (2012).** Ca²⁺ responses of pulmonary arterial myocytes to acute hypoxia require release from ryanodine and inositol trisphosphate receptors in sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(2), L161-L168.
- Wang, L., Yin, J., Nickles, H. T., Ranke, H., Tabuchi, A., Hoffmann, J., Tabeling, C., Barbosa-Sicard, E., Chanson, M., Kwak, B. R., Shin, H. S., Wu, S., Isakson, B. E., Witzenthath, M., de Wit, C., Fleming, I., Kuppe, H., & Kuebler, W. M. (2012).** Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 4218-4230.
- Wang, M. H., Brand-Schieber, E., Zand, B. A., Nguyen, X., Falck, J. R., Balu, N., & Schwartzman, M. L. (1998).** Cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolism in the rat kidney: characterization of selective inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(3), 966-973.
- Wang, Z., Jin, N., Ganguli, S., Swartz, D. R., Li, L., & Rhoades, R. A. (2001).** Rho Kinase activation is involved in hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 25(5), 628-635.
- Ward, J. P., & Aaronson, P. I. (1999).** Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: can anyone be right?. *Respiration Physiology*, 115(3), 261-271.

- Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., & Nilius, B. (2003).** Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*, 424(6947), 434.
- Waxman, D. J., & Chang, T. K. (1995).** Hormonal regulation of liver cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450* (pp. 391-417). Springer, Boston, MA.
- Waypa, G. B., Chandel, N. S., & Schumacker, P. T. (2001).** Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circulation Research*, 88(12), 1259-1266.
- Waypa, G. B., Guzy, R., Mungai, P. T., Mack, M. M., Marks, J. D., Roe, M. W., & Schumacker, P. T. (2006).** Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation Research*, 99(9), 970-978.
- Waypa, G. B., Marks, J. D., Guzy, R. D., Mungai, P. T., Schriewer, J. M., Dokic, D., Ball, M. K., & Schumacker, P. T. (2013).** Superoxide generated at mitochondrial complex III triggers acute responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(4), 424-432.
- Waypa, G. B., Marks, J. D., Guzy, R., Mungai, P. T., Schriewer, J., Dokic, D., & Schumacker, P. T. (2010).** Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 106(3), 526.
- Waypa, G. B., Marks, J. D., Mack, M. M., Boriboun, C., Mungai, P. T., & Schumacker, P. T. (2002).** Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circulation Research*, 91(8), 719-726.
- Weintraub, N. L., Fang, X., Kaduce, T. L., VanRollins, M., Chatterjee, P., & Spector, A. A. (1997).** Potentiation of endothelium-dependent relaxation by epoxyeicosatrienoic acids. *Circulation Research*, 81(2), 258-267.
- Weintraub, N. L., Fang, X., Kaduce, T. L., VanRollins, M., Chatterjee, P., & Spector, A. A. (1999).** Epoxide hydrolases regulate epoxyeicosatrienoic acid incorporation into coronary endothelial phospholipids. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(5), H2098-H2108.
- Weir, E. K., & Archer, S. L. (1995).** The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *The FASEB Journal*, 9(2), 183-189.
- Weissmann, N., Akkayagil, E., Quanz, K., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Fink, L., Hänze, J., Rose, F., Seeger, W., & Grimminger, F. (2004).** Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 139(2), 191-202.
- Weissmann, N., Dietrich, A., Fuchs, B., Kalwa, H., Ay, M., Dumitrascu, R., Olschewski, A., Storch, U., y Schnitzler, M. M., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Pinkenburg, O., Seeger, W., Grimminger, F., & Gudermann, T. (2006).** Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50), 19093-19098.
- Weissmann, N., Grimminger, F., Walmrath, D., & Seeger, W. (1995).** Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respiration Physiology*, 100(2), 159-169.
- Weissmann, N., Zeller, S., Schafer, R. U., Turowski, C., Ay, M., Quanz, K., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Fink, L., Seeger, W., & Grimminger, F. (2006).** Impact of mitochon-

dria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(4), 505-513.

Wijeratne, D. T., Lajkosz, K., Brogly, S. B., Lougheed, M. D., Jiang, L., Housin, A., Barber, D., Johnson, A., Doliszny, K. M., & Archer, S. L. (2018). Increasing incidence and prevalence of World Health Organization groups 1 to 4 pulmonary hypertension: a population-based cohort study in Ontario, Canada. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*, 11(2), e003973.

Wong, C. M., Cheema, A. K., Zhang, L., & Suzuki, Y. J. (2008). Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circulation Research*, 102(3), 310-318.

Wong, J., Vanderford, P. A., Winters, J. W., Chang, R., Soifer, S. J., & Fineman, J. R. (1993). Endothelin-1 does not mediate acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in the intact newborn lamb. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 22, S262-6.

Wong, P. Y. K., Lai, P. S., & Falck, J. R. (2000). Mechanism and signal transduction of 14 (R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14, 15-EET) binding in guinea pig monocytes. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 62(4), 321-333.

Wong, P. Y., Lai, P. S., Shen, S. Y., Belosludtsev, Y. Y., & Falck, J. R. (1997). Post-receptor signal transduction and regulation of 14 (R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14, 15-EET) binding in U-937 cells. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*, 16(3), 155-169.

Wong, P. Y., Lin, K. T., Yan, Y. T., Ahern, D., Iles, J., Shen, S. Y., Bhatt, R. K., & Falck, J. R. (1993). 14 (R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14 (R), 15 (S)-EET) receptor in guinea pig mononuclear cell membranes. *Journal of Lipid Mediators*, 6(1-3), 199-208.

Wu, S., Moomaw, C. R., Tomer, K. B., Falck, J. R., & Zeldin, D. C. (1996). Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3460-3468.

Xiao, Y. F. (2007). Cyclic AMP-dependent modulation of cardiac L-type Ca^{2+} and transient outward K^{+} channel activities by epoxyeicosatrienoic acids. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 82(1-4), 11-18.

Xiao, Y. F., Ke, Q., Seubert, J. M., Bradbury, A. J., Graves, J., Miller, L., Falck, J. R., Krausz, K., Gelboin, H. V., Morgan, J. P., & Zeldin, D. C. (2004). Enhancement of L-Type Ca^{2+} Currents in Transgenic Mice with Cardiac-Specific Overexpression of CYP2J2. *Molecular pharmacology*, 66(6), 1607-1616.

Yamaguchi, K., Suzuki, K., Naoki, K., Nishio, K., Sato, N., Takeshita, K., Kudo, H., Aoki, T., Suzuki, Y., Miyata, A., & Tsumura, H. (1998). Response of intra-acinar pulmonary microvessels to hypoxia, hypercapnic acidosis, and isocapnic acidosis. *Circulation Research*, 82(6), 722-728.

Yang, W., Tuniki, V. R., Anjaiah, S., Falck, J. R., Hillard, C. J., & Campbell, W. B. (2008). Characterization of epoxyeicosatrienoic acid binding site in U937 membranes using a novel radiolabeled agonist, 20-125i-14, 15-epoxyeicosa-8 (Z)-enoic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(3), 1019-1027.

Yoo, H. Y., Park, S. J., Seo, E. Y., Park, K. S., Han, J. A., Kim, K. S., Shin, D. H., Earm, Y. E., Zhang, Y. H., & Kim, S. J. (2011). Role of thromboxane A_2 -activated nonselective cation channels in hypoxic pulmonary vasoconstriction of rat. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 302(1), C307-C317.

- Yuan, X. J. (1995).** Voltage-gated K⁺ currents regulate resting membrane potential and [Ca²⁺]_i in pulmonary arterial myocytes. *Circulation Research*, 77(2), 370-378.
- Yuan, X. J., Goldman, W. F., Tod, M. L., Rubin, L. J., & Blaustein, M. P. (1993).** Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 264(2), L116-L123.
- Yuan, X. J., Tod, M. L., Rubin, L. J., & Blaustein, M. P. (1990).** Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 259(2), H281-H289.
- Yuan, X. J., Wang, J., Juhaszova, M., Golovina, V. A., & Rubin, L. J. (1998).** Molecular basis and function of voltage-gated K⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 274(4), L621-L635.
- Zeldin, D. C., Foley, J., Ma, J., Boyle, J. E., Pascual, J. M., Moomaw, C. R., Tomer, K. B., Steenbergen, C., & Wu, S. (1996).** CYP2J subfamily P450s in the lung: expression, localization, and potential functional significance. *Molecular Pharmacology*, 50(5), 1111-1117.
- Zeldin, D. C., Kobayashi, J., Falck, J. R., Winder, B. S., Hammock, B. D., Snapper, J. R., & Capdevila, J. H. (1993).** Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6402-6407.
- Zeldin, D. C., Plitman, J. D., Kobayashi, J., Miller, R. F., Snapper, J. R., Falck, J. R., Szarek, J. L., Philpot, R. M., & Capdevila, J. H. (1995).** The rabbit pulmonary cytochrome P450 arachidonic acid metabolic pathway: characterization and significance. *The Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2150-2160.
- Zhang, J., Zhou, J., Cai, L., Lu, Y., Wang, T., Zhu, L., & Hu, Q. (2012).** Extracellular calcium-sensing receptor is critical in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(3), 471-484.
- Zhang, Q. Y., Ding, X., & Kaminsky, L. S. (1997).** cDNA cloning, heterologous expression, and characterization of rat intestinal CYP2J4. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 340(2), 270-278.
- Zhou, G. L., Beloiartsev, A., Yu, B., Baron, D. M., Zhou, W., Niedra, R., Lu, N., Tainsh, L. T., Zapol, W. M., Seed, B., & Bloch, K. D. (2013).** Deletion of the murine cytochrome P450 Cyp2j locus by fused BAC-mediated recombination identifies a role for Cyp2j in the pulmonary vascular response to hypoxia. *PLoS Genetics*, 9(11), e1003950.
- Zhu, D., Bousamra, M., Zeldin, D. C., Falck, J. R., Townsley, M., Harder, D. R., Roman, R. J., & Jacobs, E. R. (2000).** Epoxyeicosatrienoic acids constrict isolated pressurized rabbit pulmonary arteries. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278(2), L335-L343.
- Zhu, L., Zhang, J., Zhou, J., Lu, Y., Huang, S., Xiao, R., Yu, X., Zeng, X., Liu, B., Liu, F., Sun, M., Dai, M., Hao, Q., Li, J., Wang, T., Li, T., & Hu, Q. (2016).** Mitochondrial transplantation attenuates hypoxic pulmonary hypertension. *Oncotarget*, 7(31), 48925.
- Zou, W., Yang, Q., Yim, A. P., & He, G. W. (2002).** Different Role of Epoxyeicosatrienoic Acids (EET_{11,12}) in Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Relaxation in Porcine Coronary and Pulmonary Micro-Arteries. *Journal of Cardiac Surgery*, 17(6), 569-569.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Der Blutkreislauf von Säugetieren.	1
Abbildung 2. Der Aufbau einer Pulmonalarterie.	2
Abbildung 3. Darstellung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion.	7
Abbildung 4. Der Verlauf der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion.	8
Abbildung 5. Die mitochondriale Elektronentransportkette.	10
Abbildung 6. Der Metabolismus der Arachidonsäure.	17
Abbildung 7. Das 4-Kammern-Myographensystem.	24
Abbildung 8. Schematische Darstellung der verwendeten pulmonalen Arterien von Mäusen.	25
Abbildung 9. Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von extrapulmonalen Arterien (500-700 μm im Durchmesser).	40
Abbildung 10. Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von großen intrapulmonalen Arterien (450-650 μm im Durchmesser).	41
Abbildung 11. Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von kleinen intrapulmonalen Arterien (80-200 μm im Durchmesser).	42
Abbildung 12. Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen nach Entfernung des Endothels.	43
Abbildung 13. Der Effekt von Hypoxie auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus TRPC6 ^{-/-} Mäusen.	44
Abbildung 14. Die Expression von CYP2J-Epoxygenase-Isoformen in kleinen IPAs aus Mäusen.	46
Abbildung 15. Der Effekt des CYP-Epoxygenase-Inhibitors MS-PPOH auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen.	47
Abbildung 16. Der Effekt des EET-Antagonisten 14,15-EEZE auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen.	48
Abbildung 17. Der Effekt des sEH-Inhibitors TPPU auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen.	48
Abbildung 18. Der Effekt von 14,15-EEZE auf die HPV in isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen aus Mäusen.	50
Abbildung 19. Der Effekt von CYP2Jx siRNA auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen.	51
Abbildung 20. Der Effekt von Ephx2 siRNA auf die protrahierte HPV in kleinen IPAs aus Mäusen.	52
Abbildung 21. Der Effekt von 5,6-EET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines KCl-induzierten <i>pretone</i> s.	56
Abbildung 22. Der Effekt von 8,9-, 11,12-, und 14,15-EET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines KCl-induzierten <i>pretone</i> s.	57
Abbildung 23. Der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12-, und 14,15-EET in Anwesenheit eines U46619-induzierten <i>pretone</i> s auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen.	58
Abbildung 24. Der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET auf den pulmonalarteriellen Druck von isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen aus Mäusen.	59
Abbildung 25. Der Effekt von 14,15-EEZE auf die 5,6-EET-induzierten Veränderungen der Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen.	60
Abbildung 26. Der Effekt von 5,6-DHET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen.	61

Abbildung 27. Der Effekt von 5,6-EET auf die Wandspannung von Aorten und Femuralarterien aus Mäusen.	62
Abbildung 28. Der Effekt von 5,6-EET auf die Ionenströme in PASMCs aus Mäusen.	63
Abbildung 29. Der Effekt von 5,6-EET auf $[Ca^{2+}]_i$ in kleinen IPAs aus Mäusen.	65
Abbildung 30. Der Effekt von H_2O_2 und 4-AP auf die 5,6-EET-induzierten Reaktionen von kleinen IPAs aus Mäusen.....	66
Abbildung 31. Vorgeschlagener Mechanismus der protrahierten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion.	79

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (verändert nach Simonneau <i>et al.</i> , 2019).....	6
Tabelle 2. Zusammensetzung der physiologischen Salzlösung (PSL) und der physiologischen Salzlösung mit einem hohen Kaliumanteil (KPSL).	26
Tabelle 3. Verwendete Inhibitoren und Agonisten für die Messungen im Myographensystem.	27
Tabelle 4. Zielsequenzen der verwendeten siRNAs.	28
Tabelle 5. Die Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung.....	31
Tabelle 6. Komponenten der verwendeten Zellkultur-Medien.....	33
Tabelle 7. Verwendete Substanzen für die extrazellulär-analoge Badlösung.	34
Tabelle 8. Verwendete Substanzen für die intrazellulär-analoge Lösung.	34
Tabelle 9. Primersequenzen für die <i>Real-Time</i> PCR.....	36
Tabelle 10. Zusammensetzung der selbst hergestellten Gele.	37
Tabelle 11. Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Western Blot-Experimente.	38
Tabelle 12. Der Effekt von MS-PPOH, 14,15-EEZE und TPPU auf KCl- bzw. U46619-induzierte Kontraktionen von kleinen IPAs aus Mäusen.....	49
Tabelle 13. Der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen ohne <i>pretone</i>	54
Tabelle 14. Der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET auf die Wandspannung von kleinen IPAs aus Mäusen in Anwesenheit eines KCl-induzierten <i>pretones</i> (15-20 mM).	55
Tabelle 15. Der Effekt von 5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET (1,5 μ M) auf den pulmonalarteriellen Druck von isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen aus Mäusen in Ab- oder Anwesenheit eines KCl-induzierten <i>pretones</i> (15-20 mM).	58

11. Publikationen und Vorträge

Originalarbeiten

Strielkov, I., Krause, N. C., Sommer, N., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Grimminger, F., Gudermann, T., Dietrich, A. & Weissmann, N. (2018). **Hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated mouse pulmonary arterial vessels.** *Experimental Physiology*, 103(9), 1185-1191.

Krause, N. C., Kutsche, H. S., Santangelo, F., DeLeon, E. R., Dittrich, N. P., Olson, K. R., & Althaus, M. (2016). **Hydrogen sulfide contributes to hypoxic inhibition of airway trans-epithelial sodium absorption.** *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 311(3), R607-R617.

Poster/Vorträge

Strielkov I. V., Krause N. C., Knoepp F., Schermuly R. T., Ghofrani H. A. & Weissmann N. **Epoxyeicosatrienoic acid pathway contributes to sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction in mouse intrapulmonary arteries.** Europäische Physiologen Tagung, London (2018), Poster.

Krause N. C., Strielkov I. V., Knoepp F. & Weissmann N. **Dual effect of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in mouse intrapulmonary arteries.** 6. Symposium der Jungen Physiologen, Jena (2017), Poster.

Krause N. C., Grimminger F., Seeger W., Weissmann N. & Strielkov I. V. **Role of cytochrome P450-derived eicosanoids in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction.** Molecular Biology and Medicine of the Lung (MBML) Retreat, Rauschholzhausen (2017), Vortrag.

Krause N. C., Grimminger F., Seeger W., Weissmann N. & Strielkov I. V. **5,6-epoxyeicosatrienoic acid induced constriction and relaxation of intrapulmonary arteries in mice.** Exzellenzcluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS) Minisymposium, Bad Nauheim (2017), Poster

Krause N. C., Strielkov I. V. & Weissmann N. **Evidence for the involvement of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction.** Molecular Biology and Medicine of the Lung (MBML) Retreat, Rauschholzhausen (2016), Vortrag.

Krause N. C., Strielkov I. V. & Weissmann N. **Evidence for the involvement of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction.** Exzellenzcluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS) Minisymposium, Bad Nauheim (2016), Poster.

Krause N. C. & Althaus M. **Acute hypoxia decreases sodium absorption by H441 distal lung epithelial cells.** Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Magdeburg (2015), Poster.

12. Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Nicole Catherine Krause, erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.“

Datum:

Unterschrift:

13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Norbert Weißmann für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes und für die Betreuung bedanken.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan für die Betreuung im Fachbereich Biologie.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Ievgen Strielkov für die Beratung und Hilfestellung während der gesamten Dissertation bedanken.

Ein großer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe Weißmann. Besonders bedanke ich mich bei Dr. Fenja Knöpp, Dr. Monika Brosien, Nasim Alebrahimdehkordi, Claudia Garcia, Stefan Hadzic, Cheng-Yu Wu, Karin Quanz, Nils Schupp, Carmen Homberger und Ingrid Breitenborn-Müller für die Unterstützung bei verschiedenen Versuchen.

Ein beträchtlicher Dank geht an Alexander Perniß, Annemarie Wolf und Annalena Traum für ihre tatkräftige Unterstützung beim Korrigieren der Thesis und für ihre motivierenden Worte. Herrn Perniß danke ich außerdem für die unterhaltsamen Stunden während der zahlreichen Konferenzen.

Mein größter Dank geht an meine Eltern, die mich stets in allen Wünschen und Erfolgen unterstützen und mitgefiebert haben.

Zum Schluss möchte ich dem Haus am Waldrand danken, einem Zufluchtsort geprägt von Erinnerungen an Abenteuer abseits der Wege, an tiefblaues Meer, an den Duft von Wald, an die Stille eines Sees, an das Aufwachen in den Bergen und an Elchküsse, die meine Urlaubstage zu etwas ganz Besonderem gemacht haben. Danke.