

Die Rolle des klassischen transienten Rezeptorpotential 3 Kanalproteins bei der
Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Maus

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Zahnmedizin oder
Humanbiologie)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Mayser, Caroline Dorothea
aus Gießen

Gießen (2020)

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Cardio-Pulmonales Institut (CPI)
Arbeitsgemeinschaft Prof. Dr. Norbert Weißmann
Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Gutachter: PD Dr. Christian Troidl

Tag der Disputation: 01.03.2021

Meiner gesamten Familie,
insbesondere meinen Eltern und Großeltern in Liebe und Dankbarkeit

Inhalt

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und Funktion der humanen Lunge	1
1.2	Atmung	2
1.3	Blutkreislauf	3
1.4	Anatomie der Blut- und KapillargefäÙe	4
1.5	Pulmonale Hypertonie (PH)	5
1.5.1	Pathophysiologie der PH	5
1.5.2	Epidemiologie der PH.....	6
1.5.3	Einteilung der PH	6
1.5.4	Klinik der PH.....	9
1.5.5	Diagnostik der PH.....	9
1.5.6	Umbauprozesse der GefäÙe in der PH.....	10
1.5.6.1	Tunica intima.....	11
1.5.6.2	Tunica media	11
1.5.6.3	Tunica adventitia	12
1.6	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion.....	13
1.7	Ca ²⁺ in der HPV und der PH	15
1.8	Transiente Rezeptor-Potential (TRP)-Ionenkanäle	16
1.8.1	Die Familie der klassischen TRP (TRPCs)	19
1.9	Ziel der vorliegenden Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Software.....	21
2.1.2	Geräte.....	21
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	23

Inhalt

2.1.4	Chemikalien.....	24
2.1.5	Medienansätze	26
2.1.6	Pufferlösungen.....	27
2.1.7	Kits.....	27
2.1.8	Antikörper.....	28
2.1.9	Primer	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	<i>In vivo</i> Versuche	29
2.2.1.1	Mauslinie und Versuchsgenehmigung.....	29
2.2.1.2	Versuchsaufbau	29
2.2.1.3	Hämodynamik	30
2.2.1.4	Spülung der Lunge.....	31
2.2.1.5	Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie (RHH)	32
2.2.2	Histologie.....	32
2.2.3	Isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Lunge (ILU)	35
2.2.4	Isolation und Kultiveringung von murinen PSMC	37
2.2.5	Genexpressionsanalyse	40
2.2.6	Proliferationsassay	42
2.2.7	Westernblot.....	43
2.3	Statistik.....	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Akute und verlängerte Hypoxie in WT und TRPC3 ^{-/-} Mäusen	45
3.2	Genexpressionsanalyse muriner PSMCs in anhaltender Hypoxie	46
3.3	Hämodynamische Messung nach chronischer Hypoxie-Exposition	49
3.4	Bestimmung der Herzhypertrophie nach Hypoxie-Exposition	53
3.5	Genexpressionsanalyse von Lungen und Herzgewebe nach chronischer Hypoxie-Exposition in WT und TRPC3 ^{-/-} Mäusen	56

Inhalt

3.6	Histologische Untersuchung der Gefäßmuskularisierung nach chronischer Hypoxie-Exposition.....	57
3.7	Genexpressionsanalyse muriner PSMCs in chronischer Hypoxie	60
3.8	Westernblot-Analyse	64
3.9	Proliferation muriner PSMCs nach hypoxischer Stimulation	64
4	Diskussion	68
4.1	Rolle von TRPC3 in akuter Hypoxie.....	68
4.2	Rolle von TRPC3 in chronischer Hypoxie.....	69
4.3	Einfluss des Geschlechts auf die PH	76
4.4	TRPC-Kanäle als mögliche therapeutische Zielstruktur	78
5	Zusammenfassung.....	80
6	Summary	82
7	Anhang	84
8	Abkürzungsverzeichnis	89
9	Abbildungsverzeichnis	94
10	Tabellenverzeichnis.....	96
11	Formelverzeichnis	96
12	Literatur.....	97
13	Veröffentlichungen	116
13.1	Vorträge.....	116
13.2	Postervorträge.....	116
14	Ehrenwörtliche Erklärung	117
15	Danksagung.....	118

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktion der humanen Lunge

Die menschliche Lunge befindet sich als lebenswichtiges Organ, durch die Rippen gut geschützt, im knöchernen Thorax. Durch den Gasaustausch in den Alveolen der Lunge erfolgt die Versorgung der peripheren Organe mit Sauerstoff. Der kaudale Anteil (Lungenbasis) wird vom Zwerchfell (Diaphragma) begrenzt und reicht kranial bis in die obere Thoraxapertur (Lungenspitze). Die Lunge ist von einer serösen Hülle, der sogenannten Pleura, umgeben. Sie besteht aus einem viszeralem und einem parietalem Blatt. Dazwischen befinden sich etwa fünf bis zehn Milliliter Flüssigkeit, die bei Atemexkursion eine Gleitfunktion erfüllt[39, 67]. Die Lunge lässt sich in einen linken und einen rechten Lungenflügel unterteilen, wobei der linke Lungenflügel aufgrund der Impression des Herzens etwas kleiner ist[84]. Der linke Lungenflügel lässt sich in zwei Lungenlappen einteilen. Der etwas größere rechte Lungenflügel besteht aus drei Lungenlappen. Eine weitere Unterteilung erfolgt in Segmente, Läppchen und Lungenacini. Die strukturelle Gliederung der Lunge beruht auf der Struktur des Bronchialbaums. Der Bronchialbaum lässt sich funktionell in einen proximalen luftleitenden (konduktiven) und einen distalen gasaustauschenden (respiratorischen) Abschnitt gliedern. Der konduktive Teil dient dabei der Anwärmung, Anfeuchtung und Reinigung der eingeatmeten Luft (Inspirationsluft). Außerdem erfüllt der konduktive Teil eine Schutz- und Abwehrfunktion gegen Keime. Der luftleitende Abschnitt beginnt in der Trachea, welche sich in zwei Hauptbronchien gliedert. Diese teilen sich rechts in drei und links in zwei Lappenbronchien. Es folgt eine im Durchschnitt 20-malige dichotome Unterteilung in Segmentbronchien, welche sich dann in *Bronchioli* unterteilen. Der konduktive Teil endet mit den *Bronchioli terminales*, welche nur noch einen Durchmesser von etwa 0,5 bis 0,8 mm haben und einen Lungenacinus versorgen[7]. Es folgt der respiratorische Abschnitt bestehend aus den *Brochioli respiratorii* und den *Ductus alveolares*, welche letztendlich in die Alveolen münden. In den 300 bis 400 Millionen Alveolen der Lunge findet der Gasaustausch statt. Alveolen haben einen Durchmesser zwischen 75 und 300 μm , was einer Gesamtfläche von 50 bis 120 m^2 entspricht[84]. Die Alveolarwand wird hauptsächlich von Pneumozyten Typ I ausgekleidet. An der Alveolarwand befinden sich außerdem noch Pneumozyten Typ II. Sie produzieren Surfactant (*surface active agent*), eine Substanz aus Phospholipiden

Einleitung

und Surfactantproteinen, welche die Oberflächenspannung in den Alveolen herabsetzt und somit das Kollabieren der Alveolen verhindert[7].

1.2 Atmung

Die Lungenatmung (Respiration) dient der Oxygenierung von Blut aus der Umgebungsluft bei der Inspiration und der Abgabe von CO₂ bei der Expiration. Für die Respiration sind drei Mechanismen erforderlich: die Ventilation (Belüftung der Alveolen), die Perfusion (Durchblutung der Lungenkapillaren) und die Diffusion (Transport der Gase über die alveolokapilläre Membran)[7].

Die mechanische Grundlage bildet die Exkursion des Thorax und die damit verbundene Änderung der Lungenvolumina. Bei der Inspiration wird der Thorax durch eine Kontraktion der Interkostalmuskeln (*Musculi intercostales externi* und *Musculi scaleni*) und des Diaphragma geweitet. Es kommt zu einem Unterdruck in der Lunge, wobei die Luft aus der Umgebung eingesaugt wird. Bei der Expiration erschlaffen die Muskeln und durch die Eigenelastizität der Lunge kommt es zu einer Verkleinerung des Lungenvolumens. Es resultiert eine Erhöhung des Druckes und die Luft wird aus der Lunge hinausgepresst[147].

Grundlage für den Gasaustausch ist die alveokapilläre Partialdruckdifferenz. Für Sauerstoff beträgt diese etwa 60 mmHg, für Kohlenstoffdioxid etwa 6 mmHg. Entlang der Blut-Luft-Schranke (alveolokapilläre Membran) findet die Diffusion der Gase statt. Diese ist mit 0,2 bis 0,6 µm Dicke sehr dünn und besteht aus dünnen Fortsätzen von Pneumozyten Typ I, einer verschmolzenen Basallamina und den Endothelzellen. Die Diffusionskapazität beschreibt das Gasvolumen, das pro Zeiteinheit zwischen Alveolarraum und Lungenkapillarblut ausgetauscht werden kann. Sie ist abhängig von der Größe der Diffusionsfläche und der Partialdruckdifferenz sowie der Dicke der alveolokapillären Membran. Bereits nach 0,1 Sekunden gleichen sich die Partialdrücke der Gase in Alveolarraum und Lungenkapillaren an. Dies ist kürzer als die Zeit, die das Blut zum Passieren der Kapillare braucht. Der Gasaustausch ist also nicht durch die Diffusion, sondern durch die Durchblutung der Kapillare limitiert. Deswegen sorgt die Zunahme des Herzzeitvolumens unter Belastung zu einer erhöhten kapillären Durchblutung pro Zeiteinheit und somit zu einem verbesserten Gasaustausch[84].

Einleitung

1.3 Blutkreislauf

Funktionell kann der Blutkreislauf in einen kleinen, den sogenannten Lungenkreislauf, und einen großen, den Körperkreislauf, eingeteilt werden. Es kann außerdem eine weitere funktionelle Einteilung in das Niederdrucksystem (Volumenreservoir), das Hochdrucksystem (Druckreservoir) und das Kapillargebiet (Austauschsystem) erfolgen[84]. Das Niederdrucksystem besteht aus dem Lungenkreislauf und aus dem venösen Schenkel des Körperkreislaufs. Der Blutdruck beträgt physiologisch etwa 2 bis 20 mmHg. Das Hochdrucksystem umfasst den arteriellen Schenkel des großen Kreislaufs. Hier liegen Drücke von etwa 80 bis 120 mmHg vor[7, 146]. Zwischen den beiden Systemen befindet sich jeweils ein Kapillargebiet, in dem der Stoffaustausch stattfindet.

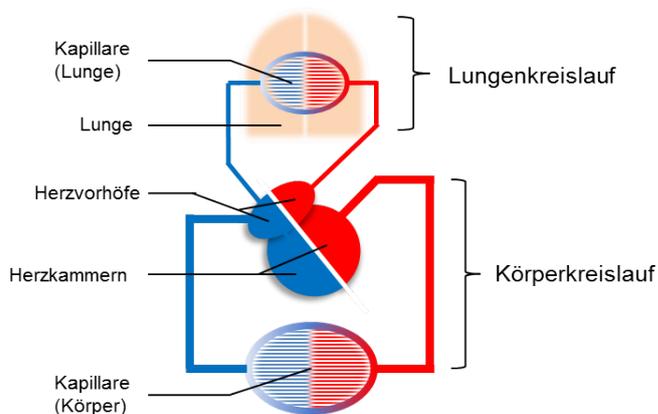


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Blutkreislaufs

Das Blut wird vom linken Ventrikel in den Körper gepumpt. Der Gasaustausch erfolgt im Kapillargebiet der jeweiligen Gewebe. Das desoxygenierte Blut fließt zurück zum rechten Vorhof, gelangt in den rechten Ventrikel und wird in den Lungenkreislauf ausgeworfen. Im Kapillargebiet der Lunge wird das Blut reoxygeniert und zum linken Vorhof zurück geleitet. rot: oxygeniertes Blut; blau; desoxygeniertes Blut.

Über die Hohlvene (*Vena cava*) wird das Blut aus dem Körperkreislauf in den rechten Vorhof und in den rechten Ventrikel geleitet. Von dort wird es mit einem mittleren Druck von ca. 20 mmHg in die Pulmonalarterie (*Arteria pulmonalis*) ausgeworfen. Parallel zu den Atemwegen verzweigt sich die Pulmonalarterie in kleinere Arterien bis hin zu den Kapillaren. Im Kapillargebiet erfolgt der Gasaustausch. Das reoxygenierte Blut fließt über die Pulmonalvenen (*Venae pulmonales*) zum linken Vorhof, der in den linken Ventrikel mündet. Der stark muskularisierte linke Ventrikel pumpt das oxygenierte Blut in die Aorta, worüber es in den Körperkreislauf gelangt und zur Sauerstoffversorgung der Organe dient[146].

An den herznahen Arterien vom elastischen Typ (Pulmonalarterie und Aorta), wird das systolische Blutvolumen unter Dehnung der Arterienwand aufgenommen. In der Diastole kommt es durch elastische Rückstellung des Gefäßlumens zu einem kontinuierlichen Blutfluss. Dieses Prinzip wird als Windkesselfunktion bezeichnet und

Einleitung

ermöglicht die Umwandlung eines pulsierenden Blutstroms in einen gleichmäßigen Volumenstrom[84, 146]. Herzferne Arterien zeigen einen Wandaufbau vom muskulären Typ. In der Gefäßwand befinden sich überwiegend glatte Muskelzellen, die der Regulierung der Durchblutung dienen. In der terminalen Strombahn können zusätzlich Arteriolen und Venolen, durch aktive Anspannung (Vasokonstriktion) und Entspannung (Vasodilatation) den Widerstand modulieren und die Durchblutung an den Bedarf anpassen[146].

1.4 Anatomie der Blut- und Kapillargefäße

Das Gefäßsystem besteht aus Venen, die auf das Herz zulaufen und Arterien, die vom Herzen wegführen. Die Venen verzweigen sich im Verlauf in die Venolen und die Arterien zu Arteriolen. Die Venolen und die Arteriolen werden durch ein Gefäßgeflecht aus Kapillaren miteinander verbunden.

Generell zeigen alle Gefäße, ausgenommen von den Kapillaren, einen ähnlichen Wandaufbau[146]. Lokale Unterschiede zeigen sich aufgrund von variierenden physiologischen Bedingungen in den verschiedenen Gefäßabschnitten. Dabei gilt, je höher der mittlere Druck in einem Gefäß, desto stärker muskularisiert ist dieses[99]. Die meisten Gefäße zeigen einen dreischichtigen Aufbau aus einer inneren Schicht (*Tunica interna*, Intima), mittleren Schicht (*Tunica media*, Media) und äußeren Schicht (*Tunica externa*, Adventitia). Die Intima besteht aus dem einschichtigen Endothel und einer subendothelialen Schicht, die überwiegend Extrazellulärmatrix enthält. Sie dient dem Stoff-, Flüssigkeits- und Gasaustausch. In den Arterien vom muskulären Typ wird die Intima gegenüber der Media durch die *Membrana elastica interna* abgegrenzt. Die Media besteht aus zirkulär angeordneten, glatten Muskelzellen, Proteoglykanen, elastische Fasern und Kollagenfasern. Über Kontraktion der glatten Muskelzellen kann die Media das Lumen des Gefäßes und somit den Blutfluss regulieren. Bei Arterien vom muskulären Typ sind Media und Adventitia durch die *Membrana elastica externa* getrennt. Diese Bindegewebsschicht verankert das Gefäß in der Umgebung und enthält Fibroblasten, Proteoglykane, elastische Fasern und Kollagenfasern. Zusätzlich finden sich dort versorgende Nerven und kleine Blutgefäße (*Vasa vasorum*)[99, 146].

Die Kapillaren bestehen aus einer einlagigen Endothelschicht, der Basalmembran und aufgelagerten Perizyten. Der Durchmesser einer Kapillar entspricht mit 5 bis 10 µm, ungefähr dem eines Erythrozyten[7, 99].

1.5 Pulmonale Hypertonie (PH)

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist definiert durch einen Anstieg des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (*mean pulmonary arterial pressure*, mPAP) auf ≥ 25 mmHg in Ruhe[49, 61]. Gemessen wird der mPAP mittels Rechtsherzkatheter, der zusätzlich auch die Bestimmung des pulmonalarteriellen Verschlussdrucks (*pulmonary artery wedge pressure*; PAWP) ermöglicht. Der PAWP dient der Abgrenzung von post- und präkapillären Formen. Bei der präkapillären PH (PH infolge von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie und chronisch thromboembolische PH) liegt der PAWP bei ≤ 15 mmHg, bei der postkapillären PH (PH bei Linksherzerkrankungen und PH mit unklaren/multifaktoriellen Mechanismen) hingegen liegt der PAWP bei >15 mmHg. Um eine Mischform aus prä- und postkapillärer PH zu identifizieren, wird der pulmonalvaskuläre Widerstand (*pulmonary vascular resistance*; PVR) bestimmt. Da die Berechnung des PVR das Herz-Zeit-Volumen (HZV) miteinbezieht, werden auch hyperzirkulatorische Kreislauflagen wie z. B. Fieber oder Hyperthyreose berücksichtigt[159].

Die Diagnose der PH erfordert nach Leitlinie von 2015 eine Erhöhung des PVR über drei Wood-Einheiten (*Wood Units*, WU; 1 WU entspricht 80 dyn; bzw. 800 μ N). Bei der Nizza-Konferenz von 2019 wurde vorgeschlagen den Grenzwert für den mPAP bei der PH auf 20mmHg zu setzen, da bereits ab diesem Wert Morbidität und Mortalität ansteigen[50].

1.5.1 Pathophysiologie der PH

Unter dem Begriff PH wird eine Gruppe von vaskulären Erkrankungen der Lunge zusammengefasst. Durch verschiedene Mechanismen, die noch nicht alle geklärt sind, kommt es in den pulmonalen Gefäßen zu Umbauprozessen und einer Erhöhung des PVR. Der erhöhte Druck in den Gefäßen führt zu einer erhöhten Nachlast und somit zu einer Druckbelastung für das rechte Herz. Es kommt zu einer exzentrischen Hypertrophie und einer Dilatation des rechten Ventrikels, dem sogenannten *Cor pulmonale*[195]. Die Vergrößerung des rechten Herzens führt zu einer schlechteren Erregungsleitung der Kardiomyozyten und kann malignen Herzrhythmusstörungen auslösen[184].

Der PVR ist unter anderem vom alveolären Sauerstoffgehalt abhängig. Unter physiologischen Bedingungen führt die akute alveoläre Hypoxie zu einer hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV), welche die Perfusion besser ventilierter

Einleitung

Lungenareale ermöglicht. Unter chronischer Hypoxie (z. B. Aufenthalt in der Höhe oder Erkrankungen der Lunge, die eine alveoläre Hypoxie verursachen) führt der Mangel an O₂ zusätzlich zu einem Umbau der Gefäße mit dauerhaft erhöhtem PVR. Der Gasaustausch wird durch den erhöhten PVR gestört, da das Herz gegen einen höheren Widerstand pumpen muss, hypertrophiert, sich erschöpft und ein ausreichendes HZV nicht mehr generiert werden kann. Vor allem unter Belastung ist das HZV nicht mehr steigerbar und es kommt zur Hypoxämie[84].

Zusammengenommen verschlechtert sich die Herz-Kreislaufsituation, die Patienten sind wenig belastbar und schnell erschöpft. Sie leiden unter Dyspnoe, Tachykardie, Herzrhythmusstörungen, Schwindel und den Folgen der Rechtsherzhypertrophie (RHH).

1.5.2 Epidemiologie der PH

Mit einer Inzidenz von 7 Fällen pro einer Million Menschen im Jahr und einer Prävalenz von 26 Millionen Menschen pro Jahr, gehört die PH zu den seltenen Krankheiten[127]. Unbehandelt führt sie zu einem fulminanten Verlauf. Die Patienten leiden unter einer stark eingeschränkten Leistungsfähigkeit und sterben innerhalb von wenigen Jahren[11, 27]. Frauen sind häufiger betroffen als Männer[68], bei Männern kommt es jedoch häufiger zu einem schnellen und heftigen Verlauf[72]. Die PH wird meist erst spät diagnostiziert und somit auch erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf therapiert. Eine Ursache hierfür ist die unspezifische Symptomatik[142]. Die mittlere Dauer zwischen dem Einsätzen der Symptome und einer Rechtsherzkatheteruntersuchung liegt bei ca. 2,8 Jahren[68].

1.5.3 Einteilung der PH

Von der Weltgesundheitsorganisation (*world health organisation*, WHO) wird die PH anhand der Klinik der Patienten in vier Schweregrade gegliedert[49] (**Tabelle 1**).

Schweregrad	Sympomatik
Klasse I	Keine Einschränkungen bei körperlicher Aktivität
Klasse II	Dyspnoe und Brustschmerz mit drohender Synkope bei schwerer körperlicher Aktivität
Klasse III	Dyspnoe und Brustschmerz mit drohender Synkope bei leichter körperlicher Aktivität
Klasse IV	Dyspnoe und Brustschmerz in Ruhe

Tabelle 1: Klinische Einteilung der Schweregrade der PH.

Die pulmonale Hypertonie lässt sich anhand der Symptomatik in vier Schweregrade einteilen.

Einleitung

Des Weiteren kann die PH anhand ihrer Ätiologie und den pathologischen[129] und pathobiologischen[67, 113] Ursachen in fünf Gruppen eingeteilt werden (Nizza-Klassifikation 2013 und 2019, Weltkonferenz der WHO)[50, 137]. Gemeinsam ist allen Formen ein Anstieg des mPAP auf ≥ 25 mmHg und die damit verbundenen hämodynamischen Veränderungen z. B. die Druckbelastung des rechten Ventrikels und die daraus resultierende RHH[174].

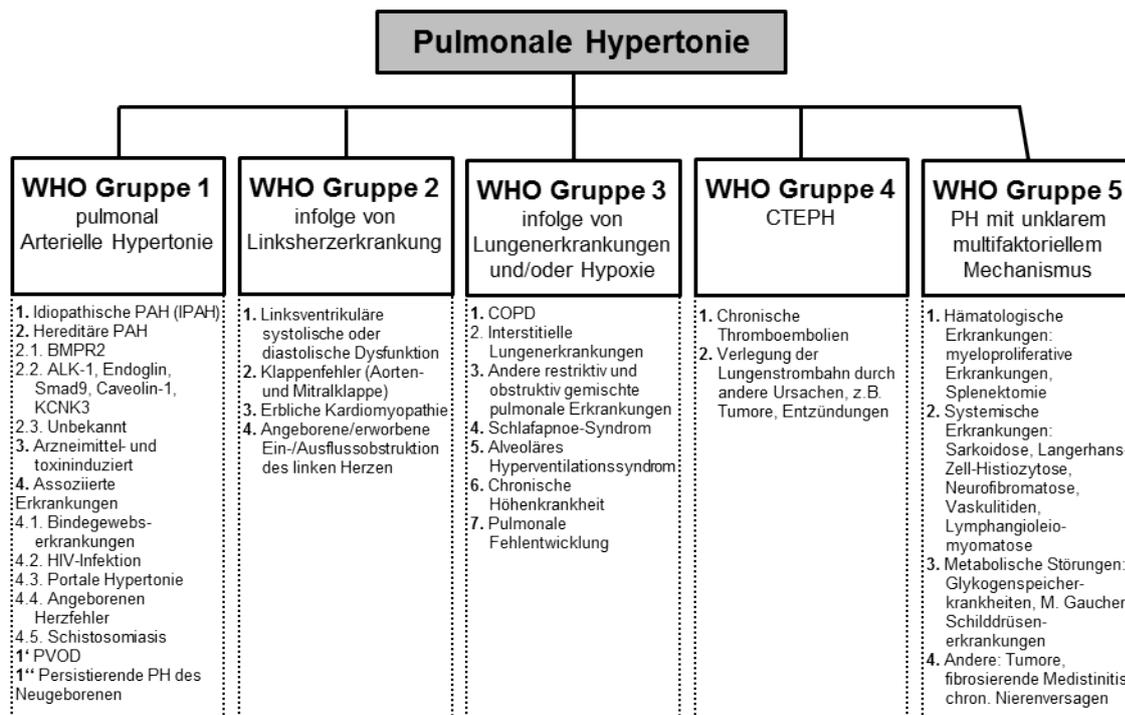


Abbildung 2: Klinische Klassifikation der PH (Nizza, 2013, verändert nach Simonneau et al. [153])
Einteilung der PH in 5 Gruppen und entsprechende Untergruppen.

Zur **Gruppe 1**, pulmonalarterielle Hypertonien (PAH), gehören vor allem Formen der PH, die unabhängig von Lungenerkrankungen idiopathisch oder hereditär entstehen. Gemeinsam ist allen Untergruppen eine histologisch nachweisbare Verdickung der präkapillären Arteriolen und ein damit assoziierter Anstieg des PVR. Während die idiopathische PAH sporadisch auftritt, lässt sich bei der hereditären Form häufig eine Mutation identifizieren. In 70% der Fälle konnte eine Mutation im *bone morphogenetic protein receptor 2* (BMPR2) nachgewiesen werden[4, 25, 100].

Eine PAH kann auch durch Medikamente (vor allem die Appetitzügler Aminorex und Fenfluramin) ausgelöst werden. Aber auch bestimmte selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer und Lipidsenker stellen ein Risiko dar. Sehr wahrscheinlich verursachen auch Amphetamine und deren Abkömmlinge, sowie der Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib eine PAH[153].

Einleitung

Auch Patienten mit systemischer Sklerodermie entwickeln mit einer Prävalenz von 7 bis 12% eine PAH[53, 116], mit schlechter Prognose[175]. Weitere Erkrankungen, die das Risiko für eine PAH erhöhen sind eine HIV-Infektion[126, 154], eine portale Hypertonie[54], ein angeborener Herzfehler[40] und eine Schistosomiasis[32]. Für die systemische Sklerodermie und für die angeborenen Herzfehler konnte bereits gezeigt werden, dass für das Langzeitüberleben und die Lebensqualität eine frühzeitige Diagnose der PAH und die entsprechende Behandlung entscheidend sind[34, 69, 98].

PH, die aufgrund von chronischen Linksherzerkrankungen entsteht, gehört zur **Gruppe 2** und stellt die häufigste Form dar[10]. Eine Linksherzinsuffizienz wie auch Klappenventien können zu einem erhöhten Druck im linken Ventrikel führen und erhöhen passiv durch Rückstau den mPAP. Neben der Erhöhung des mPAP findet sich eine Erhöhung des PCWP auf ≥ 15 mmHg. Auf der Basis einer postkapillären Störung mit Dilatation von pulmonalen Venen und Kapillarsystem kann sich eine endotheliale Dysfunktion entwickeln[177]. Letztendlich kann es auch zu präkapillären Veränderungen und somit zu einem *Remodeling* der Gefäße kommen[112].

Zur **Gruppe 3** gehören PH-Formen, die in Folge von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie entstehen. Diese Gruppe kommt am zweithäufigsten vor[10]. Histologische Kennzeichen sind eine Hypertrophie der Media, die Proliferation von intimalen Zellen der distalen pulmonalen Arterien und eine Neomuskularisierung[161]. Dieser Prozess wird unter dem Begriff *Remodeling* zusammengefasst. Bei der PH verursacht durch chronische Hypoxie (*chronic hypoxic pulmonary hypertension*, CHPH) kommt es pathophysiologisch durch alveoläre Hypoxie über verschiedene Mediatoren zu einer anhaltenden hypoxischen Vasokonstriktion in den pulmonalenarteriellen Gefäßen[113, 152] mit Rarefizierung von Kapillargefäßen und Entzündungsreaktionen[161]. Auch toxische Substanzen wie Zigarettenrauch können Auslöser sein. Des Weiteren wird unter anderem eine endotheliale Dysfunktion[49] mit einem Ungleichgewicht zwischen vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Substanzen als Ursache vermutet. Die Hypoxie kann verschiedene Ursachen haben, z. B. chronische Lungenerkrankungen mit Überblähung der Lunge oder auch ein Aufenthalt in Höhe. Eine hohe Inzidenz für PH zeigen vor allem die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), die idiopathische Lungenfibrose (IPF) und die Sarkoidose[148].

Die **Gruppe 4** wird als chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) bezeichnet. Dies ist die einzige Form der PH, die mittels Thrombendarteriektomie

Einleitung

potentiell heilbar ist[43, 78]. Die Ursache für die CTEPH sind chronische Thromben in den Pulmonalarterien, wobei ein Defekt im Koagulationssystem vermutet wird[89]. Distale und proximale Formen der CTEPH lassen sich nicht voneinander unterscheiden. Die Operabilität ist abhängig von der Lokalisation der Thromben. Je distaler diese liegen, umso schwieriger ist die operative Therapie[79].

Die **Gruppe 5**, PH mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen, fasst alle Formen zusammen, die keinen eindeutigen Auslöser haben. Dazu zählen PH im Zusammenhang mit hämatologischen, metabolischen und systemischen Erkrankungen[110].

1.5.4 Klinik der PH

Die Symptome der PH sind unspezifisch. Die klinische Trias aus Dyspnoe, Müdigkeit und Synkopen tritt bei vielen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems auf. Diese unspezifischen Symptome in Kombination mit einem fast normalen Thoraxröntgen, praktisch normaler Lungenfunktion und Blutgasen legen den Verdacht auf eine PH nahe[8]. Symptome wie Müdigkeit, Synkopen und Dyspnoe sind Anzeichen dafür, dass das Herz nicht in der Lage ist das HZV unter Belastung zu steigern[87]. Außerdem können Symptome wie *Angina pectoris*, Palpitationen oder eine Raynaud-Symptomatik hinzukommen[8].

Bei der klinischen Untersuchung lassen sich vor allem Zeichen einer kardiovaskulären Insuffizienz, bedingt durch die Dilatation des rechten Ventrikels, feststellen[168]. Hierzu gehört eine Trikuspidalinsuffizienz[168], die sich unter anderem durch die Pulsation der Jugularvene manifestiert und sich im späten Stadium auskultieren lässt (systolisches Rückstromgeräusch über der Trikuspidalklappe). Außerdem zeigt sich bei einem Fortschreiten der Krankheit eine zentrale oder periphere Zyanose. Zusätzlich können eine Halsvenenstauung, eine Hepatomegalie, periphere Ödeme und Aszites als Zeichen der dekompensierten RHH auftreten[8].

1.5.5 Diagnostik der PH

Zur apparativen Diagnostik gehören Thoraxröntgen, Elektrokardiogramm (EKG), Lungenfunktionstest, Echokardiographie und evtl. auch eine Magnetresonanztomografie (MRT) des Herzens. Außerdem werden laborchemische Untersuchung des Blutes und ein Herzkatheter veranlasst[168]. Für die PH typische Befunde im Thoraxröntgen sind eine Vergrößerung der Pulmonalarterie und der hilären Gefäße, bei gleichzeitiger Rarefizierung der peripheren Lungengefäße. Im EKG finden sich Anzeichen für eine

Einleitung

rechtsventrikuläre Hypertrophie, wie z. B. ein Rechtstyp bei der Bestimmung des Lagetyps oder ein positiver Sokolow-Lyon-Index. Bei der Lungenfunktionsdiagnostik zeigt sich eine isolierte moderate Reduktion der Diffusionskapazität bei normalen Lungenvolumina. Die Echokardiographie dient dem Abschätzen des Schweregrads der PH. Entscheidende Parameter sind hierbei die Größe des rechten Ventrikels beziehungsweise die Dicke der Ventrikelwand sowie die systolische und diastolische Leistung des Herzens. Prognostisch ungünstig ist eine erniedrigte „*tricuspid annular plane systolic excursion*“ (TAPSE), die eine Aussage über die Funktion des rechten Ventrikels ermöglicht. Mit Hilfe der Dopplerechokardiographie kann zusätzlich der mPAP abgeschätzt werden[178]. Außerdem lassen sich eventuelle kardiale Ursachen z. B. Klappenvitien oder Shunts ausschließen. Beim Herzkatheter werden die Drücke im rechten und linken Ventrikel sowie in der Pulmonalarterie bestimmt, was eine Unterscheidung zwischen prä- und postkapillärer PH ermöglicht. Der Rechtsherzkatheter ist nach wie vor das Mittel der Wahl bei der Diagnostik der PH. Beweisend für die PH sind ein erhöhter mPAP und PVR im Rechtsherzkatheter[62]. Die Laboruntersuchungen dienen dem Ausschluss von Risiken für eine PH wie HIV-Infektionen[14], Autoimmunerkrankungen (z. B. Lupus erythematodes[66], progressive systemische Sklerose[76, 116]) und Schistosomiasis[24, 90]. Auch die Schilddrüsenparameter und eine Hepatitis Serologie werden überprüft[49].

1.5.6 Umbauprozesse der Gefäße in der PH

Bei der PH kommt es zu Umbauprozessen in allen drei Schichten der Gefäßwand [73, 132, 144]. Eine besondere Bedeutung wird dabei den pulmonal arteriellen glatten Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cell*, PASMC)[36], Fibroblasten[5] und den pulmonalen Endothelzellen (*pulmonary arterial endothelia cell*, PAEC)[134, 143] zugeschrieben. Es kommt zu einer Verengung des Lumens[140] und somit zu einem Verlust der Querschnittsfläche der Gefäße und zur Muskularisierung von zuvor nicht- und/oder partiell-muskularisierten peripheren Arterien[73, 183]. Zusätzlich sinkt, durch Ablagerung von extrazellulären Matrix-Komponenten (z. B. Kollagen, Elastin und Fibronectin) die vaskuläre Elastizität[46, 73, 208].

1.5.6.1 Tunica intima

Die Intima zeigt die geringsten Veränderungen verglichen mit den anderen Schichten[56, 57, 107, 163]. Zu den Veränderungen zählen eine Verdickung der Intima durch Hypertrophie und Hyperplasie, subendotheliale Ödeme und Fibrose, die durch Kollagen- und Elastin-Ablagerungen verursacht wird[57, 107, 134, 143, 163]. Bei der PAH und der IPAH zeigen sich plexiforme Läsionen[163, 201], verursacht durch Myofibroblasten-ähnliche Zellen[57, 155, 156]. Auch PAECs scheinen eine Rolle in der PH zu spielen[134, 143], wobei dies von der Unterform der PH abhängig ist. Es wird vermutet, dass zirkulierende endotheliale Progenitorzellen die Hypertrophie anderer Gefäßschichten, durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Mediatoren, beeinflussen[37, 132]. Begünstigt wird der Umbau durch Scherstress, der die Permeabilität des Endothels verändert und zu subendothelialen Ödemen führt[15, 132]. Es kommt zur Veränderung der Funktion der Endothelzellen, was wiederum Einfluss auf die Ausschüttung und Aktivität von vasoaktiven Substanzen z. B. Stickstoffmonoxid (NO), Prostazykline, Endothelin und Serotonin hat[9, 21, 42, 59, 85, 131]. Durch Schädigung des Endothels kann es vermehrt zu Thrombosen kommen[172].

1.5.6.2 Tunica media

Das *Remodeling* pulmonaler Gefäße ist durch eine gesteigerte Proliferation und reduzierte Apoptose von medialen PSMCs gekennzeichnet[106]. Die damit einhergehende Hypertrophie der Media führt zu einer Verengung des Gefäßlumens[140]. Zusätzlich kommt es zu Veränderungen in der extrazellulären Matrix, welche die Compliance der Gefäße beeinflussen[70, 171]. Verantwortlich für die gesteigerte Produktion von extrazellulärer Matrix sind Myofibroblasten, die sich aus adventitialen Fibroblasten differenzieren und in die Media einwandern[160]. Durch die verstärkte Differenzierung und Migration kann es zur Bildung von neointimalen Läsionen kommen[67]. Aus Vorläuferzellen bilden sich vermehrt glatte Muskelzellen (*smooth muscle cell*, SMC)[73]. Außerdem kann es durch Migration von PSMCs zu einer Neomuskularisierung von nicht- oder partiell-muskularisierten Gefäßen kommen[134].

Als Mediatoren sind vor allem Endothelin-1 und Serotonin zu berücksichtigen. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*, FGF) und der

Einleitung

thrombozyten-abstammende Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor*, PDGF) scheinen vor allem in Bezug auf die Proliferation eine Schlüsselrolle einzunehmen[42]. In Hypoxie exponierten PSMCs konnte eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen beobachtet werden. Dies hat einen Einfluss auf die Proliferation und führt zu Vasokonstriktion. Veränderungen in der Expression und/oder Funktion verschiedener Ca^{2+} -Kanäle wurden bereits berichtet[125, 167].

1.5.6.3 Tunica adventitia

In der Adventitia kommt es zur Proliferation von Fibroblasten und damit einhergehenden Veränderungen von Kollagenen und extrazellulärer Matrix. Es zeigt sich eine Vermehrung von versorgenden Gefäßen sowie eine Rekrutierung von Immunzellen und Progenitorzellen[164]. Proliferierende Fibroblasten können sich in SMCs dedifferenzieren und in die Media einwandern[173]. Dort produzieren sie Mediatoren, die unter anderem die Proliferation von PSMCs beeinflussen[162]. Auch eine Differenzierung der Fibroblasten in strukturverändernde Myofibroblasten wird diskutiert[196].

1.6 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

Die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion (HPV) ist eine physiologische Reaktion auf alveoläre Hypoxie, bei der es zu einer Kontraktion von pulmonalarteriellen Gefäßen kommt[41, 166]. Die Vasokonstriktion der Gefäße führt zur Reduktion der Perfusion schlecht ventilierter Areale der Lunge, was zu einer besseren Perfusion von besser ventilerten Arealen führt und so den Gasaustausch optimiert[41, 167]. Unter akuter Hypoxie führt die Vasokonstriktion der Gefäße zu einem schnellen Anstieg des PVR und des mPAP[158].

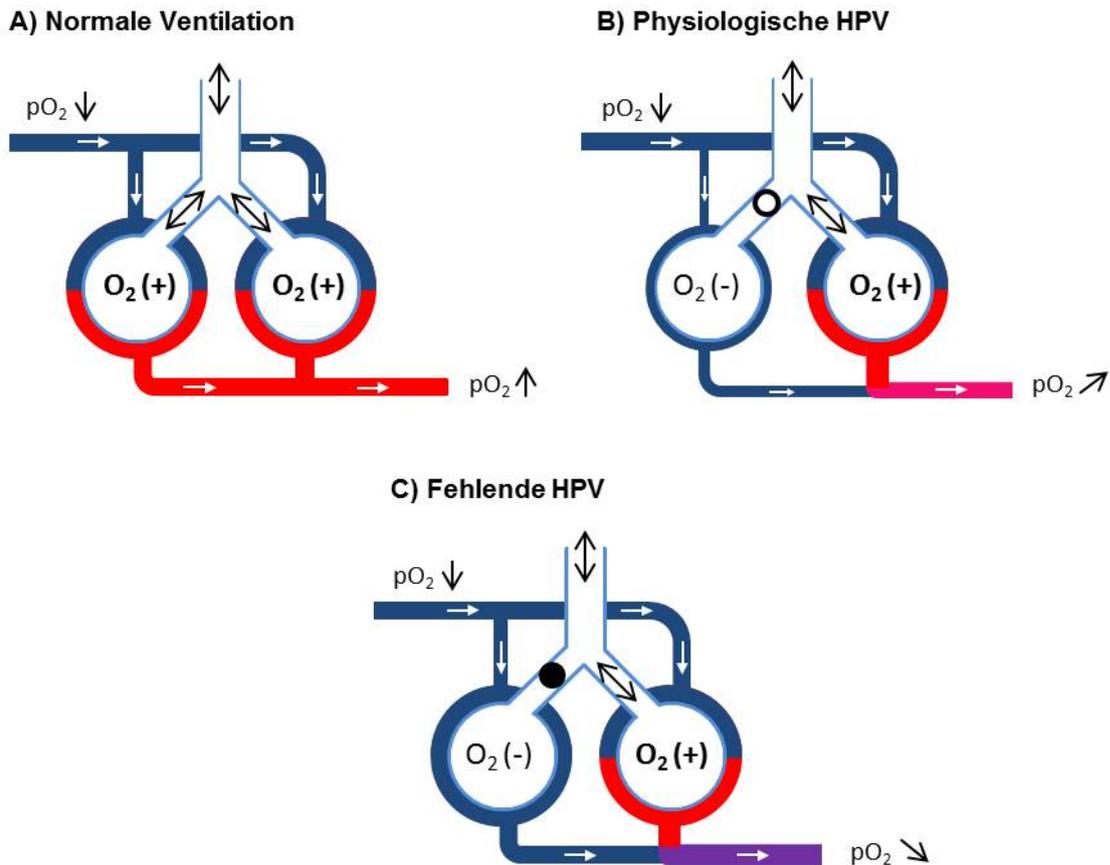


Abbildung 3: Mechanismus der HPV

A) Unter physiologischen Bedingungen (O_2 -Gehalt der Luft 21%, Luftdruck 101 kPa) und optimaler Ventilation ist die Lunge gleichmäßig perfundiert und die Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff findet ungehindert statt. B) Bei einer reduzierten Ventilation eines Lungenbereichs, z. B. durch Verschluss von Alveolen oder Verlegung der Atemwege, sinkt die O_2 -Konzentration in den betroffenen Alveolen. Um eine bessere Anreicherung des Blutes mit O_2 zu erreichen, kommt es zur hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV), die entsprechenden Alveolarbezirke versorgenden, Gefäße und damit zu einem reaktiven Abfall der Perfusion in den betroffenen Arealen. Das Blut wird so in besser ventilerte Bereiche umgeleitet. Insgesamt kommt es zu einem leichten Abfall des arteriellen pO_2 , da sich das Blut aus den schlecht ventilerten Arealen mit dem aus den gut ventilerten Arealen postkapilär vermischt (Shunt). C) Kommt es zu einer Störung der HPV durch pathologische Prozesse (z. B. Inflammation, Pneumonie, Sepsis oder globale Hypoxie), so werden auch schlecht ventilerte Bereiche perfundiert. Insgesamt führt dies zu einem höheren Shuntvolumen und resultiert in einem starken Abfall des arteriellen pO_2 . HPV: hypoxisch-pulmonale Vasokonstriktion; pO_2 : Sauerstoffpartialdruck; blau: desoxygeniertes Blut; lila: Abfall des pO_2 aufgrund des Shuntvolumens; rot: oxygeniertes Blut. (verändert nach: Sylvester et al. 2012 [167])

Einleitung

Bei länger anhaltender Hypoxie zeigt sich ein biphasischer Verlauf der HPV. Zu Beginn (wenige Sekunden bis Minuten Hypoxie) kommt es zu einem schnellem, aber nur vorübergehenden Anstieg des PAP. Es folgt eine zweite Phase, bei der es zu einem langsamen, moderaten Anstieg des PAP kommt, der einige Stunden oder wohl auch permanent anhalten kann[91, 189]. Der Pathomechanismus dieser sogenannten *sustained phase* konnte bis jetzt noch nicht vollständig geklärt werden[2, 114, 192].

Bei chronischer Hypoxie kommt zu einer generellen Vasokonstriktion im pulmonalen Gefäßsystem. Der verminderte Sauerstoffpartialdruck in den Alveolen führt zusätzlich zu einem Gefäßumbau mit einer Hypertrophie der Media[158, 180]. Außerdem zeigt sich eine Neomuskularisierung der Arteriolen[103, 158, 167, 194]. Der PAP ist dauerhaft erhöht und unter Normoxie nicht zu senken. Globale chronische Hypoxie findet sich vor allem bei Aufenthalt in Höhenluft (sauerstoffarme Atemluft) oder bei chronischen pulmonalen Erkrankungen, die eine Hypoxie in den Alveolen verursachen (z. B. Schlafapnoe oder Lungenfibrose).

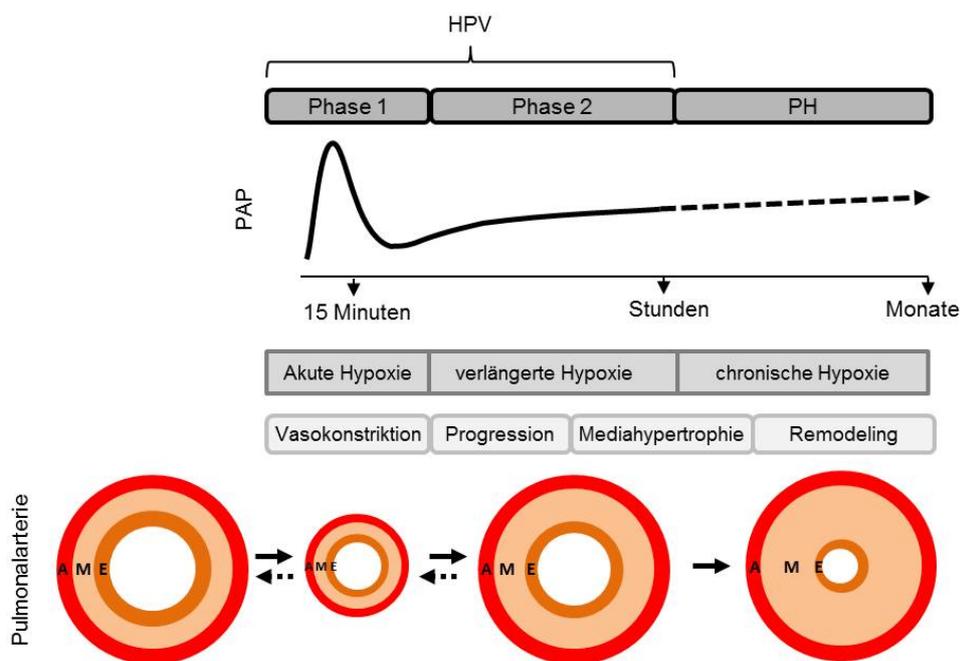


Abbildung 4: Phasen der Vasokonstriktion unter Hypoxie

Die Vasokonstriktion unter Hypoxie läuft in drei Phasen ab. Zunächst kommt zur biphasisch verlaufenden HPV, die unter anhaltender Hypoxie zur PH mit *Remodeling* der Gefäße führt. In akuter Hypoxie (Phase 1) kommt es zur Vasokonstriktion der Gefäße und zu einem Anstieg des PAP, der unter Normoxie reversibel ist. In länger anhaltender Hypoxie (Phase 2) kommt es nach dem initialen Anstieg des PAP unter akuter Hypoxie, nach einigen Minuten zu einem Abfall, der in einem mäßigen, langsamen Anstieg des PAP übergeht. Wahrscheinlich werden bereits in dieser Phase die Umbauprozesse der Gefäßwand angeregt, allerdings ist auch dieser Prozess reversibel. Unter chronischer Hypoxie kommt es zur Entstehung einer PH mit Hypertrophie der Media. Dieser Prozess des *Remodelings* führt zur Verkleinerung des Gefäßlumens und ist irreversibel. A: Adventitia; E: Endothel; M: Media; PAP: pulmonalarterieller Druck; PH: pulmonale Hypertonie; gestrichelte Pfeile: reversible Vorgänge. (verändert nach: Malczyk et al. 2016[104] und Ward und McMurty 2009[189])

1.7 Ca^{2+} in der HPV und der PH

Die der HPV und CHPH zugrundeliegende Mechanismen sind bisher nicht vollständig geklärt, eine wichtige Rolle spielen Ca^{2+} -assoziierte Signalwege. Eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) führt zur gesteigerten Aktin/Myosin Interaktion und ist essenziell für die Kontraktion der PAMSCs.

Während der akuten Phase der HPV kommt es zur Inhibition von Kaliumkanälen und Membrandepolarisation[26], die einem Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsaktive Ca^{2+} -Kanäle (*voltage-operated calcium channel*, VOCC) bewirkt[106, 124, 161]. Die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt durch Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette zur Bindung der Myosinköpfchen an die Aktinfilamente und somit zur Muskelkontraktion[12]. Im Gegensatz zur akuten Hypoxie-Reaktion spielt die spannungsabhängige Ca^{2+} -Konzentration in der länger anhaltenden Hypoxie wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle[94]. Vielmehr kommt es zur Freisetzung von vasoaktiven Substanzen wie Prostanoiden, Endothelin und Stickoxide durch das Endothel[1, 35], was möglicherweise zu einer Ca^{2+} -Sensibilisierung durch Aktivierung von Rho-Kinasen führt[2, 83], wodurch wiederum eine andauernde Kontraktion herbeigeführt werden kann.

Chronische Hypoxie führt zu einer verminderten Expression von Kaliumkanälen in PAMSCs, wodurch eine Depolarisation der Zelle und Aktivierung von VOCCs indiziert wird. Es resultiert ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, der zu einer anhaltenden Kontraktion von PAMSCs führt. Zum anderen kommt es während der chronischen Hypoxie zu einer vermehrten Expression von TRPC (*canonical TRP*) Kanälen, welche im Zusammenhang mit der Dysregulation der Ca^{2+} -Homöostase unter Hypoxie gebracht werden[194, 206]. Durch die Aktivierung von TRPCs kommt es zu einer erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$, welche zu einer erhöhten Proliferation und Migration von PAMSCs beiträgt[130, 191].

Die verminderte Expression von Kaliumkanälen unter chronischer Hypoxie und der resultierenden herabgesetzte Ausstrom von Kalium aus der Zelle führt zu einer erhöhten intrazellulären Kaliumkonzentration ($[\text{K}^+]_i$), was zu einer verminderten Apoptose von PAMSCs beiträgt[115, 136]. Der Anstieg der Proliferation und gleichzeitige Abfall der Apoptose von PAMSCs gelten als Ursache für das *Remodeling* von Gefäßen unter chronischer Hypoxie[44, 191].

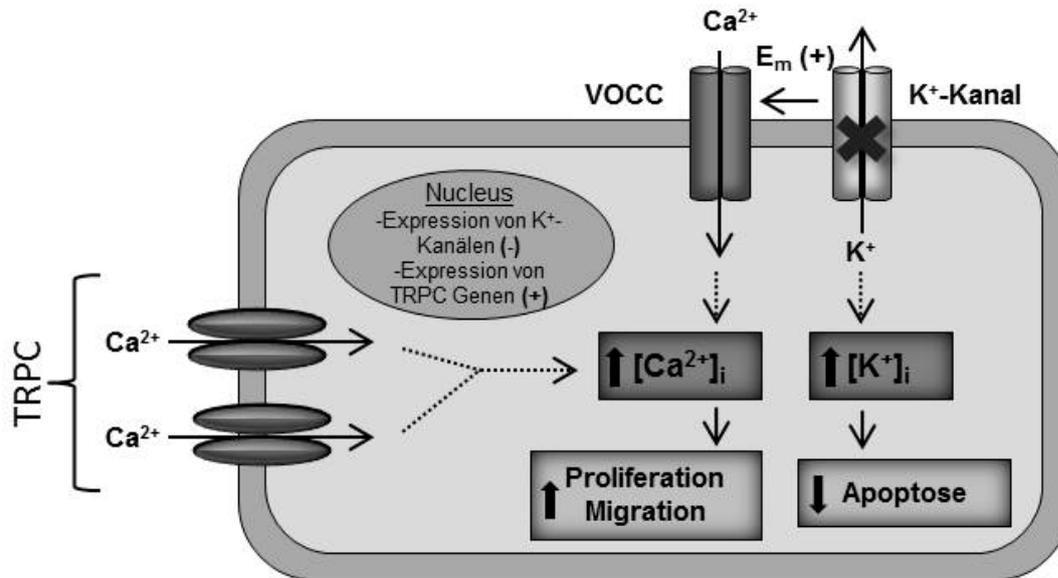


Abbildung 5: Ca^{2+} -Homöostase in chronischer Hypoxie

Chronische Hypoxie verursacht eine vermehrte Expression von TRPC Kanälen. Die Aktivierung der TRPC Kanäle führt zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Chronische Hypoxie führt außerdem zu einer reduzierten Expression und Leitfähigkeit von K^+ -Kanälen. Es kommt zum Anstieg der zytosolischen K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]_i$), die mit einer Veränderung des Membranpotentials assoziiert ist und somit zu einem spannungsabhängigen Einstrom von Ca^{2+} führt. Insgesamt resultiert die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in einer vermehrten Migration und Proliferation von PSMCs. Außerdem ist die erhöhte $[\text{K}^+]_i$ mit einer verringerten Apoptose assoziiert. E_m : Membranpotential; Kanäle; VOCC: Spannungsaktive Calciumkanäle. (verändert nach: Weir et al. 2006[194])

1.8 Transiente Rezeptor-Potential (TRP)-Ionenkanäle

Erstmalig beschrieben wurde das TRP-Protein 1969 in der Taufliege *Drosophila melanogaster*[65]. TRP-Proteine werden auch in Säugetieren in verschiedenen Geweben, wie z. B. der Lunge, dem Herzen und den Gefäßen exprimiert[105] und wurden im Zusammenhang mit verschiedener Erkrankungen z. B. Tumore, neurodegenerative Erkrankungen[109], Fibrose[3, 200], arterielle Hypertonie[203], Arrhythmien[179] und Lungenödem[169] beschrieben. Vermutlich spielen TRP-Proteine eine bedeutendere Rolle in pathologischen Prozessen als in physiologischen Prozessen[120, 198].

TRP-Kanäle gehören zu nicht-selektiven Kationen-Kanälen (*non-selective cation channels*, NSCCs)[22, 111], welche spannungsunabhängig aktiviert werden und durchlässig für K^+ , Na^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} sind[38]. Sie spielen vor allem in der Regulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine wichtige Rolle[23, 206]. Die Aktivität der Kanäle wird durch pH, Osmolarität, Temperatur, Pheromone, Ca^{2+} , oxidativen Stress sowie biochemische Interaktionen mit externen Liganden oder zellulären Proteinen reguliert[109].

Einleitung

Allen TRP-Kanälen gemeinsam sind sechs Transmembrandomänen (T1 bis T6) wobei sich zwischen T5 und T6 die Pore des Ionenkanals befindet[128]. Am positiven, intrazellulär gelegenen NH₂-terminalen Ende befinden sich drei bis vier Ankyrin-Domänen, die wahrscheinlich wichtig für die Interaktion der Untereinheiten[108] und die Aktivität des Kanals[17] sind. Der Bereich des intrazellulären negativen C-Terminus ist innerhalb der TRPs sehr variabel, in diesem liegen Bindestellen für verschiedene regulatorische Proteine[109]. Allen Gruppen gemeinsam ist die sogenannte TRP-Box, deren Funktion noch weitestgehend ungeklärt ist[137]. Sie könnte eine Bindungsstelle für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) sein[138]. Außerdem findet sich häufig eine prolinreiche Region, welche für die Proteininteraktion entscheidend zu sein scheint[75, 197].

Ein funktionsfähiger TRP-Ionenkanal besteht aus vier TRP-Proteinen. So werden homomere Kanäle bestehend aus vier gleichen Proteineinheiten oder heteromere Kanäle, bestehend aus verschiedenen Proteineinheiten innerhalb einer Subfamilie, gebildet[38, 44]. Auch heteromere Tetramere zwischen verschiedenen Subfamilien wurden beobachtet[45].

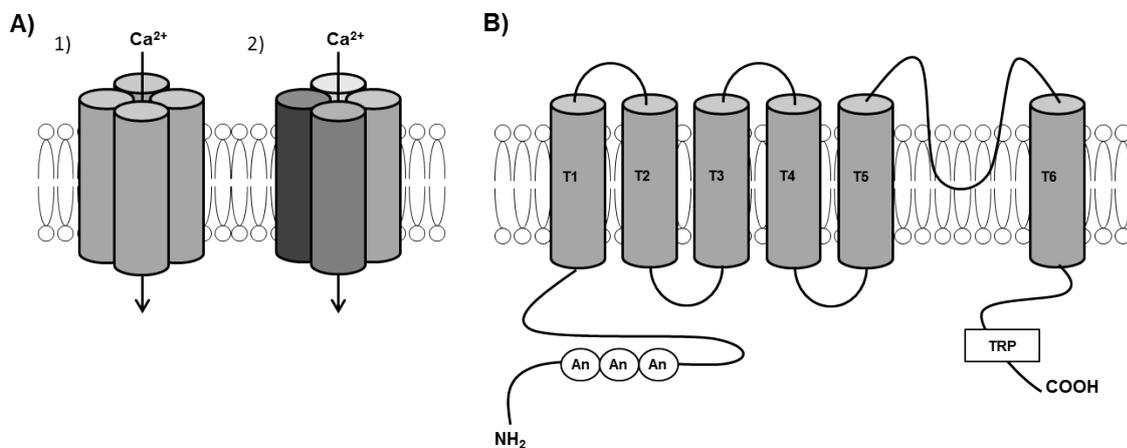


Abbildung 6: Struktur von TRPC Kanälen

A) Vier TRP-Proteine setzen sich zu homomeren (1) oder heteromeren (2) Kanälen zusammen. B) Ein TRP-Protein besteht aus sechs Transmembrandomänen, T1-T6, wobei sich zwischen der fünften und sechsten Untereinheit die Porenregion befindet. Am Aminoterminus befinden sich drei bis vier Ankyrin-Domänen. Am Carboxylterminus findet sich die TRP-Box. Beide Enden liegen intrazellulär und besitzen unterschiedliche regulatorische Elemente, Interaktionsstellen und enzymatische Domänen. An: Ankyrin-Domäne; COOH: Carboxylgruppe; NH₂: Aminogruppe, TRP: TRP-Box; T: Transmembrandomäne (verändert nach: Malczyk et al. 2016[105])

Einleitung

Basierend auf ihrer Aminosäuren-Sequenz werden die TRP-Proteine in sieben Familien unterteilt[52]. In Säugetieren wurden 28 der 32 bekannten TRPs nachgewiesen, TRPP6 und alle TRPNs sind nicht exprimiert (**Abbildung 7**). Obwohl sie zu den NSCCs zählen, können einige TRP-Proteine auch selektiv für K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} sein. Beispielsweise sind der TRPV5 und TRPV6 Kanal selektiv für Ca^{2+} , wohingegen TRPM4 und TRPM5 überwiegend für monovalente Kationen durchlässig sind (K^+ und Na^+). Die übrigen TRPs scheinen für mono- und divalente Ionen durchgängig zu sein, wobei einige spezifisch für bestimmte Ionen sind[38].

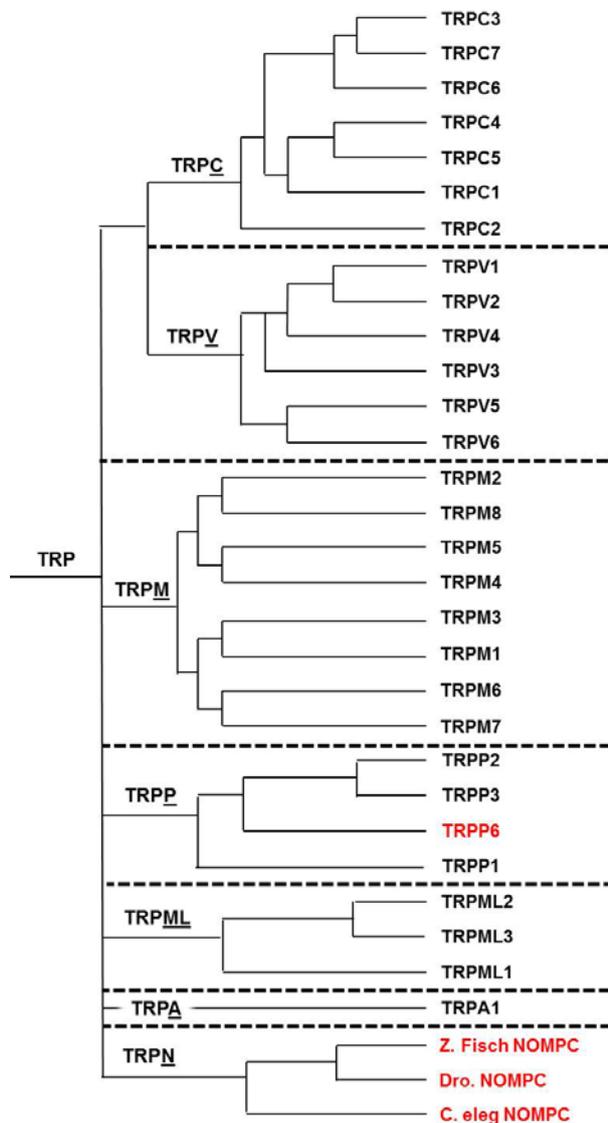


Abbildung 7: Unterteilung der TRP-Superfamilie

Anhand der Aminosäurehomologie werden die TRP-Proteine in verschiedene Subgruppen eingeteilt. *C. eleg.*: *Caenorhabditis elegans*; *Dro.*: *Drosophila melanogaster*; TRPA: ankyrin transient receptor potential; TRPC: klassischer transient receptor potential; TRPM: melastatin transient receptor potential; TRPML: mucolipin transient receptor potential; TRPN: no-mechanoreceptor potential transient receptor potential; TRPP: polycystein transient receptor potential; TRPV: vanilloid transient receptor potential; Z. Fisch: Zebrafisch. Rot markiert sind die TRPs, die bei Säugetieren nicht exprimiert werden. (verändert nach: Malczyk 2017[103])

1.8.1 Die Familie der klassischen TRP (TRPCs)

Die TRPC-Familie besteht aus sieben Mitgliedern. Die Unterteilung erfolgt anhand ihrer Struktur, Funktion und pharmakologischen Eigenschaften in vier Untergruppen; TRPC1 (I), TRPC2 (II, Pseudogen im Menschen[205]), TRPC3/6/7 (III), TRPC4/5 (IV)[139]. TRPCs werden durch Diacylglycerol (DAG) und andere Komponenten vom G-Protein Rezeptor Signalweg aktiviert. Vermittelt durch Phospholipase C kommt es am G-Protein-gekoppelten Rezeptor zu einer Spaltung von PIP₂ in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und DAG, welches TRPCs aktiviert und zum Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ führt[47].

Die Rolle von TRPC Kanälen in PH ist weitestgehend ungeklärt, wobei ein Einfluss auf die CHPH für TRPC1 und TRPC6 bereits gezeigt werden konnte[103, 194, 199].

Erhöhte Expressionen von TRPC3 und TRPC6 in der Lunge wurden bei Patienten mit IPAH[206] und bei der CHPH[93] beobachtet. Chronische Hypoxie führte in PSMCs und in intralobulären Pulmonalarterien der Ratte zu erhöhten Expressionslevel von TRPC1 und TRPC6 auf mRNA- und Protein-Ebene[93, 186], während die Expression von TRPC3 nicht reguliert war[93]. In murinen PSMCs und in mikrodisezierten murinen Gefäßen konnte unter chronischer Hypoxie allerdings eine Herabregulation von TRPC3 beobachtet werden[102].

Das TRPC3 Protein wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, wobei sich niedrigere Expressionslevel auch in anderen Geweben finden (Ovarien, Kolon, Lunge, Prostata, Plazenta, Hoden)[51, 202, 207]. In kardialen Muskelzellen führt die Aktivierung von TRPC3 zu einer Erhöhung der [Ca²⁺]_i, die vermutlich die Hypertrophie des Herzens indiziert[81, 82]. Auch auf die Kontraktion von vaskulären glatten Muskelzellen des Gehirns[135], der *A. carotis*[121] und der Aorta[97] scheint TRPC3 einen Einfluss zu nehmen. In Ratten mit primärer Hypertonie wurde eine Erhöhung von TRPC3 in vaskulären glatte Muskelzellen festgestellt[95].

1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von TRPC3 in der HPV und bei der Entstehung der CHPH in der Maus untersucht. Es wurde mit WT und TRPC3^{-/-} Mäusen gearbeitet.

Um die Relevanz von TRPC3 für die CHPH zu untersuchen, wurde diese durch 3-wöchige Hypoxie-Exposition in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen induziert. Mittels Rechts- und Linksherzkatheter wurden der rechtsventrikuläre Druck (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) und der systemarterielle Druck (*systemic arterial pressure*, SAP) gemessen. Außerdem erfolgte eine Untersuchung der Herzen auf mögliche strukturelle Veränderungen unter Hypoxie. Der linke Lungenlappen wurde für histologische Untersuchungen fixiert, während die rechten Lungenlappen sowie das Herz für molekulare Untersuchungen konserviert wurden.

Des Weiteren wurde die Relevanz von TRPC3 in der HPV mit Hilfe der isolierten, ventilerten und blutfrei-perfundierten Lungen (ILU) untersucht. Auf Grundlage der Ergebnisse wurde der Effekt von TRPC3 auf die Proliferation von PSMCs unter Normoxie und Hypoxie untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Rolle von TRPC3 für die HPV und die CHPH zu untersuchen. Entsprechende Erkenntnisse könnten Bedeutung für die Behandlung der PH haben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Software

Software	Firma	Standort
CFX Manager	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
ChemiDoc XRS+, Software Image Lab 4.1	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
LabChart 7	AD Instruments	Spechbach, Deutschland
Labtech	LabTech International Ltd	Tampa, FL, USA
Leica Application Suit, LAS, Version 4.5.0	Leica	Wetzlar, Deutschland
MxPro qPCR	Software Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
NanoDrop Software, Version 3.7.1	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
PowerLab, MPVS-Ultra Single Segment Foundation System	AD Instruments	Spechbach, Deutschland
Qwin Standard	Leica	Wetzlar, Deutschland

2.1.2 Geräte

Gerät	Firma	Standort
Absaugsystem, Vacusafe comfort	Integra Bioscience	Fernwald, Deutschland
Barometer	Aalborg	Orangeborg, SC, USA
Blotkammer Proteine	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Brennglas	Luxo	New York, NY, USA
CFX Connect™, Real-Time System	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Doppelwandiger Perfusatbehälter	Eigenbau	Universität Gießen
Druckaufnehmer, Combitrans® 1-fach Set Mod. II Uni Gießen	Braun Biotech	Melsungen, Deutschland
Einbettkasten Beschriftungsgerät	Sakura	Staufen, Deutschland
Elektrophorese E8356	Consort E8356	Ottawa, IL, USA
Entwässerungsautomat	Leica	Wetzlar, Deutschland
Feinwaage	Denver Instruments	New York, NY, USA
Frigomix U1	Braun Biotech	Melsungen, Deutschland
Glasglocke	Eigenbau	Universität Gießen
Heizplatte MR Hei-Standard	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Homgenisierer, PRECELLYS 24	Bertin Technologies	Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Isometric transducer	Havard Apparatus	Holliston, MA, USA
Katheter Arm MB-P2XC	Kanetec	Bensenville, IL, USA
Kühlplatte, EG1150C	Leica	Wetzlar, Deutschland
Lichtquelle für das Stereomikroskop KL1500	Schott	Mainz, Deutschland
Magnetkonzentrierer Dynal MPC-1	Invitrogen	Oslo, Norwegen
Mikrozentrifuge	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Microplate Reader, Infinite M200	Tecan	Männedorf, Schweiz

Material und Methoden

Mikroskop DFC 310 FX	Leica	Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Kamera, DFC420 C	Leica	Wetzlar, Deutschland
Mikroskop, Leica DMIL	Leica	Wetzlar, Deutschland
Mikroskop, Leica CTR6000	Leica	Wetzlar, Deutschland
Mikrotom, Leica RM2255	Leica	Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifuge, Plate Fuge™	Benchmark Scientific	Edison, NJ, USA
Mini Vent Type 845	Hugo Sacks Elektronik	March-Hugstetten, Deutschland
Mörser	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH	Lauda-Königshofen, Deutschland
Paraffinausgießstation, EG1140H	Leica	Wetzlar, Deutschland
Paraffinstreckbad, HI1210	Leica	Wetzlar, Deutschland
PCR Plate Sealer, PX1™	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
PCR-Cycler	Biometra	Göttingen, Deutschland
Pipette 0.5-10µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipette 100-1000µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipette 10-100µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettierhilfe, Pipetboy 2	Integra Bioscience	Zizers, Schweiz
Präparierbesteck	Fine Science Tool	Heidelberg, Deutschland
Reinstwasseranlage Milli Q®	Millipore	Schwalbach, Deutschland
Rektalsonde	AD Instruments	Spechbach, Deutschland
Rollerpumpe	Ismatec	Wertheim, Deutschland
Schüttelinkubator	Keutz -Laborbedarf	Reiskirchen, Deutschland
Semi-dry Blot	Keutz -Laborbedarf	Reiskirchen, Deutschland
Spectrophotometer, NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
SPR-671NR mikro-tip Katheter	Miliar Instruments	Houston, TX, USA
Stereomikroskop	Leica	Wetzlar, Deutschland
Sterilbank, Cellgard Class II Biology Safety Cabinet	Nuaire	Plymouth, MN, USA
Thermomix BM	Braun Biotech	Melsungen, Deutschland
Thermoregulierte Unterlage Physitemp	ADInstruments	Oxford, Vereinigtes Königreich
Tierwaage CS Series (200 g)	Ohaus	Nänikon, Schweiz
Trachealtubus, Eigenbau	Universität Gießen	Gießen, Deutschland
Transducer	Hugo Sacks Elektronik	March-Hugstetten, Deutschland
Waage, PL303	Mettler Toledo	Columbus, OH, USA
Wärmeaustauscher, Eigenbau	Universität Gießen	Gießen, Deutschland
Wärmeunterlage	AD Instruments	Spechbach, Deutschland
Wasserbad	Memmert	Schwalbach, Deutschland
Zellinkubator, Hera Cell 150	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge, Mikro 200R	Hettich AG	Lauenau, Deutschland
Zentrifuge, Rotina 420R	Hettich AG	Lauenau, Deutschland
Zentrifuge, Universal 320R	Hettich AG	Lauenau, Deutschland

Material und Methoden

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma	Standort
100er Petrischale	BD Falcon	Heidelberg, Deutschland
24-Well ImageLock Microplate	Essen BioScience	Ann Arbor, MI, USA
24-Well, 96-Well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One	Nümbrecht, Deutschland
35er, 60er Zellkulturschale	Standard Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
8er PCR Strips, Deckel	Nerbe Plus	Winsen/Luhe, Deutschland
96-Well Platte PCR Hard Shell®, thin wall	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Äußere Glasplatte (Western Blot)	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Baumwollfäde (100% Baumwolle)	John Lewis	London, Vereinigtes Königreich
Chirurgischer Fade, Polyester Garn 5/0	FSSB	Jestetten, Deutschland
Deckgläschen (24x60mm)	R. Langenbrink, Labor- und Medizintechnik	Emmendingen, Deutschland
Dreiwegehahn Discifix®	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Einbettkassette Macro	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Extension Line Type Heidelberger	Braun	Melsungen, Deutschland
Gel- und Dummy-Platte	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Geschliffene Deckgläschen	Menzel	Braunschweig, Deutschland
Individual Ventilated Cages (IVC)	Tecniplast	Hohenpeißenberg, Deutschland
Infusionsleitung flexibel PE (farbcodiert)	MicroMed	Wurmlingen, Deutschland
Innere Glasplatte (Western Blot)	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Inserts	Ibidi	Martinsried, Deutschland
Kanüle 18 G, 26 G	Becton Dickenson S.A.	Madrid, Spanien
Kanüle Neoject® 15 G	Henke Sass Wolf	Tuttlingen, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Medizinisches Klebeband Durapore®	3M	St. Paul, MN, USA
Menzelgäser Superfrost plus Gold®	Thermofisher	Waltham, MA, USA
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 ml, 2,0 ml, SafeSeal®	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pasteur-Pipetten (230 mm)	VWR	Radnor, PA, USA
PCR Deckel, Optically Clear Heat Seal	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Pipetten 10 ml Cellstar®	Greiner Bio-One	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	VWR	Radnor, PA, USA
Pipettenspitzen gestopft	Nerbe Plus	Winsen/Luhe, Deutschland
Polypropylen Röhrchen 15 ml, 50 ml, Cell Star®	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Precellys Bulk Beads	Bertin Technologies	Montigny-le-Bretonneux, Frankreich

Material und Methoden

Silikonspray	Centramed	Koblenz, Deutschland
Skalpell	Medizintechnik Feather®Safety Razor Co. Ltd.	Osaka, Japan
Spritze 1 ml, 10 ml, 50 ml	Braun	Melsungen, Deutschland
Spritze 2 ml	Becton Dickenson S.A.	Madrid, Spanien
Tygon Schläuche, verschiedene Größen	Pro Liquid	Überlingen, Deutschland
Type II Long Käfige	Tecniplast	Hohenpeißenberg, Deutschland
Zellstofftuper, Pur Zellin	Hartmann	Heidenheim, Deutschland
Zellulosehandtücher	Tork	Mannheim, Deutschland

2.1.4 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Standort
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Riedel-de Haën	Seelze, Deutschland
4x Laemmli Sample Buffer (4X)	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Agarose low gelling temperature	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Albumin bovine Fraction V, Protease-free lyophil	Serva	Heidelberg, Deutschland
Ammonium persulfat (APS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Aqua Ecotainer 1l	Braun	Melsungen, Deutschland
Clarity Western ECL Substrate, Luminol/ Enhancer Solution	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Clarity Western ECL Substrate, Peroxide solution	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Collagenase aus Clostridium hiytolyticum	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Diegst-All 2, Trypsin Concentrate and Diluent	Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Emsure	Darmstadt, Deutschland
Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS)	Pan Biotech	Aidenbach, Deutschland
Eisen (II, III)-oxide, Eisenpartikel	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Elektrolytlösung II N	Serag Wiessner	Naila, Deutschland
Ethanol (70%ig)	SAV-Liquid Production	Flintsbach, Deutschland
Ethanol (96%ig)	Fischar	Saarbrücken, Deutschland
Ethanol absolut (99,9%ig)	Fischar	Saarbrücken, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FCS/FBS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Gasgemisch: 5,3% CO ₂ , 1% O ₂ , Rest N ₂ -F50	Praxair	Danbury, CT, USA

Material und Methoden

Gasgemisch: 5,3% CO ₂ , 21% O ₂ , Rest N ₂ -F50	Praxair	Danbury, CT, USA
Glycin, Pufferan (≥99%ig)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm [®]	Ratiopharm	Ulm, Deutschland
Hoechst (33342)	Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Invitrogen Ultra Pure SDS 10%	Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, CA, USA
iTag SyBr Green Supermix Plus ROX	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Emsure	Darmstadt, Deutschland
Ketaminhydrochlorid 100 mg/mL, Ketamin [®] , 10%ig	Bela-Pharm GmbH & Co.KG	Vechta, Deutschland
Medium 199	Gibco, Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Methanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Methylgrün	Zytomed System	Berlin, Deutschland
Milchpulver, Blotting grade	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Riedel-de Haën	Seelze, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (0,9%ig) (NaCl)	Braun	Melsungen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (1M, 8,4%)	Serag Wiessner	Naila, Deutschland
Normocin	InvivoGen	San Diego, CA, USA
Paraffin, Paraplast Plus	Sigma Life Science	St. Louis, MO, USA
Pen Strep	Gibco, Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Pertext 7	Mediate	Burgdorf, Deutschland
RLT Buffer	Qiagen	Hilden, Deutschland
Smooth Muscle Cell Basalmedium 2	Promocell	Heidelberg, Deutschland
Smooth Muscle Cell Growthmedium 2	Promocell	Heidelberg, Deutschland
TEMED (99%ig)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tris, Pufferan (≥99,9%ig)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/ EDTA (10x), 0,5%/0,2%	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Ursotamin 100 mg/ml	Serumwerk	Bernbrug, Deutschland
Wasser doppelt destilliert	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30%ig) (H ₂ O ₂)	Emsure	Darmstadt, Deutschland
Xylanzin (2%ig)	Ceva Tiergesundheit	Düsseldorf, Deutschland
Xylol	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

2.1.5 Medienansätze

Puffer	Substanz	Menge
Medium I	Medium 199	500 ml
	P/S	5 ml
Medium II	Medium 199	500 ml
	P/S	5 ml
	FCS	50 ml
Medium III	Smooth Muscle Growthmedium 2	500 ml
	Smooth Muscle Medium 2 Supplement Mix	
	Normocin	50 ml
	FCS	
Medium IV	Smooth Muscle Basalmedium 2	500 ml
	Normocin	
0,2M HEPES, pH:7,4	HEPES	4,76 g
	Aqua dest.	100 ml
Trypsin 1-fach	Trypsin/ETDA (10x)	12 ml
	NaCl	96 ml
	HEPES (0,2 M)	12 ml
Eisen-Agarose	Medium 199	3 ml/Lunge
	Eisen	15 mg/Lunge
	Agarose	15 mg/Lunge
Agarose	Medium 199	3 ml/Lunge
	Agarose	30 mg/Lunge
Kollagenase	Medium I	10 ml/Lunge
	Kollagenase	80 U/ml
RNA-Puffer	RLT-Puffer	1 ml
	β -Mercaptoethanol	10 μ l
PBS (20x)	NaCl	80 g
	KCl	4 g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	23 g
	KH_2PO_4	4 g
PBS (1x)	PBS (20x)	250 ml
	Aqua dest.	4750 ml
	NaOH und HCl	bis pH 7,4
BSA (10%ig)	BSA	20 g
	NaN_3	26 mg (2mM)
	PBS (1x)	200 ml
H_2O_2 + Methanol (3%ig)	Methanol	180 ml
	H_2O_2	20 ml

Material und Methoden

2.1.6 Pufferlösungen

Puffer	Substanz	Menge
Lämmli- Puffer (10fach)	Tris (250 mM)	30,28 g/l
	Glycin (1,9 M)	144 g/l
	SDS (1%ig)	10 g/l
	Rest mit Wasser auffüllen	
Waschpuffer (10fach)	Tris (200 mM)	24,23 g/l
	NaCL (1,5 M)	87,66 g/l
	HCl (37%ig)	bis pH 7,5
	Rest mit Wasser auffüllen	
Transfer Puffer	Tris	11,6 g
	Glycin	5,8 g
	SDS (20%ig)	3,7 ml
	Methanol	400 ml
	Wasser	1600 ml
Stripping-Lösung	Aqua dest.	90 ml
	Glycin (1 M)	10 ml
	HCl (37%ig)	2 ml
Milchpuffer (6%ig)	Milchpulver	6 g
	Waschpuffer (1x)	100 ml

2.1.7 Kits

Kit	Firma	Firmensitz
3, 3 -Diaminobenzidine (DAB)	Vector	Peterborough, Vereinigtes Königreich
Click-iT EdU Imaging Kit	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
DC Protein Assay	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
ImmPRESS Reagent Kit	Vector	Peterborough, Vereinigtes Königreich
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
MM HRP_Polymer Kit	Biocare Medical	Pacheco, CA, USA
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen	Hilden, Deutschland
TGX Stain-Free Fast Cast Acrylamide Kit 12%ig	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Vector VIP	Vector	Peterborough, Vereinigtes Königreich

Material und Methoden

2.1.8 Antikörper

Antikörper	Firma	Firmensitz
Anti-TRPC3 antibody, ab 51560	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-TRPC3 antibody, ACC-016	Alomone labs	Jerusalem, Israel
Anti Mouse IgG, HRP Conjugate, W4028	Promega	Madison, WI, USA
Rabbit AK IgG, HRP Conjugate, W4011	Promega	Madison, WI, USA
β -Actin, Clone AC-74, A5316	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
α -Actin, mouse, monoclonal/ Clone 1A4	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Von-Willebrand-Faktor, rabbit, polyklonal	Dako	Hamburg, Deutschland

2.1.9 Primer

Gen	Sequenz
B ₂ M	F: 5'-AGC CCA AGA CCG TCT ACT GG-3' R: 5'-TTC TTT CTG CGT GCA TAA ATT G-3'
Cyclin D1	F: 5'-CTA CCG CAC AAC GCA CTT TC-3' R: 5'-GCA GGC TTG ACT CCA GAA GG-3'
HPRT1	F: 5'-GCT GAC CTG CTG GAT TAC AT-3' R: 5'-TTG GGG CTG TAC TGC TTA AC-3'
Ki67	F: 5'-GTC GCT TTG GAC AGT GAA CCT-3' R: 5'-TTC TTG TTC TTA ACT TCT TGG TGC AT-3'
PCNA	F: 5'-CTG TGC AAA GAA TGG GGT GA-3' R: 5'-AAG TGT CCC ATG TCA GCA ATT TT-3'
TRPC1	F: 5'-TGG GCC CAC TGC AGA TTT CAA-3' R: 5'-AAG ATG GCC ACG TGC GCT AAG GAG-3'
TRPC3	F: 5'-AGC CGA GCC CCT GGA AAG ACA C-3' R: 5'-CCG ATG GCG AGG AAT GGA AGA C-3'
TRPC4	F: 5'-GGG CGG CGT GCT GCT GAT-3' R: 5'-CCG CGT TGG CTG ACT GAT TTG TAG-3'
TRPC5	F: 5'-AGT CGC TCT TCT GGT CTG TCT TT-3' R: 5'-TTT GGG GCT GGG AAT AAT G-3'
TRPC6	F: 5'-GAC CGT TCA TGA AGT TTG TAG CAC-3' R: 5'-AGT ATT CTT TGG GGC CTT GAG TCC-3'
TRPC7	F: 5'-GTG GGC GTG CTG GAC CTG-3' R: 5'-AGA CTG TTG CCG TAA GCC TGA GAG-3'

F: *Forward* (vorwärts); R: *Reverse* (rückwärts)

Material und Methoden

2.2 Methoden

2.2.1 *In vivo* Versuche

2.2.1.1 Mauslinie und Versuchsgenehmigung

In dieser Doktorarbeit wurden Tierversuche mit Mäusen (*Mus musculus*) der Mauslinie B6.129S-TRPC3^{tm1.1Akon} (TRPC3 *Knockout* Mauslinie), mit dem Genotyp TRPC3^{+/+} (WT) und TRPC3^{-/-}, durchgeführt. Das TRPC3 Gen wurde im Exon 7 in 129S/SvEv Maus-Stammzellen modifiziert, in eine C57BL/6J-Blastozyste transferiert und die Nachkommen über zehn Generationen auf den C57BL/6J Hintergrund zurückgezüchtet[55]. Phänotypisch führt das homo- oder heterozygote Fehlen von TRPC3 zu einem abnormalen Gang und einer veränderten Elektrophysiologie im Nervensystem[55]. Es wurden weibliche und männliche Mäuse der TRPC3 *knockout* Mauslinie *in vivo* (u.a. Histologie, Hämodynamik) und *in vitro* (Zellkultur) Versuchen verwendet. In der ILU wurden nur männliche Mäuse verwendet.

Die Tierexperimente wurden entsprechend der EU-Richtlinie 86/609/EWg, nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen, durchgeführt (Aktenzeichen A34_2011, A115_2014 und G07_2016).

2.2.1.2 Versuchsaufbau

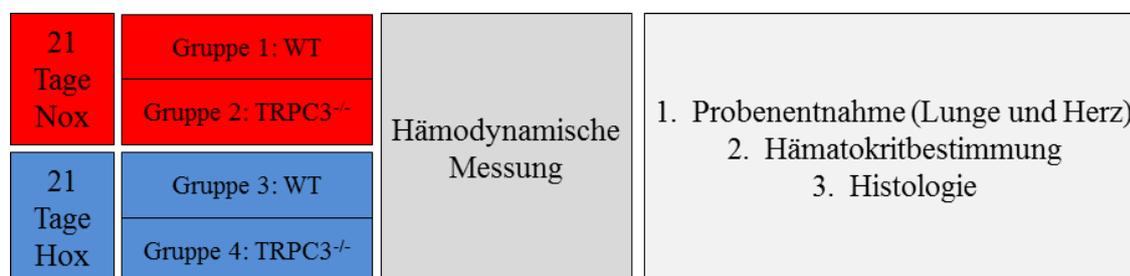


Abbildung 8: Ablauf der *in vivo* Versuche

Um einen möglichen Einfluss von TRPC3 auf die chronische Hypoxie zu untersuchen wurden TRPC3^{-/-} (Gruppe 2 und 4) und WT (Gruppe 1 und 3) Mäuse für 21 Tage unter Normoxie (Gruppe 1 und 2) oder Hypoxie (Gruppen 3 und 4) gehalten. Auf die Exposition folgte die hämodynamische Messung unter Narkose mit anschließender Tötung der Mäuse, Organentnahme, Hämatokritbestimmung und Aufarbeitung der Lungen für die Histologie. Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Für die 21-tägige Hypoxie-Exposition erfolgte eine randomisierte Aufteilung der Mäuse in 4 Gruppen (**Abbildung 8**). WT und TRPC3^{-/-} Mäuse wurden für 3 Wochen unter normobaren Bedingungen in Hypoxie (10% O₂), was einem Sauerstoffpartialdruck wie in 5000 m Höhe über dem Meeresspiegel entspricht[145] oder Normoxie (21% O₂) gehalten. Die Gruppe der normoxischen Mäuse wurde als Kontrollgruppe verwendet.

Material und Methoden

Die CO₂- und O₂-Partialdrücke während des Versuchs wurde regelmäßig gemessen und kontrolliert. Die Photoperiodik war auf 12 Stunden Hell- und Dunkelphase eingestellt, die Umgebungstemperatur betrug 22°C, die Luftfeuchtigkeit 40 bis 70%. Die Käfige waren mit Einstreu, Nistmaterial, Nageholz und Versteckmöglichkeiten ausgestattet und wurden mindestens einmal pro Woche gesäubert. Der Gesundheitszustand sowie die Wasser- und Futtermittelversorgung (Standarddiät mit Altromin 1324) wurden während des Versuches regelmäßig kontrolliert. Die gesundheitliche Verfassung der Mäuse wurde anhand des Gewichtes, Verhaltens und des äußeren Erscheinungsbilds beurteilt und in einem vorgegebenen *Scoresheet* dokumentiert. Im Versuchsprotokoll wurden zudem die Abbruchkriterien zum Wohle der Versuchsmäuse definiert und mit Hilfe des *Scoresheets* umgesetzt. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere zwischen 12 und 16 Wochen alt.

2.2.1.3 Hämodynamik

Um den Schweregrad der PH zu ermitteln wurden die Versuchsmäuse nach 3-wöchiger Versuchsdauer mittels Rechtsherzkatheter hämodynamisch untersucht[145].

Vorbereitend wurden die Schläuche, die Druckaufnehmer und der angeschlossene Katheter mit physiologischer Kochsalzlösung luftblasenfrei gespült. Fünfzehn Minuten vor der Narkosegabe wurde den Mäusen Heparin (1000 I.E./Kg KG) intraperitoneal gespritzt, um die Gerinnung des Blutes während der Messung zu verhindern. Die Mäuse wurden anschließend mittels Isofluraninhalation (3 bis 5%ig) narkotisiert und die Anästhesietiefe während der gesamten Messung durchgehend überwacht. Vor der Präparation der Mäuse wurde die Narkosetiefe anhand der nozizeptiven und viszerale Reflexe (Reizung der Fußsohle, Augenreflex) überprüft. Bei tiefer Narkose wurden die Mäuse in Rückenlage auf einer Wärmeunterlage fixiert und eine rektale Temperatursonde zur Überwachung der Körpertemperatur eingeführt. Zur Desinfektion des Operationsfelds wurde Braunoderm-Lösung im lateralen Halsbereich aufgetragen. Die Haut wurde in diesem Areal durch einen ca. 1 cm großen Schnitt entfernt. Die *Glandula mandibularis* und die darunterliegenden Muskeln wurden zur Seite präpariert, sodass eine Ligatur unterhalb der Trachea gelegt werden konnte. Es wurde eine Tracheotomie durchgeführt, wobei der Tubus mittels der Ligatur fixiert wurde. Die Mäuse wurden über den Tubus mit Sauerstoff und Isofluran (1,5 bis 2,5%ig) beatmet (Frequenz der Atemzüge: 140/min, Atemzugvolumen 10 ml/Kg KG). Die rechte *Vena jugularis* wurde freipräpariert und ein Miller-Katheter eingeführt. Dieser wurde in den rechten Ventrikel vorgeschoben, sodass der RVSP aufgezeichnet werden konnte.

Material und Methoden

Anschließend wurde die *Arteria carotis* freigelegt, ein Miller-Katheter eingeführt, in die Aorta vorgeschoben und der SAP gemessen. Die gemessenen Daten wurden von dem Programmen PowerLab und LabChart7 aufgezeichnet und anschließend analysiert. Die hämodynamischen Messungen wurden von Karin Quanz durchgeführt.

Nach der Messung wurden die Mäuse durch Blutentzug getötet. Das Blut wurde zur Hämatokrit-Bestimmung in eine Kapillare aufgenommen, zentrifugiert (4 Minuten, 16060g, Raumtemperatur) und mittels Hämatokritskala bestimmt.

2.2.1.4 Spülung der Lunge

Der Brustkorb wurde nach Durchführung der hämodynamischen Messung und Entbluten, eröffnet. Der Tubus und die Beatmung blieben erhalten (**Abbildung 9 A**). Der Thymus sowie das Perikard wurden entfernt und eine Ligatur unter die Pulmonalarterie gelegt (**Abbildung 9 B**). Über ein Loch im rechten Ventrikel konnte ein Spülkatheter in die Pulmonalarterie eingeführt werden, der mittels der Ligatur fixiert wurde (**Abbildung 9 C**). Über den Katheter wurde die Lunge mit NaCl unter einem Druck von 22 cmH₂O blutleer gespült. Zum Abfluss der Spülflüssigkeit und der Verhinderung eines pulmonalen Ödems wurde ein Loch in den linken Ventrikel gemacht (**Abbildung 9 D**).

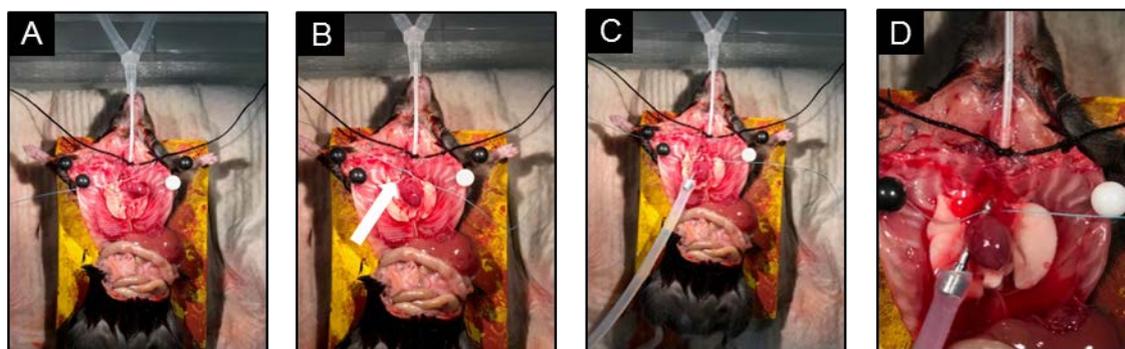


Abbildung 9: Lungenspülung nach hämodynamischer Messung

A) Beatmung der Lunge über die Trachea. B) Platzieren der Ligatur um die Pulmonalarterie. C) Einführen eines Spülkatheters in die Pulmonalarterie und Fixierung mit der Ligatur. D) Spülung der Lunge mit NaCl bei einem Druck von 22 mmHg und Austritt der Spülflüssigkeit über ein Loch im linken Ventrikel.

Mit Hilfe einer Ligatur wurde der rechte Lungenflügel abgeschnürt, abgetrennt und für molekularbiologische Untersuchungen bei -80°C eingefroren. Danach wurde die Beatmung beendet und der linke Lungenflügel über die Trachea mit NaCl, bei einem Druck von 12 cmH₂O aufgebläht. Hierzu wurde der Katheter mit einer Ligatur fixiert, welche zusätzlichen beim Entfernen des Katheters einen Rückfluss des NaCl

Material und Methoden

verhinderte. Der linke Lungenflügel wurde zur Konservierung für die Histologie in Formalin überführt. Des Weiteren wurden das Gehirn, die Leber, das Blut, der rechte und linke Ventrikel sowie das Septum eingefroren.

2.2.1.5 Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie (RHH)

Zur Ermittlung des Grades an RHH wurde der Fulton-Index bestimmt. Hierzu wurde das Herz von Fettgewebe, Gefäßen und Herzohren befreit. Der linke und rechte Ventrikel sowie das Septum wurden präpariert und die jeweiligen Gewichte bestimmt. Das Gewicht des rechten Ventrikels wurde in Relation zum linken Ventrikel mit Septum gesetzt. Dieser sogenannte Fulton-Index wurde als Maß für die RHH verwendet.

$$\text{Fulton – Index} = RV / (LV + S)$$

Formel 1: Fulton-Index als Maß für die RHH

LV: Gewicht des linken Ventrikels; RV: Gewicht des rechten Ventrikel; S: Septum.

Die Präparation des Herzens wurde durch Karin Quanz durchgeführt.

2.2.2 Histologie

Die präparierten linken Lungenflügel wurden in Einbettkästen gelegt und für 24 Stunden in 3,7%ige Formaldehydlösung fixiert. Danach wurden sie für drei bis vier Tage in kalter Dulbecco's Phosphat-gepufferter Lösung (*dulbecco's phosphat-bufferes saline*, DPBS) gelagert, wobei das DPBS alle 24 Stunden erneuert wurde. Anschließend erfolgte die Entwässerung für 24 Stunden in 50%igem Alkohol, bevor zu 70%igem Alkohol überführt wurde. Nach der Entwässerung im Routineprogramm des geschlossenen Vakuumgewebe-Infiltrationsautomat wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Auf einer Kühlplatte wurde das Paraffin gehärtet bis die Wachsböcke entnommen werden konnten.

Die Proben wurden am Mikrotom in 3 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger gelegt. Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades der Gefäße in den fixierten Lungen wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen glattmuskuläres α-Aktin und von-Willebrand-Faktor nach dem angegebenen Protokoll gefärbt.

Alle Schritte, falls nicht anders angegeben, wurden in Raumtemperatur durchgeführt.

Material und Methoden

Tabelle 2: Färbung mit α -Aktin

Inkubationsdauer	Reagenz	Anmerkung
60 Minuten	bei 58 °C	Deparaffinieren
3x 10 Minuten	Xylol	Ablösen des Paraffins
2x 5 Minuten	Ethanol absolut (99,6%ig)	Rehydrierung
5 Minuten	Ethanol (96%ig)	
5 Minuten	Ethanol (70%ig)	
20 Minuten	H ₂ O ₂ - Methanol Gemisch (3%ig)	Inaktivierung endogener Peroxidasen
2x 5 Minuten	Aqua dest.	Waschschritt
2x 5 Minuten	DPBS	
15 Minuten	Trypsin	Freilegen der Protein-Epitopen bei 37°C
3x 5 Minuten	DPBS	Waschschritt
20 Minuten	BSA-Lösung (10%ig)	
3x 5 Minuten	DPBS	
30 Minuten	Rodent Block M	MM HRP_Polymer Kit
3x 5 Minuten	DPBS	Waschschritt
30 Minuten	Primärantikörper (α -Aktin)	1:900 in 10%iger BSA-Lösung
4x 5 Minuten	DPBS	Waschschritt
20 Minuten	MM HRP Polymer	
3x 5 Minuten	DPBS	Waschschritt
1 bis 4 Minuten	Vector VIP Substrat Kit	Violette Färbung der glatten Muskulatur
5 Minuten	H ₂ O	Waschschritt

Material und Methoden

Tabelle 3: Färbung mit von-Willebrand-Faktor

Inkubations-Dauer	Reagenz	Anmerkung
2x 5 Minuten	DPBS	Waschschritt
20 Minuten	BSA-Lösung (10%ig)	Blockieren der unspezifischen Bindestellen
3x 5 Minuten	DPBS	Waschschritt
20 Minuten	Serumblock I	
30 Minuten	Primärantikörper (Anti-vWF)	1:900 in 10%iger BSA-Lösung bei 37°C
4x 5 Minuten	DPBS	Waschschritt
30 Minuten	sekundärer Antikörper (Anti-rabbit IgG)	
4x 5 Minuten	DPBS	Waschschritt
1 bis 40 Sekunden	DAB Substrat Kit	Braune Färbung des Endothels
5 Minuten	H ₂ O	Waschschritt
1 bis 3 Minuten	Methylgrün	Inkubation bei 60°C
1 Minuten	Aqua dest.	Waschschritt
2x 30 Sekunden.	Ethanol (96%ig)	Dehydrierung
30 Sekunden	Isopropylalkohol (2-Propanol)	
30 Sekunden	Isopropylalkohol	
3x 2 Minuten	Xylol	
	Eindecken mit Pertex 7	Fixierung des Gewebes

Durch anti- α *smooth muscle actin* (anti- α -SMA) wurden die SMC der Gefäßwand violett und durch anti-von-Willebrand-Faktor (anti-vWF) die Endothelzellen der Gefäßwand braun angefärbt. Der Muskularisierungsgrad, d.h. der prozentuale Anteil eines Gefäßes der durch anti- α -SMA angefärbt wurde, konnte mit dem Programm QwinV3 ausgewertet werden. Die Gefäße wurden bei 40x Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop detektiert und manuell ausgewählt, indem das Lumen markiert wurde (**Abbildung 10**). Durch die Software wurde der Anteil der muskularisierten Gefäßwand, sowie die Größe der Gefäße berechnet. Bei einer Muskularisierung von $\leq 5\%$ wurde das Gefäß als nicht muskularisiert, zwischen 5% und 70% als teil-muskularisiert und ab 70% als vollmuskularisiert gewertet. Es wurden alle Gefäße eines Schnittes gezählt.

Material und Methoden

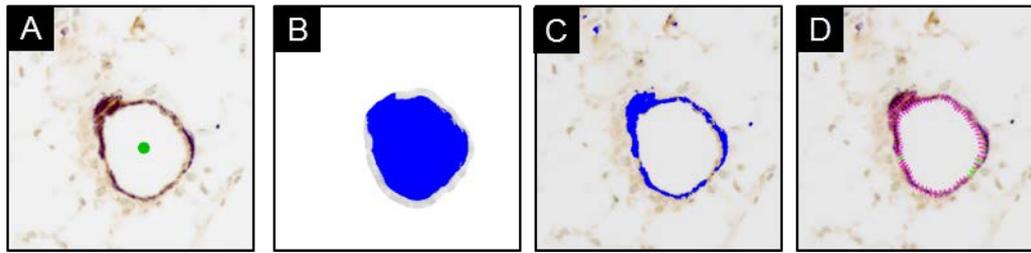


Abbildung 10: Histologische Bestimmung des Muskularisierungsgrades eines Gefäßes

A) Detektion des Gefäßes unter dem Mikroskop und Markierung des Gefäßes (grüner Punkt) B) Detektion des Gefäßlumens C) Markierung der Gefäßwand D) Ermittlung der Muskularisierung (grüne Anteile = Endothel, lila Anteile = glatte Muskulatur).

2.2.3 Isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Lunge (ILU)

Zur Beurteilung der Reaktion der Lungengefäße auf Hypoxie wurden Experimente mittels ILU durchgeführt. Es wurden männliche TRPC3^{-/-} und WT Mäuse verwendet. Die Lungen wurden wie bereits beschrieben präpariert[193]. Die Maus wurde durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin (40 bis 160 mg/Kg KG) und Xylazin (8 bis 32 mg/Kg KG) narkotisiert. Die Zugabe von Heparin zur Narkosemischung (1000 I.E./Kg KG) verhinderte die Koagulation des Blutes während der Präparation. Die Narkosetiefe wurde durch Reflexprüfung an den Pfoten kontrolliert. Die Maus wurde senkrecht an einer Korkmatte fixiert, das Fell eröffnet und die Trachea von umliegender Muskulatur, Speicheldrüse und Fett befreit. Dorsal der Trachea wurde eine Ligatur zur Befestigung des Tubus gelegt. Mittels Tracheotomie wurde ein Tubus eingeführt und die Lunge mit normoxischem Gas (21% O₂, 5,3% CO₂, mit N₂ kalibriert) ventiliert. Um einen Kollaps der Alveolen während der Präparation zu verhindern, wurde ein künstlicher Überdruck (*positive end-expiratory pressure*; PEEP) von drei ml Wassersäule erzeugt. Die Bauchdecke und der Thorax wurden eröffnet und der Thymus und das Perikard entfernt. Anschließend wurde eine Ligatur um die Pulmonalarterie gelegt. Um den Abfluss des Perfusats zu gewährleisten, wurde ein kleines Loch in den linken Ventrikel geschnitten und ein Katheter eingeführt. In den rechten Ventrikel wurde ebenfalls ein kleines Loch geschnitten und ein Katheter eingesetzt, während die Lunge bei geringer Durchflussrate mit 4°C kalter Lösung gespült wurde. Nach der Fixierung des Katheters mit Hilfe der zuvor gelegten Ligatur wurde die Lunge aus dem Thorax präpariert. Das Perfusat wurde vor Versuchsbeginn aus 98 ml Elektolytlösung II N und 2,2 ml Natriumhydrogencarbonat angesetzt und für 30 Minuten mit normoxischem Gas begast, bis ein pH von 7,2 erreicht wurde. Während des Versuches erhöhte sich der pH auf den physiologischen Wert von 7,4. Die

Material und Methoden

Durchflussgeschwindigkeit wurde auf zwei ml pro Minute hochreguliert. Im gesamten System zirkulierte ein Volumen von 15 ml Perfusat. Zeitgleich wurde die Lunge über den Tubus ventiliert. Das Atemzugvolumen wurde an das Gewicht des Tieres angepasst (10 ml/Kg KG). Außerdem wurde das Perfusat auf 37°C erwärmt, um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen. Um Austrocknung oder Unterkühlung der Lunge zu verhindern, wurde ein feuchtes Tuch in eine nach oben geöffnete, mit 40°C warmen Wasser beheizte, doppelwandige Glasglocke gelegt. Diese Glocke wurde um die Lunge befestigt, sodass sie vollständig von dieser umgeben war. Dieses Vorgehen stellt eine Umgebungstemperatur der Lunge von 37°C sicher. Der linksarterielle Druck wurde auf 1,8 mmHg eingestellt. Mit Hilfe von Drucksensoren wurde der PAP gemessen werden. Zur Überprüfung der Reaktion der Lunge und der Änderung des PAP auf hypoxische Ventilation, wurde folgendes Protokoll angewendet (**Abbildung 11**):

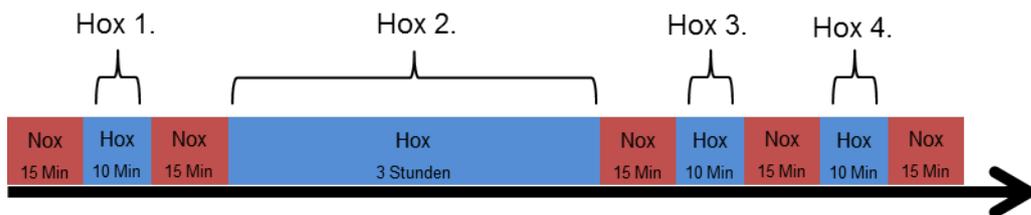


Abbildung 11: ILU Protokoll der verlängerten Hypoxie

Dargestellt ist der Versuchsablauf zur Untersuchung der HPV mittels ILU. Angegeben sind die Art der Ventilation und die jeweilige Zeitdauer. Zur Beurteilung und Auswertung des Einfluss eines *Knockouts* wurde die Reaktion des PAP während der Hox 2 herangezogen. Blau/Hox: Hypoxie (1% O₂); Rot/Nox: Normoxie (21% O₂).

Zunächst wurde die akute Reaktion der Pulmonalarterien durch 10-minütige Ventilation mit hypoxischem Gas (1% O₂, 5,3% CO₂, mit N₂ kalibriert) (Hox 1.) überprüft. Anschließend wurde für drei Stunden mit hypoxischem Gas ventiliert (Hox 2.), um eine sogenannte *sustained* Hypoxie zu provozieren. Danach wurde erneut die Reaktion auf akute Hypoxie gemessen (Hox 3. und Hox 4.)(**Abbildung 11**).

Neben dem PAP wurde der linksventrikuläre Druck (*left ventricular systolic pressure*, LVP) aufgezeichnet, der konstant bei 1,8 mmHg liegen sollte. Außerdem wurden der Ventilationsdruck sowie das Gewicht der Lunge aufgezeichnet. Die ILUs wurden mit der Unterstützung von Alexandra Erb und Karin Quanz durchgeführt.

Material und Methoden

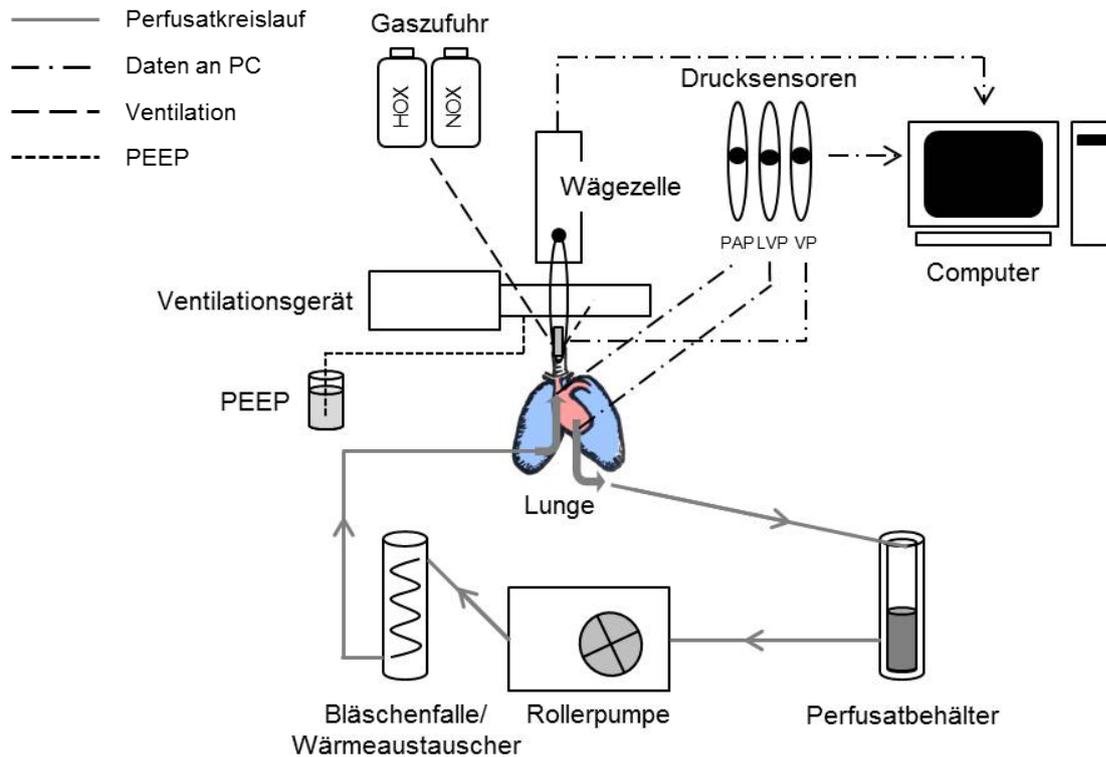


Abbildung 12: Aufbau der ILU

Nach der abgeschlossenen Präparation der Lunge, gelangt das Perfusat über die Pulmonalarterie in den Lungenkreislauf und wird über den linken Ventrikel zurück zum Perfusatbehälter geleitet, der als Reservoir zur Gewährleistung einer kontinuierlichen Versorgung dient. Über den Wärmeaustauscher wird das Perfusat auf Körpertemperatur gehalten und durch die Rollerpumpe wieder zurück zur Lunge geleitet. Beatmet wird die Lunge über einen Tubus mit normoxischen oder hypoxischen Gas mit Hilfe eines Ventilationsgeräts. Der PEEP verhindert ein Kollabieren der Alveolen während der Expiration. Es werden der pulmonalarterielle Druck, der linksventrikuläre Druck und der Ventilationsdruck von Drucksensoren aufgenommen und an einem Computer aufgezeichnet. Während des Versuchs wird das Gewicht der Lunge über eine Wägezelle gemessen. Mit der Gewichtsmessung kann eine mögliche Ödementstehung erfasst werden. LVP: Linksventrikulärer Druck; PAP: Pulmonalarterieller Druck; PEEP: Positiver endexpiratorischer Druck; VP: Ventilationsdruck.

2.2.4 Isolation und Kultiveringung von murinen PASMCM

Die Maus wurde mit einem Gemisch aus Xylazin (20 mg/Kg KG), Ketamin (100 mg/Kg KG), Heparin (50.000 I.E./Kg KG) und NaCl anästhesiert. Die ausreichende Tiefe der Narkose wurde durch eine Reflexprüfung sichergestellt (**Abbildung 13 A**). Anschließend wurde die Bauchdecke eröffnet und die *Vena cava inferior* und *Aorta abdominalis* durchtrennt, sodass die Maus durch Blutentzug getötet wurde (**Abbildung 13 B und C**). Danach wurde der Brustkorb bis zum Kiefer freigelegt (**Abbildung 13 D**). Die Speicheldrüsen und der Thymus wurden entfernt. Dorsal der Trachea wurde eine Ligatur gelegt. Das Diaphragma wurde vom Brustkorb gelöst und der Brustkorb in der Mitte des Sternums eröffnet. Ein Katheter wurde in die Pulmonalarterie mit Hilfe einer Ligatur eingebunden (**Abbildung 13 E und F**). Um den

Material und Methoden

Abfluss der Spülflüssigkeit zu gewährleisten und ein pulmonales Ödem zu verhindern, wurde ein kleines Loch in den linken Ventrikel des Herzens geschnitten. Die Lunge wurde über den Katheter mit DPBS gespült und anschließend mit einem Eisen-Agarose-Gemisch befüllt (**Abbildung 13 G und H**). Nachdem das Eisen vollständig über den Katheter in die Lunge geleitet wurde und in präkapillären Bereich akkumulierte, konnte der Katheter entfernt und die Ligatur verschlossen werden. Anschließend wurde eine Agarose-Lösung mit Hilfe eines Tubus vorsichtig über die Trachea in die Lunge eingeleitet bis diese vollständig aufgebläht wurde (**Abbildung 13 I**). Abschließend wurde der Tubus entfernt und die Ligatur verschlossen (**Abbildung 13 J**). Die Lunge und das Herz wurden herauspräpariert, in 4°C kalte DPBS überführt und für 10 Minuten auf Eis gekühlt.

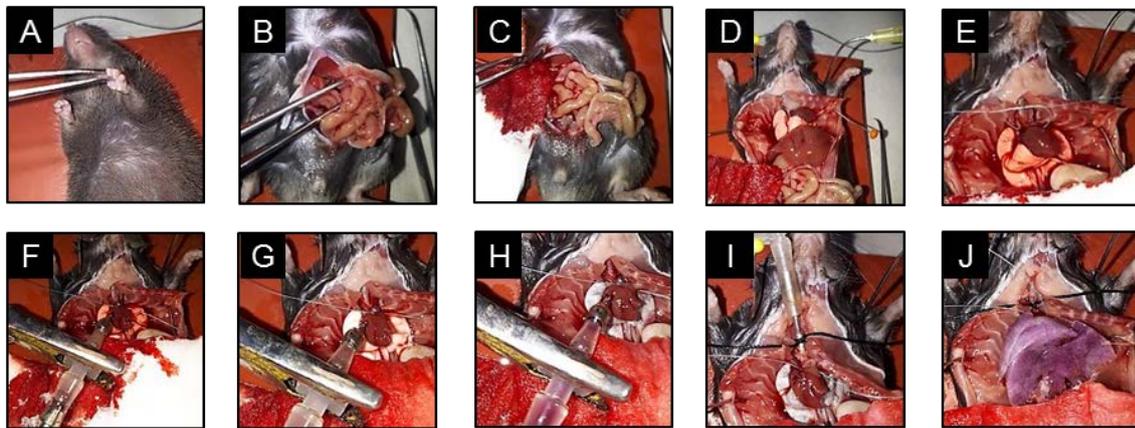


Abbildung 13: Isolation von murinen PSMCs aus präkapillären Gefäßen

A) Testen der Narkosetiefe mittels Reflexprüfung. B) Eröffnung der Bauchdecke und Freilegung der *Vena cava inferior* und *Aorta abdominalis*. C) Entbluten der Maus mittels Durchtrennung der *Vena cava inferior*. D) Eröffnung des Thorax. E) Legen einer Ligatur um die Pulmonalarterie. F) Einführung des Katheters in die Pulmonalarterie. G) Spülung der Lunge. H) Befüllen der Lunge mit einer Agarose-Eisenpartikel-Suspension. I) Fixierung eines Tubus in der Trachea. J) Aufblähung der Lunge mittels Agarose Lösung über den Tubus.

Die Weiterverarbeitung des Lungengewebes erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Das entnommene Gewebe wurde in eine Petrischale übertragen und das Herz sowie die Trachea entfernt. Die fünf Lungenlappen wurden mit drei Scheren, durch gleichzeitiges, schnelles Öffnen und Schließen mechanisch zerkleinert. Die Gewebestücke wurden mit 10 ml kaltem DPBS unter Verwendung eines magnetischen Konzentrierers drei Mal gewaschen. Dann wurden die Lungenstücke in Kollagenase resuspendiert, die Lungengewebe-Kollagenase-Suspension auf eine Petrischale überführt und für 55 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Material und Methoden

Nach dem enzymatischen Verdau wurde die Kollagenase-Aktivität mit 10 ml Medium II abgestoppt. Die Lungenstücke wurden zunächst mit einer 26G Kanüle, dann mit einer 18G Kanüle mittels mehrfachen Aufziehens durch Scherkräfte zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe des magnetischen Konzentrierers wieder von der Flüssigkeit getrennt und in 10 ml Medium II mit Hilfe eines magnetischen Konzentrierers drei Mal gewaschen. Die Eisenpartikel wurden in drei bis vier ml Wachstumsmedium (Medium III) resuspendiert, auf eine Kulturplatte transferiert und im Brutschrank inkubiert (Aussaat 1).

Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig kontrolliert. Nach Anwachsen der ersten Zellen nach wenigen Tagen wurden die Eisenpartikel resuspendiert, mit einer Spritze abgenommen und auf eine neue Platte in frischen Medium III ausgesät (Aussaat 2). Insgesamt wurden drei Aussaaten angefertigt bis die angewachsenen Zellen einer Maus kumuliert und gesplittet wurden (Passage 1).

Beim „Splitten“ wurden die Kulturplatten mit DPBS gespült und für maximal fünf Minuten in Trypsin bei 37°C inkubiert, welches zum Ablösen der Zellen führte. Unter dem Mikroskop wurde dieser Vorgang kontrolliert. Die Zellen wurden in ein Zentrifugiergefäß überführt und der enzymatische Verdau mit FCS abgestoppt. Die trypsinierten Zellen wurden dann zentrifugiert (fünf Minuten, 338 g) und das Pellet in Medium III resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und entsprechend des Versuchsaufbaues ausgesät.

Die kultivierten PSMCs wurden in Medium IV (Wachstumsfaktor-frei) in Passage 1 ausgesät (5000 bis 6000 Zellen pro cm²). Die PSMCs wurden für 24 Stunden bei Normoxie kultiviert und anschließend in normoxischen oder hypoxischen Medien III für verschiedene Zeitpunkte unter Normoxie (21% O₂) oder Hypoxie (1% O₂), normobar, kultiviert (**Abbildung 14**).

Material und Methoden

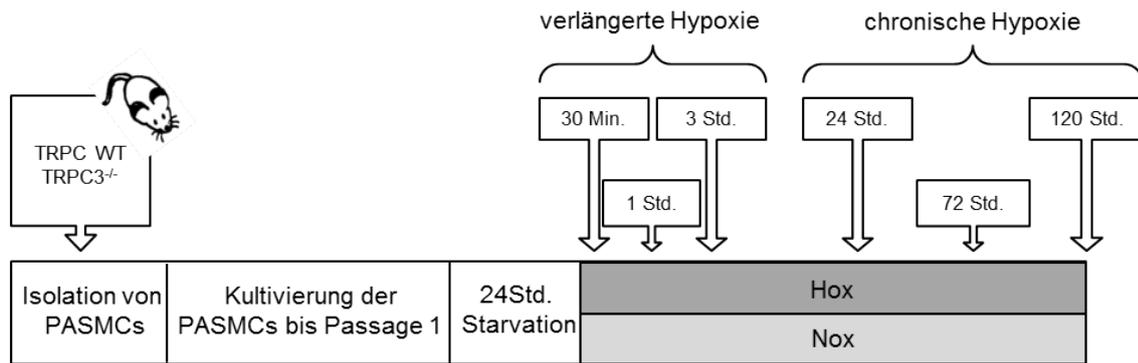


Abbildung 14: Schematische Darstellung der hypoxischen Exposition von PASC für Genexpressionsanalysen

Die PASCs wurden aus WT und TRPC3^{-/-} Mäusen isoliert. Anschließend wurden die Zellen kultiviert und für den Versuch „gesplittet“ (Passage1). Es folgte eine Kultivierung für 24 Stunden in Medium IV. Die Zellen wurden 30 Minuten, 1 Stunde und 3 Stunden (anhaltende Hypoxie, 1% O₂) sowie 24 Stunden, 72 Stunden und 120 Stunden (chronische Hypoxie, 1% O₂) hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die in Normoxie kultiviert wurden. Hox: Hypoxie; Min: Minuten; Nox: Normoxie; PASC: pulmonalarterielle glatte Muskelzellen; Min.: Minuten; Std.: Stunden.

2.2.5 Genexpressionsanalyse

Um RNA aus Zellen zu isolieren, wurden diese in RNA-Puffer auf Eis lysiert. Hierzu wurde das Medium zunächst abgesaugt und die Zellen drei Mal mit DPBS gespült. Danach wurden 350 µl des RNA-Puffers hinzugegeben und die Zellen vom Boden abgescharbt. Das Lysat wurde in ein RNase freies Tube überführt und die RNA mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* laut Herstellerangaben extrahiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden 350 µl 70%iges Ethanol zu den lysierten Zellproben hinzugefügt, vermischt und auf die *RNeasy Spin Columns* übertragen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (15 Sekunden, 6082 g), wobei es zur Bindung der RNA an die Silica Membran der *Columns* kam. Das Lysat wurde verworfen, die Membran mit 700 µl RW1 Puffer gewaschen und zentrifugiert (15 Sekunden, 6082 g). Es folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer und anschließender Zentrifugation (15 Sekunden, 6082 g und zwei Minuten bei 6082 g). Zum Trocknen der Membran wurde erneut zentrifugiert (1 Minute, 21382 g) und die RNA anschließend in RNase freiem Wasser eluiert (1 Minute, 6082 g). Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Hierzu wurde 1 µl Probe auf die Linse pipettiert und mittels Xenon Licht bei 260 nm (OD₂₆₀) und 280 nm (OD₂₈₀) spektralphotometrisch analysiert.

Um die Genexpression zu bestimmen, musste die isolierte RNA in cDNA unter Verwendung des *iScript cDNA Synthesis Kit* laut Herstellerangaben umgeschrieben werden. Die Proben wurden in PCR-Reaktionsgefäße mit RNase-freiem Wasser auf

Material und Methoden

15 µl verdünnt, sodass 200 bis 1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben werden konnten. Anschließend wurde eine Reaktionsmischung aus 1 µl *iScript* reverse Transkriptase und 4 µl *iScript Reaction Mix* hergestellt und zu jedem Ansatz hinzugefügt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in einen *PCR Thermocycler* gegeben und folgendes Programm angewendet (**Tabelle 4**):

Zyklus	Prozess	Temperatur	Zeit
1	Bindung der Primer	25°C	5 Minuten
2	Synthese durch die Reverse Transkriptase	46°C	20 Minuten
3	Inaktivierung der Reversen Transkriptase	95°C	1 Minute
4	Pause	4°C	∞

Tabelle 4: Ablauf der cDNA Synthese

Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative realtime polymerase chain reaction*, RTqPCR). Pro Ansatz wurden 0,5 µl Primer, 3,5 µl Wasser, 5 µl *iTaq Universal SYBR Green Supermix* und 1 µl Probe (100 bis 200 ng cDNA) in ein Well einer 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurde die Platte zentrifugiert und im *CFX ConnectTM Real-Time System* gemessen (**Tabelle 5**) und ausgewertet.

Schritt	Zyklusphase	Zyklen	Prozess	Zeit	Temperatur
1	Enzymaktivierung	1	Denaturierung	600 Sekunden	95°C
2	Amplifikation	40	Denaturierung	10 Sekunden	95°C
			Hybridisierung	20 Sekunden	59°C
			Polymerisation	10 Sekunden	72°C
3	Schmelzkurve	1	Denaturierung	60 Sekunden	95°C
			Hybridisierung	30 Sekunden	55°C

Tabelle 5: Reaktionsprotokoll der RTqPCR

Die Spezifität der amplifizierten Fragmente wurde mit Hilfe der Schmelzkurve untersucht, die von der Fragmentlänge abhängig ist und Auskunft über die Fragmentgrößen der amplifizierten Proben gibt. Zur Normalisierung wurden die Ct-Werte der Referenzgene und die Ct-Werte der entsprechenden Zielgene subtrahiert (**Formel 2**).

Formel 2: Formel zur Berechnung der Ct-Werte

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Referenzgen}} - Ct_{\text{Zielgen}}$$

Material und Methoden

Referenzgene sind Gene, die nicht durch äußere Einflüsse reguliert sind und in den Zellen konstant exprimiert werden. Für die Bestimmung der Genexpressionsmessung in PASCs und in den Lungenhomogenaten wurde β_2 Mikroglobulin (B2M) verwendet. Als Referenzgen für die Herzhomogenate diente Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase1 (HPRT1).

2.2.6 Proliferationsassay

Die Proliferationsrate von primär isolierten PASCs wurde mit dem Click-iT Edu Alexa Fluor 488 *Imaging Kit* nach Herstellerangaben analysiert.

Die PASCs von WT und TRPC3^{-/-} Mäusen wurden auf 24-Well Zellkulturplatte ausgesät und in hypoxischen Bedingungen (1% O₂) für 120 Stunden inkubiert. Die Zugabe von 1µl Edu (5'Ethynyl-2'-Desoxyuridin) /ml Medium erfolgte 24 Stunden vor Versuchsende, was zu einem Einbau der chemisch-modifizierten Uridin Base anstelle einer Thymidin-Base, während der Transkription führte [28].

Nach Versuchsende wurden die PASCs mit DPBS gewaschen, mit einer Aceton/Methanol Lösung (Verhältnis 1:1) fixiert und anschließend mit 3% BSA geblockt. Es folgten drei weitere Waschschrte mit 0,1% BSA und DPBS. Anschließend wurden die Zellen mit der Click-it Reaktionslösung nach Herstellerprotokoll inkubiert, wobei das eingebaute Edu mit einem Fluoreszenz-Molekül (Alexa Fluor 488) reagiert und bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden kann. Zusätzlich wurden alle Zellkerne mit Hoechst gefärbt, welches bei einer Wellenlänge 340 nm angeregt werden kann. Die proliferierenden, Alexa Fluor markierten Zellen sind durch einen grünen Zellkern erkennbar (**Abbildung 15**) während alle Zellen durch die Hoechst Färbung ein blaues Licht emittieren. Unter dem Mikroskop wurden die Zellkerne bei 488 nm und 340 nm fotografiert und gezählt. Das Verhältnis von Edu- zu Hoechst positiven Zellen wurde als Maß für DNA-Syntheserate berechnet.

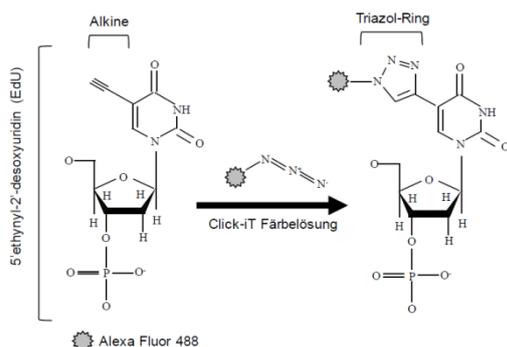


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Click-iT Reaktion bei der Edu Färbung

Das mit einem Alkin-modifizierte Uridin-Monophosphat reagiert im sauren Milieu mit dem Alexa Fluor 488 zu einem fluoreszierenden Triazol Ring [29, 103].

Material und Methoden

2.2.7 Westernblot

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *DC Protein Assay Kit*. Auf eine 96- Well Platte wurde ein Standard pipettiert (**Tabelle 6**)

Standard	Konzentration
Standard 1	0,128 µg/µl
Standard 2	0,258 µg/µl
Standard 3	0,515 µg/µl
Standard 4	1,028 µg/µl
Standard 5	2,056 µg/µl

Tabelle 6:Standard zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe

Anschließend wurden 5 µl Probe in Lysepuffer verdünnt (1:10) und aufgetragen. Es wurde 1 ml Reagenz A mit 20 µl Reagenz S gemischt und 25 µl der Lösung sowie 200 µl Reagenz B in jedes Well hinzugefügt. Anschließend wurde die Absorption am *Microplate Reader* gemessen. Anhand des Standards und der Absorptionswerte wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben berechnet.

Für das Auftrennen der Proben, wurden 12%ige Gele mit dem *TGX Stain-Free Fast Cast Acrylamide Kit* gegossen. Hierzu wurden pro Gel 3,5 ml *Fast Cast Resolver A*, 3,5 ml *Fast Cast Resolver B*, 35 µl 10%ige APS-Lösung und 3,5 µl Temed vermischt und zwischen zwei Glasplatten einer Gelkammer gegossen. Anschließend wurden 1 ml *Fast Cast Stacker A*, 1 ml *Fast Cast Stacker B*, 10 µl 10%ige APS-Lösung und 2 µl Temed gemischt und ebenfalls zwischen die Glasplatten gefüllt. Der Kamm wurde luftblasen-frei eingesetzt und nach Aushärten des Gels entfernt. Die Proben wurden mit Lysepuffer auf die gleiche Konzentration verdünnt und mit 4x NuPage LDS Puffer sowie β-Mercaptoethanol versetzt. Danach wurden die Proben für fünf bis zehn Minuten im Heizblock aufgekocht, kurz gekühlt, zentrifugiert und auf das Gel geladen. Zusätzlich wurde ein Marker geladen. Die Kammer wurde mit ausreichend Lämmli-Puffer aufgefüllt und die Elektrophorese (120 Volt, 400 mA, 150 Watt, 2 Stunden) gestartet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die *Stain-free* Gele durch Belichtung am *Molecular Imager* aktiviert.

Anschließend wurden die Banden auf eine PVDF-Membran in einem Semi-Dry Blot transferiert. Die Whatman-Filter wurden im Semi-dry Puffer befeuchtet und die PVDF-Membran in Methanol aktiviert. Es wurden drei Whatman-Filter auf das Semi-dry Gerät

Material und Methoden

gelegt. Es folgt die PVDF-Membran, das Gel und erneut drei Whatman-Filter. Mit einem Roller wurden die Luftblasen entfernt, die Semi-dry-Apparatur geschlossen und gestartet (100Volt, 115 mAmp, 150 Watt, 75 Minuten).

Die PVDF-Membran wurde für eine Stunde in 6%iger Milch auf dem Schüttler geblockt. Danach wurde der Antikörper dazu gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran fünf Mal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur im zweiten Antikörper inkubiert. Für die Entwicklung der Membran wurde 1 ml *Clarity Western ECL Substrat A* mit 1 ml *Clarity Western ECL Substrat B* vermischt, auf die Membran aufgetragen und das Signal mit Hilfe eines *Molecular Imager* am Computer detektiert. Die Membran wurde für eine Stunde in Stripping-Lösung gelegt. Es folgte eine Ladekontrolle mit β -Aktin.

2.3 Statistik

Die statistischen Analysen und das Erstellen der Graphen wurden mit der Software GraphPad Prism 6 und Sigma Plot 14 durchgeführt. Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche Tests angewendet. Bei der Analyse von zwei Stichproben wurde der Student's t-Test angewendet. Für den Vergleich der Stichproben mit einer Referenz wurde der Dunnett-Test verwendet. Der Vergleich mehrere Stichproben erfolgte mittels oneway Anova. Für die Analyse von zwei oder mehr Stichproben innerhalb mehrerer Gruppen wurde ein two-way Anova angewendet. Es wurde zwischen gepaarten und unabhängigen Proben unterschieden. Zur Analyse einer Punktmenge wurden Regressionsgeraden gebildet. Zur genaueren Charakterisierung dieser Gerade wurde ein Mittelwert aller Geraden für den jeweiligen Genotyp und die jeweilige Bedingung gebildet und diese Gerade anhand der Steigung und dem Schnittpunkt mit der y-Achse analysiert. Als statistisch signifikanter Unterschied wurden p-Werte von $p \leq 0,05$ definiert und mit * markiert. Die Anzahl der erhobenen Werte wurde mit „n“ gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Wie bereits von Dietrich et al. beschrieben[31], spielen TRPCs eine entscheidende Rolle in der Regulation der Calciumhämöostase und haben über die Regulation der intrazellulären Ionenhomöostase Einfluss auf das kardiovaskuläre System. Weissmann et al.[194] konnten nachweisen, dass in akuter Hypoxie TRPC6-defiziente Mäuse nicht mit einem Anstieg des PAP reagieren. Malczyk et al.[103] zeigten, dass TRPC1-defiziente Mäuse in der chronischen Hypoxie teilweise vor CHPH geschützt sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle von TRPC3 in akuter und chronischer Hypoxie zu identifizieren.

3.1 Akute und verlängerte Hypoxie in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen

In der ILU wurde die physiologische Reaktion (Vasokonstriktion) der Lunge von WT und TRPC3^{-/-} Mäusen auf akute und länger anhaltende Hypoxie untersucht (**Abbildung 16**).

Dargestellt ist die relative Druckänderung im Vergleich zum Ausgangswert in Normoxie (Δ PAP in mmHg). Da das Perfusatvolumen während der Exposition konstant gehalten wurde, sind Änderungen des PAP direkt proportional zu Änderung des pulmonalvaskulären Widerstands. Sowohl bei WT als auch bei TRPC3^{-/-} Lungen zeigte sich nach wenigen Minuten ein Anstieg des PAP. Es konnte kein Unterschied im maximalen Anstieg des PAP zwischen beiden Genotypen beobachtet werden. Nach der akuten Reaktion wurde ein Abfall des Drucks in der Pulmonalarterie gemessen. Der PAP stieg dann im Verlauf der anhaltenden Hypoxie kontinuierlich an.

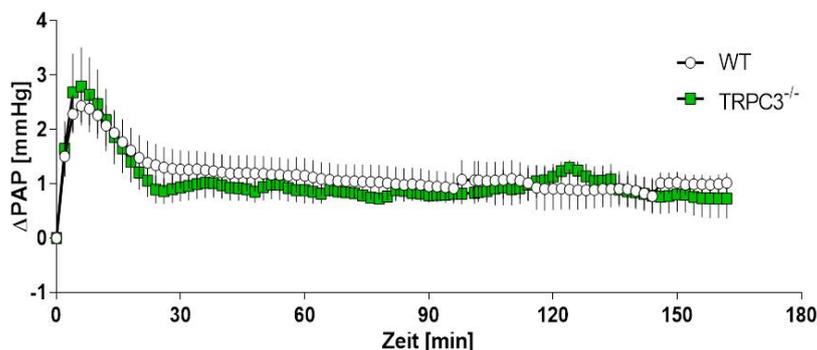


Abbildung 16: Akute und länger anhaltende Hypoxie in WT und TRPC3^{-/-} Lungen

Aufzeichnung der relativen Änderung des pulmonalarteriellen Drucks (*delta pulmonary arterial pressure*, Δ PAP) in der Pulmonalarterie zur Untersuchung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion in WT (n=8) und TRPC3^{-/-} (n=5) Lungen. Die Mauslungen wurden für maximal 180 Minuten mit hypoxischen Gas (Hox, 1% O₂) ventiliert und der Δ PAP gemessen. Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05).

Ergebnisse

3.2 Genexpressionsanalyse muriner PSMCs in anhaltender Hypoxie

Um die Genregulation von TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 in anhaltender Hypoxie zu untersuchen, wurden murine PSMC aus WT und TRPC3^{-/-} Mäusen isoliert und nach 30 Minuten, 1 Stunde und 3 Stunden Hypoxie-Exposition in Passage1 untersucht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden an dieser Stelle nur die für diese Arbeit relevanten Daten dargestellt. Alle weiteren Ergebnisse können dem Anhang entnommen werden (**Abbildung 38, Abbildung 39, Abbildung 40**).

In der anhaltenden Hypoxie zeigte sich keine Veränderung der TRPC1 Expression im WT. Beim Fehlen von TRPC3 war TRPC1 in allen untersuchten Zeitpunkten durch Hypoxie hochreguliert (**Abbildung 17 A**). Insgesamt nehmen sowohl Hypoxie, als auch der Genotyp Einfluss auf die TRPC1 Expression. Nach 3 Stunden Hypoxie konnte bei beiden Genotypen in den PSMC isoliert aus männlichen Mäusen eine höhere TRPC1 Expression beobachtet werden, als in murinen PSMC aus weiblichen Mäusen. In den TRPC3^{-/-} Männchen kam es verglichen zur Normoxie nach 3 Stunden Hypoxie zu einem signifikanten Anstieg der TRPC1 Expression (**Abbildung 17 B und C**).

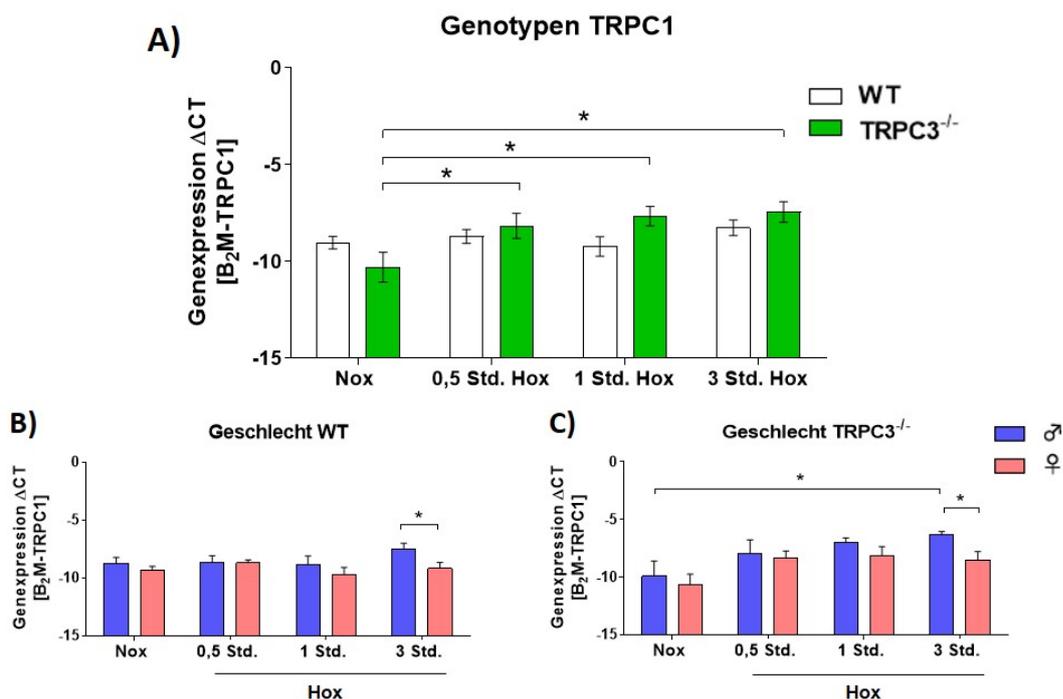


Abbildung 17: Genexpression von TRPC1 in murinen WT und TRPC3^{-/-} PSMCs unter anhaltender Hypoxie
Relative TRPC1 Genexpression in PSMCs (Passage1) isoliert aus WT und TRPC3^{-/-} Mäusen mittels RTqPCR. Inkubation der PSMCs unter Normoxie (21% O₂) oder in anhaltender (0,5 Std., 1 Std., 3 Std.) Hypoxie (1% O₂). A) Vergleich von WT (Nox: n=18; Hox: n=17-18) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=13; Hox: n=9-10) Mäusen. B) Vergleich der Männchen (n=10) und Weibchen (n=7-8) im WT C) Vergleich der Männchen (n=3-5) und Weibchen (n=3-4) im TRPC3^{-/-}. Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

TRPC3 wurde im WT unter anhaltender Hypoxie nicht reguliert und zeigte keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (Abbildung 18).

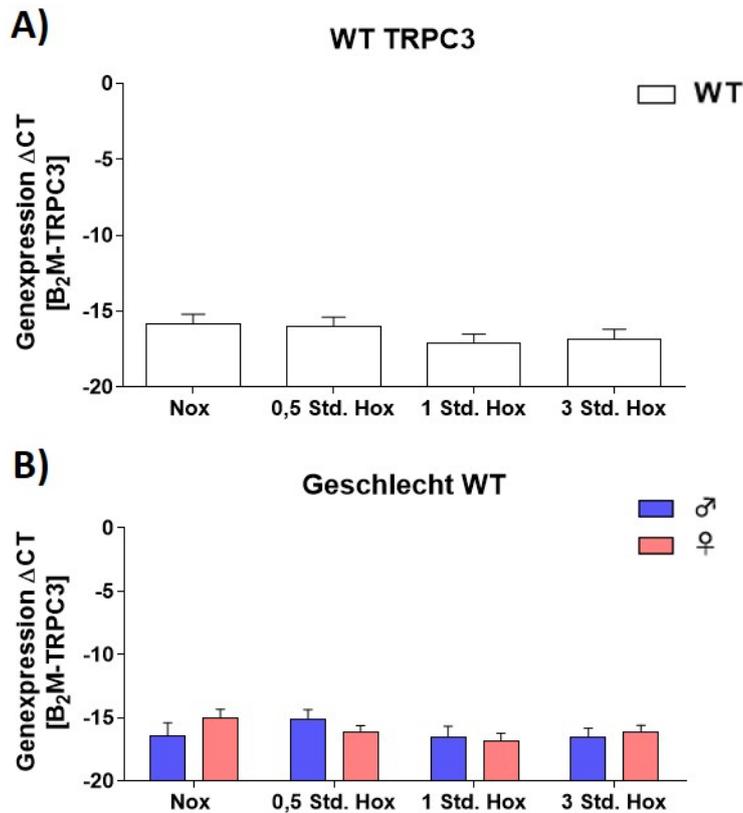


Abbildung 18: Genexpression von TRPC3 in murinen WT PASCs unter anhaltender Hypoxie

Relative TRPC3 Genexpression in PASCs (Passage1) isoliert aus WT Mäusen mittels RTqPCR. Inkubation der PASCs unter Normoxie (21% O₂) oder in anhaltender (0,5 Std., 1 Std., 3 Std.) Hypoxie (1% O₂). A) WT (Nox: n=18; Hox: n=15-18) Mäuse in anhaltender Hypoxie. B) Vergleich der Männchen (n=8-9) und Weibchen (n=7-8) im WT. Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

Die Expression von TRPC5 in WT PSMCs war unter hypoxischen Bedingungen nach 30 Minuten und 1 Stunde runterreguliert. In TRPC3^{-/-} PSMCs war keine Regulation zu beobachten, wobei TRPC5 im Vergleich zum WT insgesamt höher exprimiert wurde (Abbildung 19 A). Es zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede für die Regulation von TRPC5 (Abbildung 19 B und C).

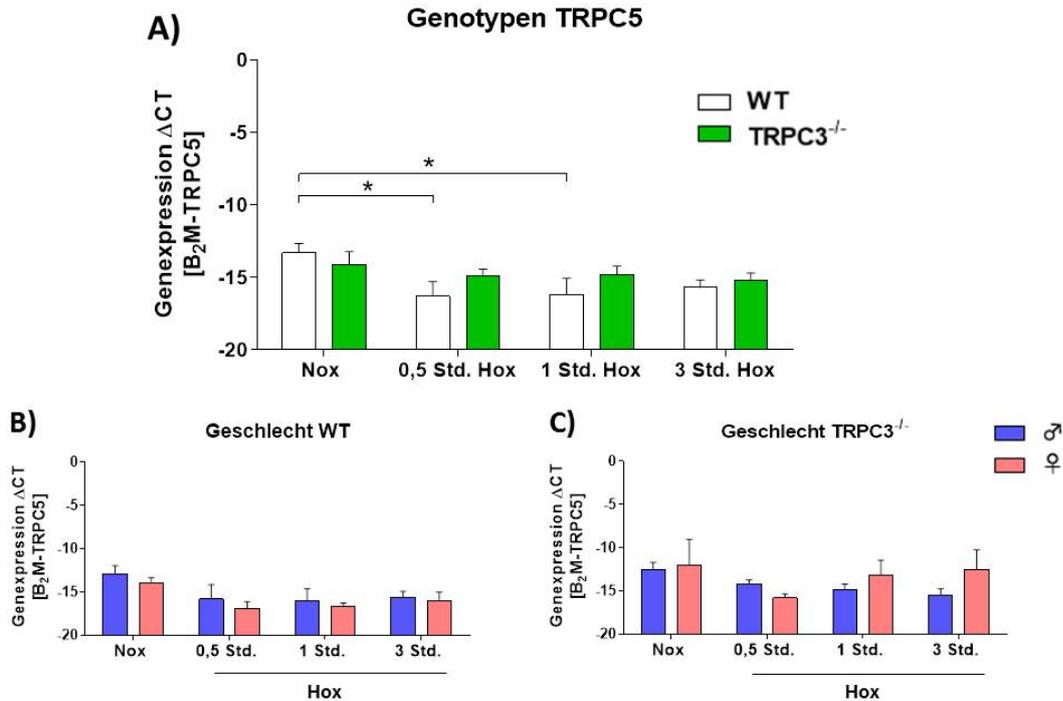


Abbildung 19: Genexpression von TRPC5 in murinen WT und TRPC3^{-/-} PSMCs unter anhaltender Hypoxie
 Relative TRPC5 Genexpression in PSMCs (Passage1) isoliert aus WT und TRPC3^{-/-} Mäusen mittels RTqPCR. Inkubation der PSMCs unter Normoxie (21% O₂) oder in anhaltender (0,5 Std., 1 Std., 3 Std.) Hypoxie (1% O₂). A) Vergleich von WT (Nox: n=14; Hox: n=10-12) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=9; Hox: n=6-7) Mäusen. B) Vergleich der Männchen (n=7-9) und Weibchen (n=2-5) im WT C) Vergleich der Männchen (n=5-7) und Weibchen (n=2-4) im TRPC3^{-/-}. Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

3.3 Hämodynamische Messung nach chronischer Hypoxie-Exposition

Um die Relevanz von TRPC3 in chronischer Hypoxie zu untersuchen, wurden WT und TRPC3^{-/-} Mäuse für drei Wochen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Anschließend wurden die Mäuse hämodynamisch untersucht und verschiedene Parameter bestimmt. Zur Detektion geschlechtsspezifischer Unterschiede wurden Vergleiche zwischen Männchen und Weibchen unter Normoxie beziehungsweise Hypoxie aufgeführt. Auf eine geschlechtsspezifische Darstellung des Vergleichs zwischen Normoxie und Hypoxie wurde verzichtet, da sich lediglich beim RVSP ein statistisch relevanter Unterschied gezeigt hat.

Es zeigte sich kein Einfluss von chronischer Hypoxie auf den SAP in beiden Genotypen (**Abbildung 20 A**). Unter Normoxie war der SAP bei WT Weibchen und bei TRPC3^{-/-} Männchen signifikant höher als in WT Männchen. Unter Hypoxie wurden keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern beobachtet (**Abbildung 20 B und C**).

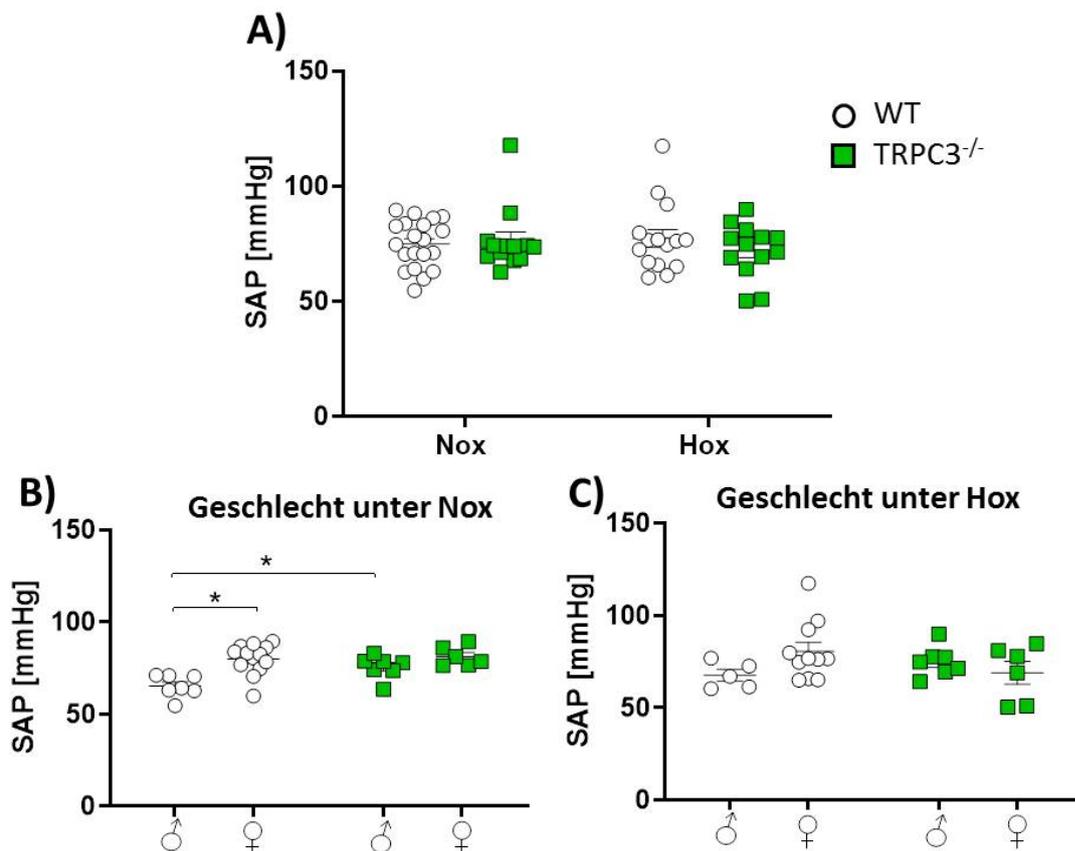


Abbildung 20: Einfluss von TRPC3 den SAP

Messung des systemarteriellen Drucks (*systemic arterial pressure*, SAP) nach 3-wöchiger Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 10% O₂) in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen. A) Vergleich des SAP gemessen in WT (Nox: n=20; Hox: n=15) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=13; Hox: n=13) Mäusen nach Nox oder Hox B) Vergleich der Geschlechter nach Nox (n=6-13) oder C) Hox (n=5-11). Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

Zur Bestimmung der Ausprägung der PH wurde der RVSP ermittelt. Unter Normoxie zeigten die WT Mäuse im Vergleich zu den TRPC3^{-/-} Mäusen einen signifikant höheren RVSP. Nach 3-wöchiger Hypoxie-Exposition konnte sowohl im WT als auch im TRPC3^{-/-} Mäusen ein signifikanter Anstieg des RVSP beobachtet werden. Der in den TRPC3^{-/-} Mäusen gemessene RVSP war verglichen mit dem der WT Mäusen nach 3-wöchiger Hypoxie signifikant niedriger (**Abbildung 21 A**).

Bei der Auswertung der Geschlechter zeigten die TRPC3^{-/-} Männchen in Normoxie einen geringeren RVSP als die WT Männchen. Unter Hypoxie wurde ein signifikant niedrigerer RVSP in TRPC3^{-/-} Weibchen im Vergleich zu WT Weibchen beobachtet, während kein Unterschied bei den Männchen festzustellen war (**Abbildung 21 B und C**). Beim Vergleich der Geschlechter zwischen Normoxie und Hypoxie konnte ein Anstieg des RVSP bei WT Männchen und WT Weibchen, sowie TRPC3^{-/-} Männchen beobachtet werden. Die TRPC3^{-/-} Weibchen zeigten keinen Anstieg im RVSP.

Ergebnisse

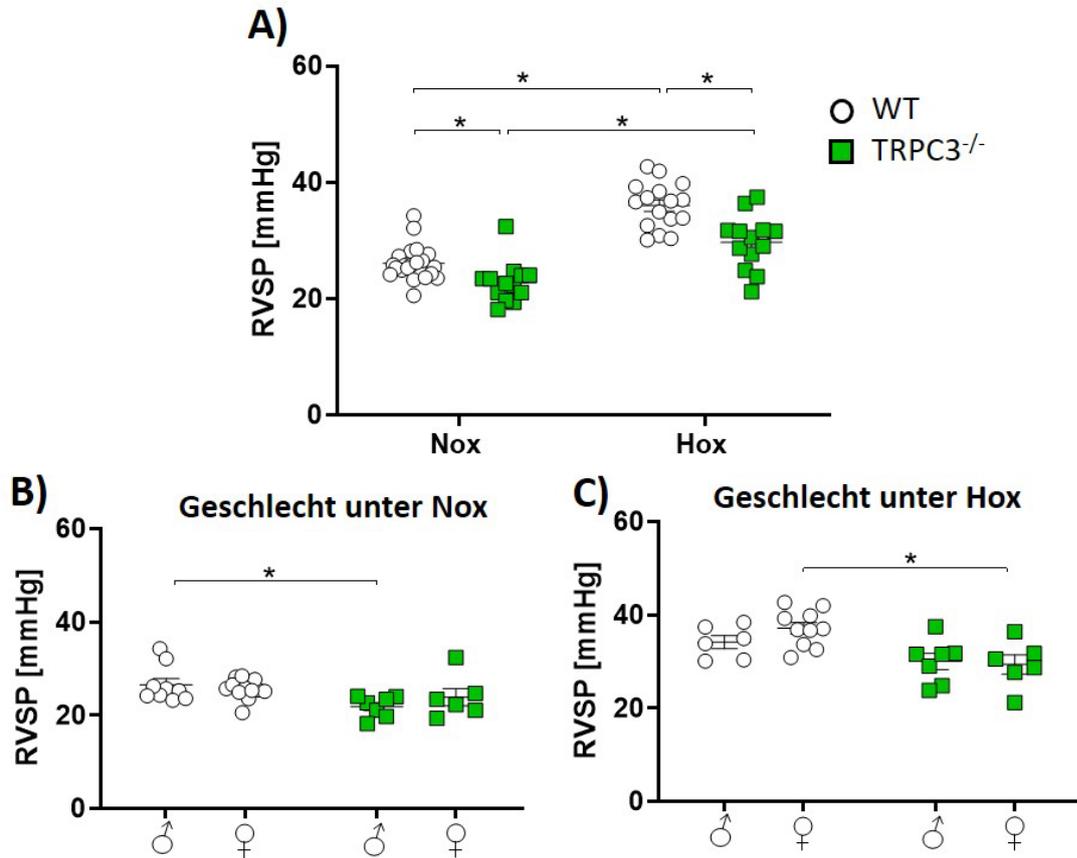


Abbildung 21: Einfluss von TRPC3 auf den RVSP

Messung des rechtsventrikulären systolischen Drucks (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) nach 3-wöchiger Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 10% O₂) in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen. A) Vergleich des RVSP gemessen in WT (Nox: n=22; Hox: n=16) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=13; Hox: n=13) Mäusen nach Nox oder Hox. B) Vergleich der Geschlechter nach Nox (n=6-13) oder C) Hox (n=6-10). Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

Die Bestimmung der Hämatokrit-Werte nach 3-wöchiger Hypoxie zeigte sowohl in WT als auch in TRPC3^{-/-} Mäusen einen signifikanten Anstieg. Es wurden weder unter Normoxie noch unter Hypoxie Unterschiede zwischen den Genotypen beobachtet (Abbildung 22 A).

Unter Normoxie konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt werden. Unter Hypoxie zeigten die Weibchen signifikant niedrigere Hämatokrit-Werte als die Männchen (Abbildung 22 B und C).

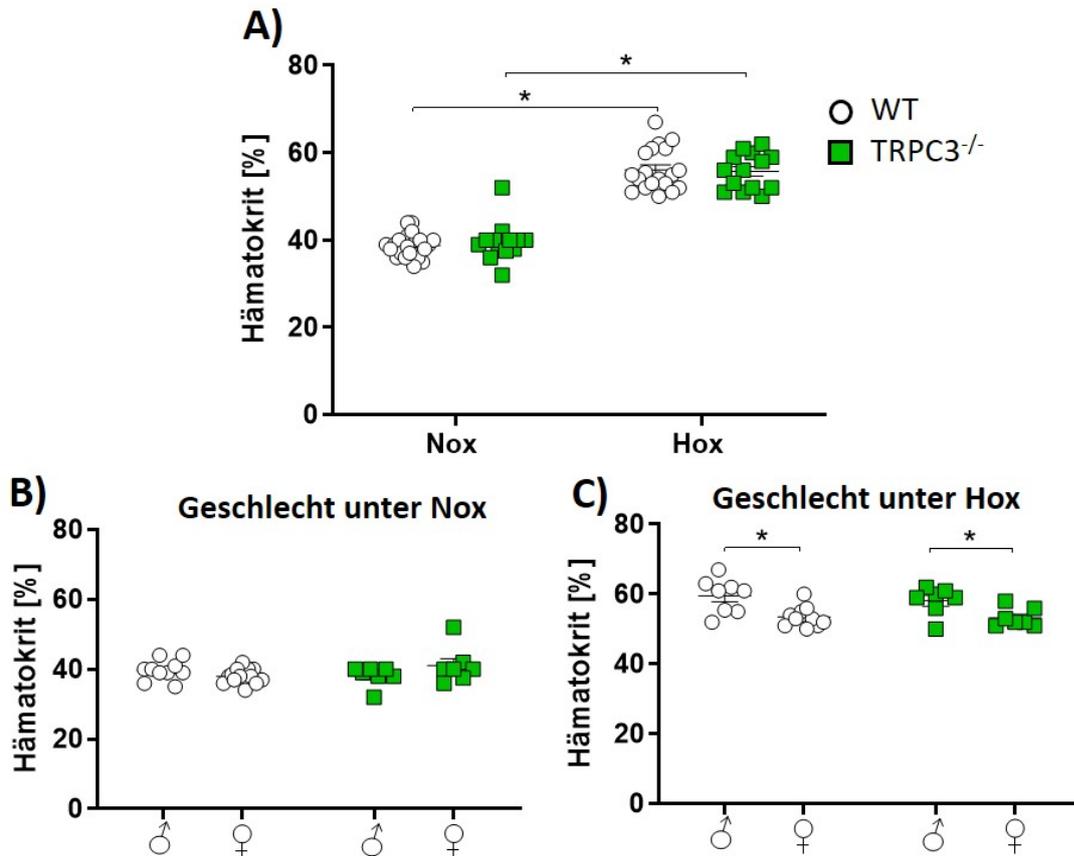


Abbildung 22: Einfluss von TRPC3 auf den Hämatokrit-Wert

Bestimmung des Hämatokrit-Wertes im Blut nach 3-wöchiger Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 10% O₂) in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen. A) Vergleich des Hämatokrits gemessen in WT (Nox: n=23; Hox: n=19) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=14; Hox: n=14) Mäusen nach Nox oder Hox. B) Vergleich der Geschlechter nach Nox (n=7-13) oder C) Hox (n=7-11). Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05). ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

3.4 Bestimmung der Herzhypertrophie nach Hypoxie-Exposition

Mit Hilfe des Fulton-Index wurde die RHH untersucht. In WT und TRPC3^{-/-} Mäusen wurde unter chronischer Hypoxie eine signifikante Vergrößerung des rechten Ventrikels beobachtet. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Abbildung 23). Unter Hypoxie zeigten die WT Männchen eine geringere RHH als die WT Weibchen, wohingegen bei den TRPC3^{-/-} Mäusen keine Unterschiede nachgewiesen wurden (Abbildung 23 C).

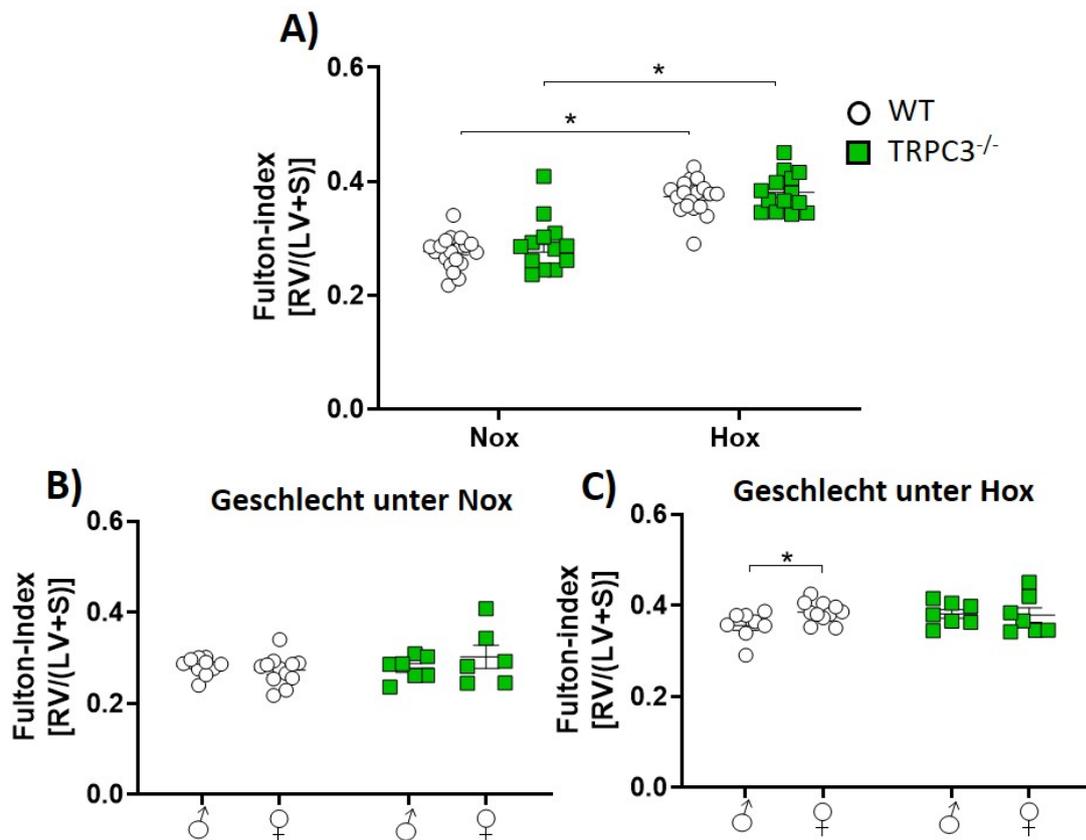


Abbildung 23: Einfluss von TRPC3 die Hypoxie-assozierte Rechtsherzhypertrophie

Bestimmung der RHH mittels Fulton-Index nach 3-wöchiger Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 10% O₂) in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen. A) Vergleich der RHH gemessen in WT (Nox: n=22; Hox: n=19) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=13; Hox: n=14). Mäusen nach Nox oder Hox. B) Vergleich der Geschlechter nach Nox (n=6-12) oder C) Hox (n=7-11). Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). LV: linker Ventrikel; RV: rechter Ventrikel; S:Septum; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

Die Analyse des Gewichts des rechten Ventrikels im Verhältnis zur Länge der Tibia gilt als Maß für die Veränderungen des rechten Herzens im Verhältnis zur Körpergröße. Es konnte ein signifikanter Anstieg der Masse des rechten Ventrikels nach 3 Wochen Hypoxie bei WT und TRPC3^{-/-} Mäusen beobachtet werden (**Abbildung 24 A**). Der Vergleich der Geschlechter zeigte, dass die Weibchen in beiden Genotypen unter Normoxie und Hypoxie eine signifikant verringerte Größe des rechten Ventrikels verglichen zur Tibialänge aufwiesen (**Abbildung 24 B und C**). Zusätzlich konnte ein signifikanter Unterschied zwischen WT Männchen und TRPC3^{-/-} Männchen in Normoxie nachgewiesen werden (**Abbildung 24 B**).

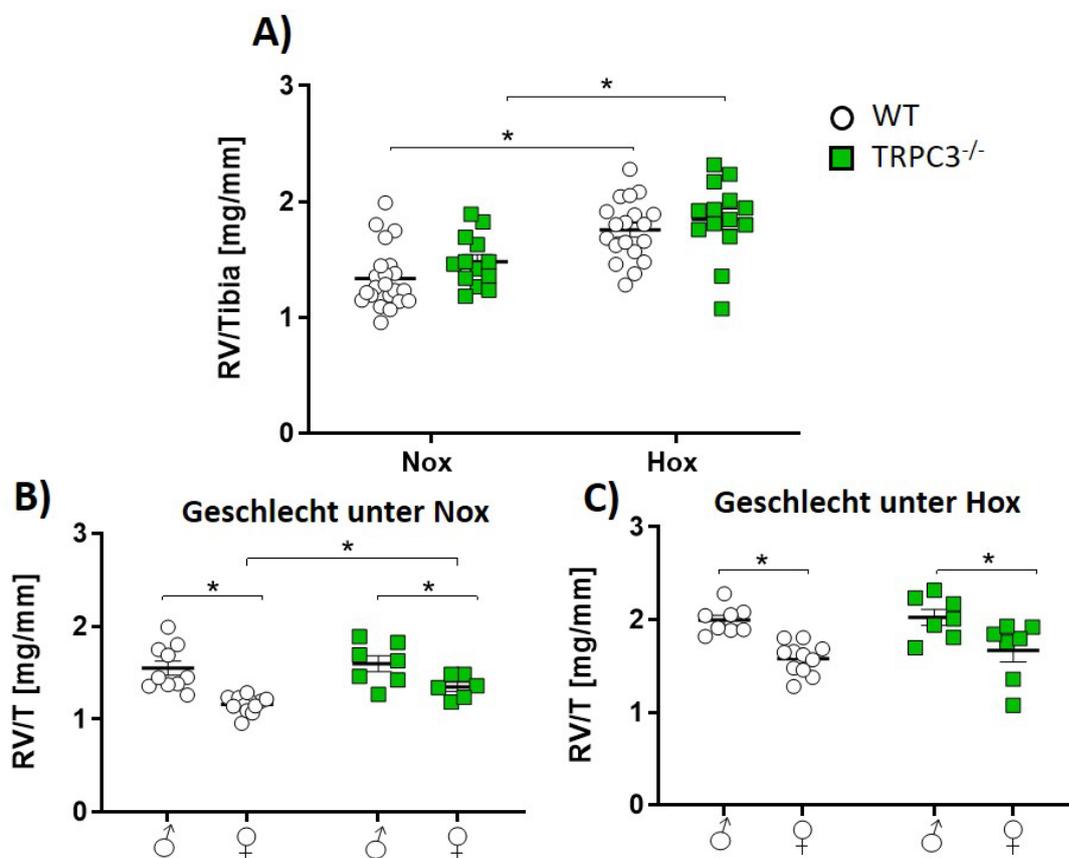


Abbildung 24: Einfluss von TRPC3 auf das Gewicht des rechten Ventrikels im Verhältnis zur Länge der Tibia
Bestimmung des Gewichts des rechten Ventrikels im Verhältnis zur Länge der Tibia nach 3-wöchiger Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 10% O₂) in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen. A) Vergleich von RV/T gemessen in WT (Nox: n=22; Hox: n=19) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=13; Hox: n=14) Mäusen nach Nox oder Hox. B) Vergleich der Geschlechter nach Nox (n=6-12) oder C) Hox (n=7-11). Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). RV: rechter Ventrikel; T: Tibia; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

Die Analyse der Veränderung des Gewichts des linken Ventrikels inklusive Septum im Verhältnis zur Länge der Tibia gilt als Maß für eine Vergrößerung des linken Ventrikels im Verhältnis zur Körpergröße. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und TRPC3^{-/-} Mäusen unter Normoxie oder Hypoxie festgestellt werden (Abbildung 25 A). Die Weibchen zeigten unter Normoxie und Hypoxie bei beiden Genotypen eine geringere Masse des linken Herzen verglichen zu den Männchen. Zusätzlich konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den WT und TRPC3^{-/-} Männchen unter Hypoxie nachgewiesen werden (Abbildung 25 B und C).

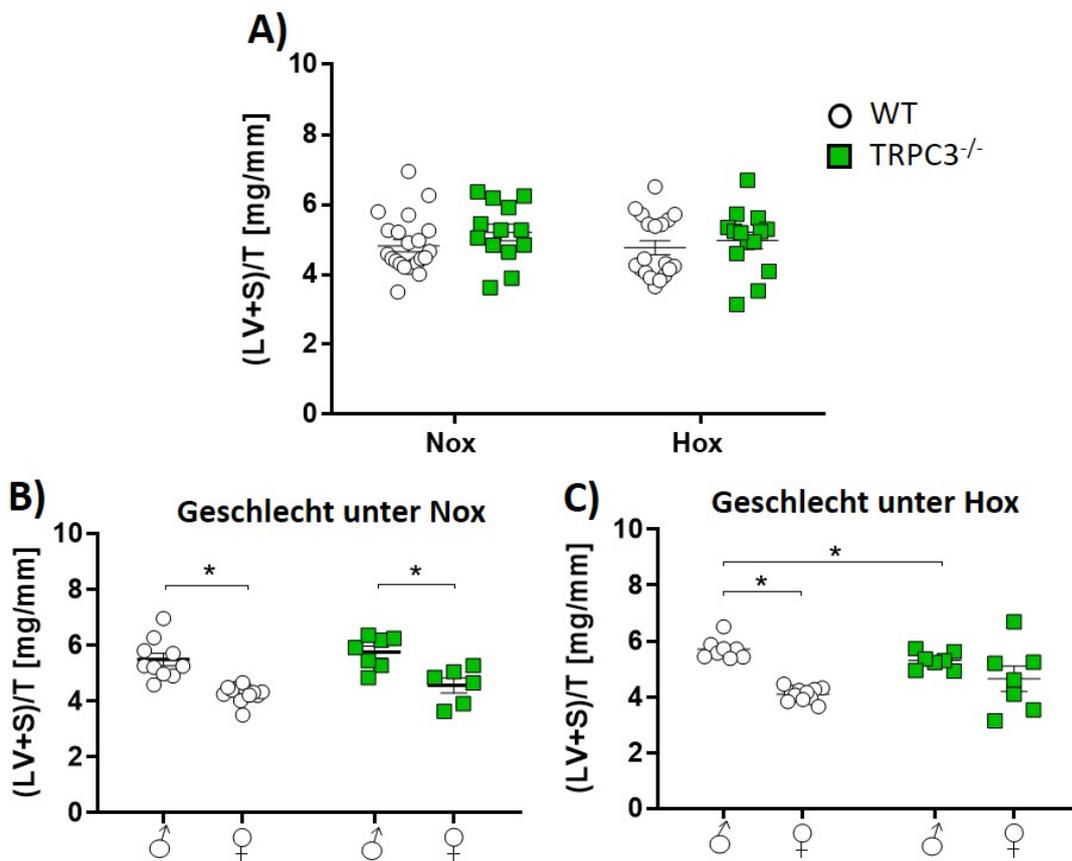


Abbildung 25: Einfluss von TRPC3 auf das Gewicht des linken Ventrikels inklusive Septum im Verhältnis zur Länge der Tibia

Bestimmung des Gewichts des linken Ventrikels inklusive Septum im Verhältnis zur Länge der Tibia nach 3-wöchiger Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 10% O₂) in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen. A) Vergleich von (LV+S)/T gemessen in WT (Nox: n=22; Hox: n=19) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=13; Hox: n=14) Mäusen nach Nox oder Hox. B) Vergleich der Geschlechter nach Nox (n=6-12) oder C) Hox (n=7-11). Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). LV: linker Ventrikel; S: Septum; T: Tibia; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

3.5 Genexpressionsanalyse von Lungen und Herzgewebe nach chronischer Hypoxie-Exposition in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen

Zur Untersuchung möglicher pathophysiologischer und kompensatorischer Prozesse in der CHPH wurde die Expression von TRPC1, -3 und -6 in Lungenhomogenaten von WT und TRPC3^{-/-} Mäusen nach 3-wöchiger Hypoxie analysiert (Abbildung 26).

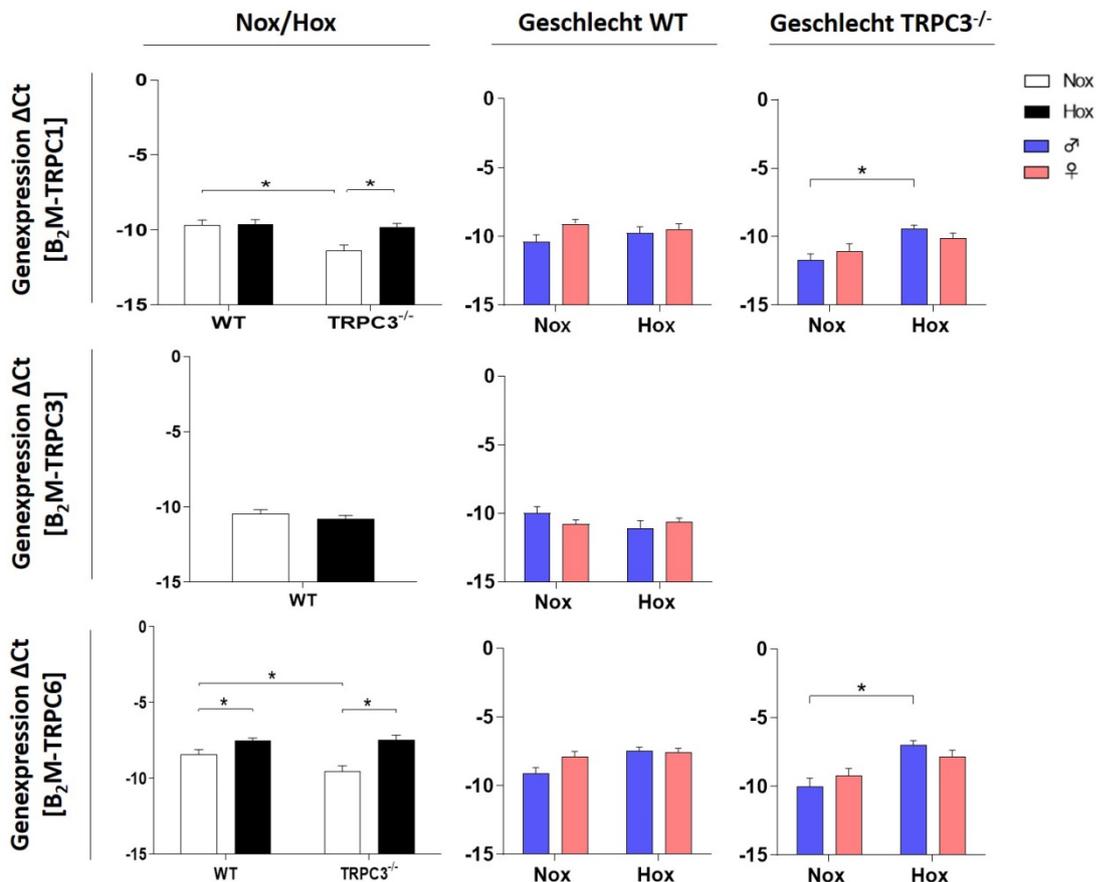


Abbildung 26: Genexpression von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 in Lungenhomogenaten nach 3-wöchiger Hypoxie

Genexpressionsanalyse von A) TRPC1 B) TRPC3 und C) TRPC6 mittels RTqPCR in Lungenhomogenaten nach 3-wöchiger Normoxie (21% O₂) oder Hypoxie (10% O₂). Vergleich von WT (Nox: n=14; Hox: n=13) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=7; Hox: n=7) Mäusen und jeweils der Männchen (n=3-6) und Weibchen (n=4-8). Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Der Verlust von TRPC3 führte unter Normoxie zu einer signifikant geringeren Expression von TRPC1 verglichen zum WT und zur Hypoxie. Beim Geschlechtervergleich der TRPC3^{-/-} Mäuse konnte eine Hochregulation von TRPC1 unter Hypoxie in den Männchen gezeigt werden. Eine ähnliche Reaktion auf Hypoxie wies das TRPC6 Gen auf, welches in WT und TRPC3^{-/-} Lungen unter Normoxie geringer exprimiert war und unter Hypoxie hochreguliert wurde. Auch TRPC6 wurde in den Lungenhomogenaten der TRPC3^{-/-} Männchen unter Hypoxie hochreguliert.

Ergebnisse

Zur Untersuchung möglicher Regulationsmechanismen und Umbauprozesse des Herzens in CHPH wurden die Expression von TRPC1, -3 und -6 in Herzhomogenaten von WT und TRPC3^{-/-} Mäusen mittels RTqPCR quantifiziert. Dabei wurden der rechte Ventrikel und der linke Ventrikel separat untersucht. Bei der Analyse der mRNA-Expression von TRPC1, -3 und -6 im rechten und linken Ventrikel konnten keine Hypoxie-induzierten Expressionsänderungen von TRPC1, -3 und -6 in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen beobachtet werden (**Abbildung 27**). Auf eine geschlechterspezifische Darstellung wurde verzichtet, da sich hier keine relevanten Unterschiede feststellen ließen.

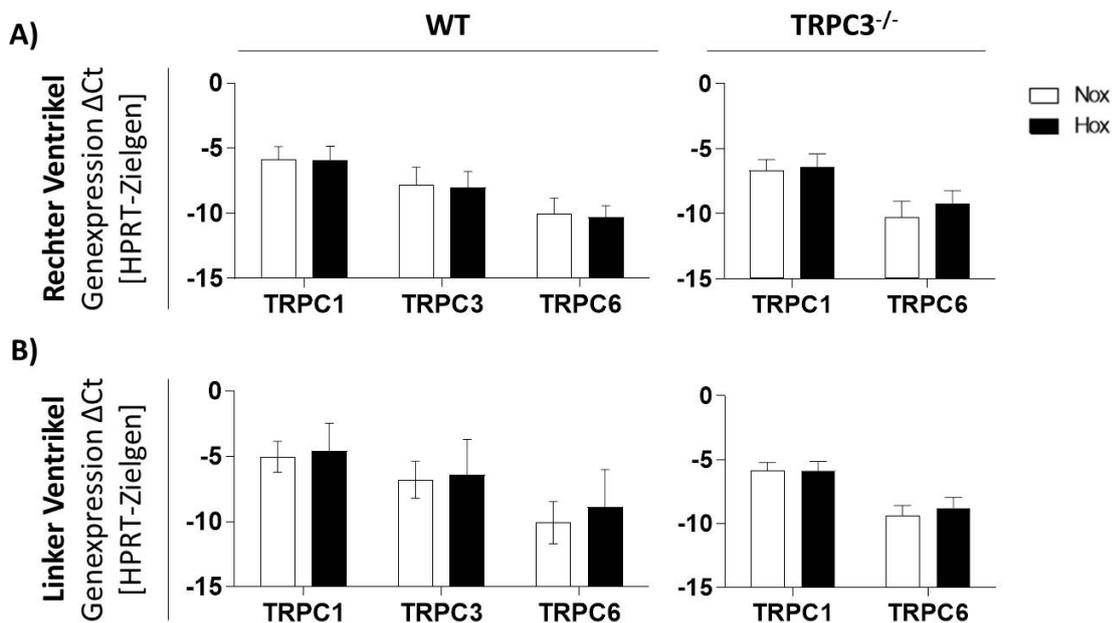


Abbildung 27: Genexpression von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 in Herzhomogenaten nach 3-wöchiger Hypoxie

Genexpressionsanalyse von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 mittels RTqPCR in Herzhomogenaten nach 3-wöchiger Normoxie (21% O₂) oder Hypoxie (10% O₂)-Exposition von WT (Nox: n=14; Hox: n=13) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=7; Hox: n=7) Mäusen. A) Genexpression im rechten Ventrikel B) Genexpression im linken Ventrikel. Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05). Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

3.6 Histologische Untersuchung der Gefäßmuskularisierung nach chronischer Hypoxie-Exposition

Zur Untersuchung der Muskularisierung wurden sowohl die Größe, als auch der prozentuale Anteil an anti- α -SMA gefärbten Bereichen der Gefäße (Muskularisierungsgrad) nach 3-wöchiger Hypoxie-Exposition analysiert.

Jeder Punkt im Graph steht für ein Gefäß der Größe 15 μ m bis 100 μ m und dem zugehörigen Muskularisierungsgrad. Anhand der Verteilung der Punkte konnte für jede Maus eine Regression berechnet werden (**Abbildung 28**). Mit Hilfe der Steigung und

Ergebnisse

des Schnittpunktes mit der y-Achse für die jeweiligen Regressionsgeraden wurde die Muskularisierung verglichen (Abbildung 28).

Die Regressionsgeraden waren in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen unter Hypoxie nach oben verschoben, was auf eine Zunahme der Muskularisierung der Gefäße in chronischer Hypoxie hindeutet (Abbildung 28 A).

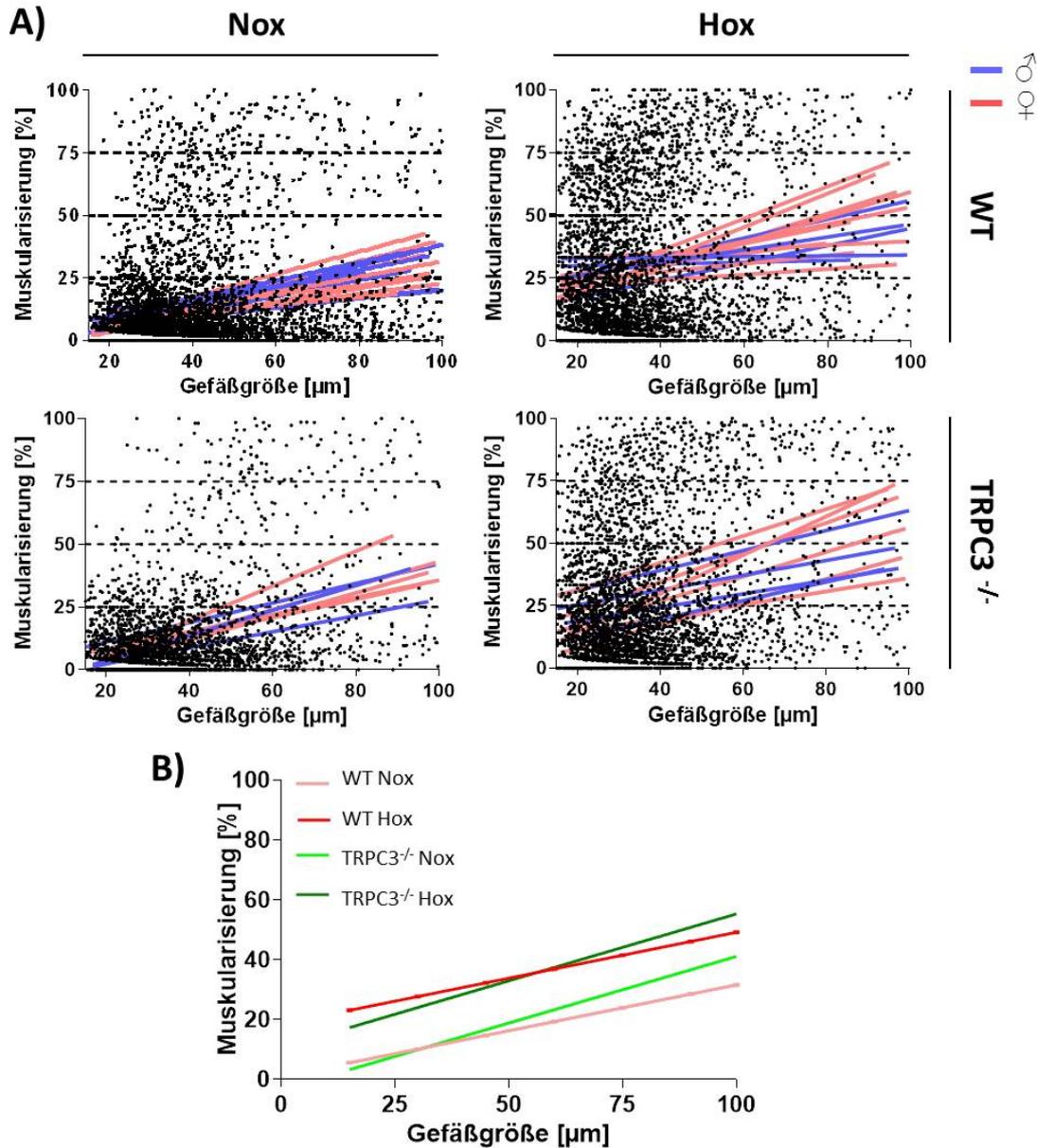


Abbildung 28: Histologische Untersuchung der Gefäßmuskularisierung mittels Regressionsgeraden

Muskularisierungsgrad der Gefäße mit einem externen Durchmesser von 15µm bis 100µm nach 3-wöchiger Normoxie (21% O₂) oder Hypoxie (10% O₂). A) Verteilung aller gemessenen Gefäße (schwarze Punkte) und Bestimmung der Regressionsgeraden für die Einzeltiere von WT Mäusen unter Normoxie (n=18) oder Hypoxie (n=15) sowie TRPC3^{-/-} Mäusen unter Normoxie (n=8) oder Hypoxie (n=10). B) Übersicht der Regressionsgeraden im Mittel. ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

Die Steigung der Regressionsgeraden war bei den WT Mäusen unter Normoxie signifikant geringer als bei den TRPC3^{-/-} Mäusen. Unter Hypoxie ließen sich, bei starker Streuung der Werte, keine Unterschiede feststellen. Insgesamt ließ sich allerdings aber ein Effekt des Genotyps nachweisen. Die TRPC3^{-/-} Mäusen zeigten gegenüber den WT Mäusen eine steilere Steigung (**Abbildung 29 A**).

Die Analyse der Regressionsgeraden zeigte bei WT und TRPC3^{-/-} Mäusen unter Hypoxie einen signifikant höheren Schnittpunkt mit der y-Achse. Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie konnte ein niedrigerer Schnittpunkt mit der y-Achse bei den TRPC3^{-/-} Mäusen festgestellt werden (**Abbildung 29 B**).

Bei der Analyse von Gefäßen <15µm zeigte sich eine geringere Muskularisierung bei den TRPC3^{-/-} Mäusen unter Hypoxie und Normoxie. Insgesamt kam es bei beiden Genotypen zu einer Hypoxie-bedingten Zunahme der Muskularisierung der Gefäße <15µm (**Abbildung 29 C**). Eine Unterscheidung zwischen Männchen und Weibchen wurde nicht vorgenommen. Durch die geringe Gruppengröße und die hohe Streuung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Streuung der Werte war nicht auf geschlechtsspezifische Unterschiede zurückzuführen.

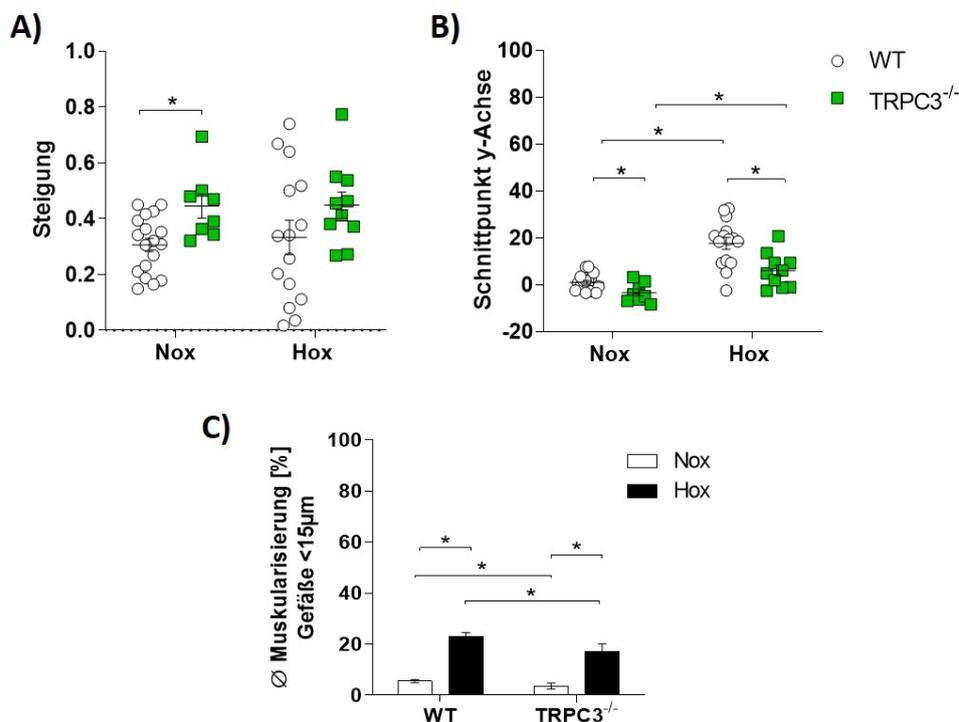


Abbildung 29: Analyse Gefäßmuskularisierung nach 3-wöchiger Hypoxie

Analyse der Regressionsgeraden für pulmonale Gefäße mit einem externen Durchmesser von 15µm bis 100µm in WT (Nox: n=18; Hox: n=15) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=8; Hox: n=10) Mäusen nach histologischer Färbung mit von Willebrand-Faktor und anti-α-SMA. A) Steigung der Regressionsgeraden und B) Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse. C) Berechnung der durchschnittlichen Muskularisierung für Gefäße mit der Größe <15µm in WT und TRPC3^{-/-} Mäusen. Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

3.7 Genexpressionsanalyse muriner PSMCs in chronischer Hypoxie

Wie auch für die anhaltende Hypoxie, wurde für die chronische Hypoxie die Genexpression von TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 unter hypoxischen Bedingungen analysiert. Es wurden murine PSMC aus WT und TRPC3^{-/-} Mäusen isoliert und nach 24, 72 und 120 Stunden Hypoxie-Exposition in Passage 1 untersucht.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur die, für diese Arbeit relevanten Daten, dargestellt. Alle weiteren Ergebnisse können dem Anhang entnommen werden (**Abbildung 38, Abbildung 39, Abbildung 40**).

In der chronischen Hypoxie war TRPC1 in WT PSMCs nach 72 und 120 Stunden Hypoxie hochreguliert (**Abbildung 30 A**). Beim *Knockout* zeigte sich eine Hochregulation nach 24 Stunden Hypoxie, wobei die TRPC3^{-/-} Männchen TRPC1 stärker exprimierten als die Weibchen (**Abbildung 30 C**).

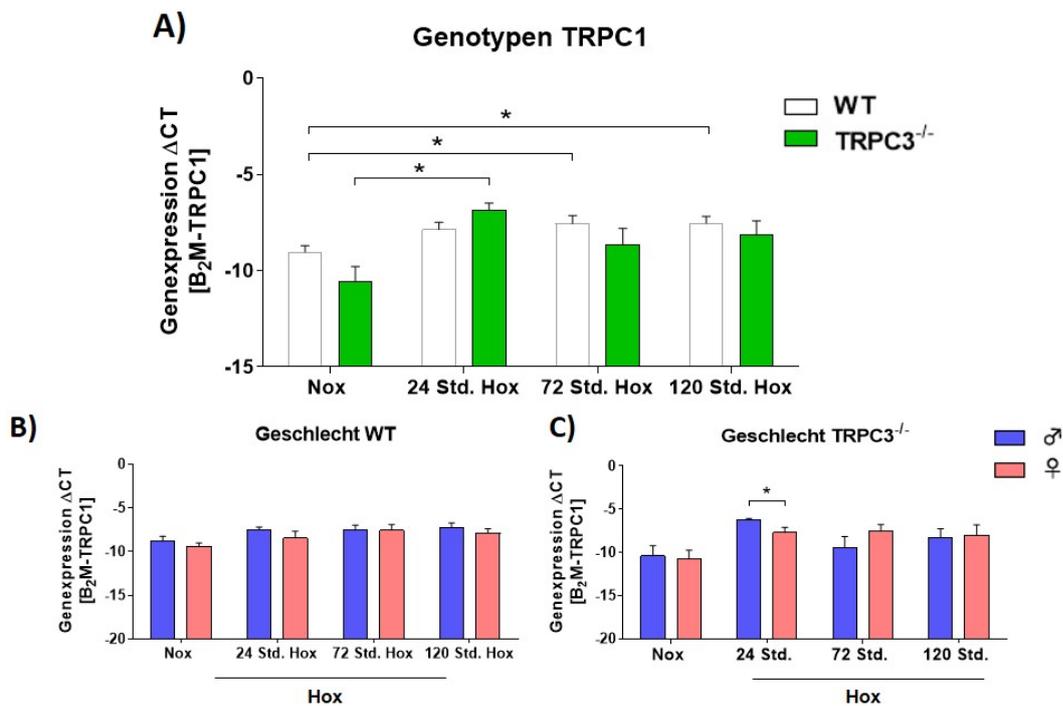


Abbildung 30: Genexpression von TRPC1 in murinen WT und TRPC3^{-/-} PSMCs unter chronischer Hypoxie
 Relative TRPC1 Genexpression in PSMCs (Passage1) isoliert aus WT und TRPC3^{-/-} Mäusen mittels RTqPCR. Inkubation der PSMCs unter Normoxie (21% O₂) oder in chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂). A) Vergleich von WT (Nox: n=18; Hox: n=16-17) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=10; Hox: n=7-10) Mäusen. B) Vergleich der Männchen (n=9-10) und Weibchen (n=6-8) im WT C) Vergleich der Männchen (n=4-6) und Weibchen (n=3-4) im TRPC3^{-/-}. Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

In chronischer Hypoxie konnte keine Regulation von TRPC3 in WT PASCs oder geschlechtsbedingte Unterschiede festgestellt werden (**Abbildung 31**).

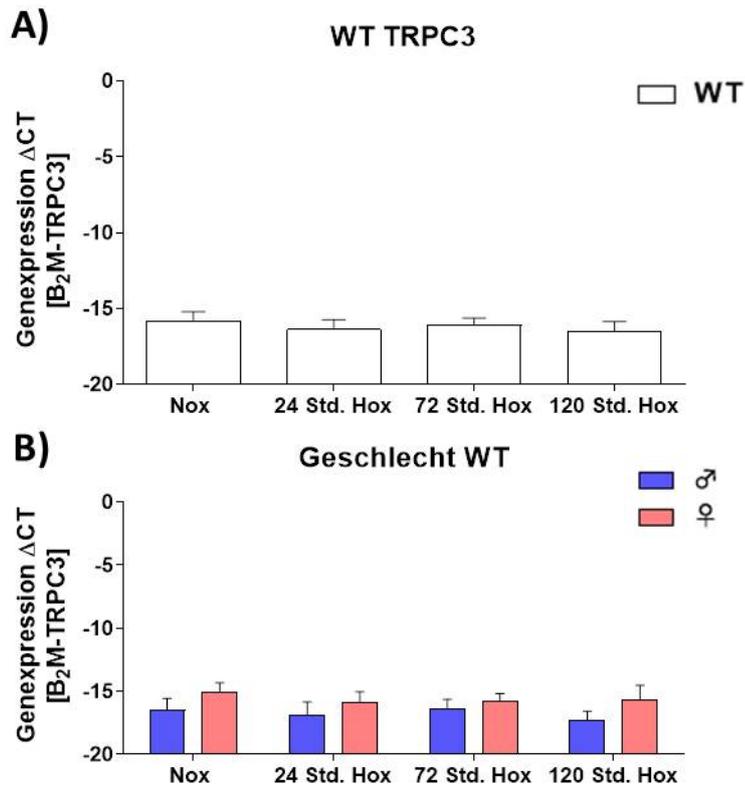


Abbildung 31: Genexpression von TRPC3 in murinen WT PASCs unter chronischer Hypoxie

Relative TRPC3 Genexpression in PASCs (Passage1) isoliert aus WT Mäusen mittels RTqPCR. Inkubation der PASCs unter Normoxie (21% O₂) oder in chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂). A) WT (Nox: n=18; Hox: n=15-17) in anhaltender Hypoxie. B) Vergleich der Männchen (n=9) und Weibchen (n=7-8) im WT. Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

Unter chronischer Hypoxie kam es zu einem Anstieg der TRPC4 Expression in WT PASCs nach 24 Stunden Hypoxie. Nach 120 Stunden Hypoxie fiel die TRPC4 Expression bei WT und TRPC3^{-/-} PASCs in etwa auf den Ausgangswert der Normoxie zurück.

Der Geschlechtervergleich zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 32 B und C).

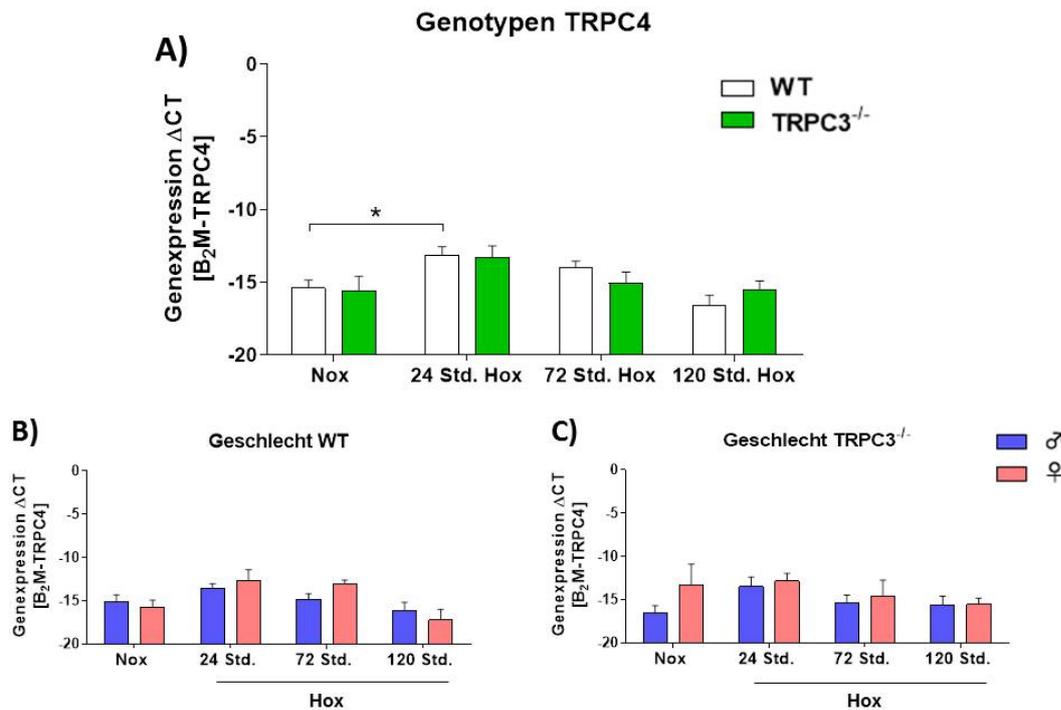


Abbildung 32: Genexpression von TRPC4 in murinen WT und TRPC3^{-/-} PASCs unter chronischer Hypoxie
 Relative TRPC4 Genexpression in PASCs (Passage1) isoliert aus WT und TRPC3^{-/-} Mäusen mittels RTqPCR. Inkubation der PASCs unter Normoxie (21% O₂) oder in chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂). A) Vergleich von WT (Nox: n=16; Hox: n=13-16) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=10; Hox: n=8-9) Mäusen. B) Vergleich der Männchen (n=7-9) und Weibchen (n=6-7) im WT C) Vergleich der Männchen (n=5-7) und Weibchen (n=3) im TRPC3^{-/-}. Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

Unter chronischer Hypoxie kam es zu einer Hochregulation von TRPC6 im WT PSMCs nach 24 Stunden Hypoxie (**Abbildung 33 A**), wobei in der Analyse der Geschlechter die PSMCs der WT Männchen signifikant hochreguliert waren (**Abbildung 33 B**). In TRPC3^{-/-} PSMCs war hingegen TRPC6 nach 24 Stunden Hypoxie bei den Weibchen signifikant hochreguliert (**Abbildung 33 C**).

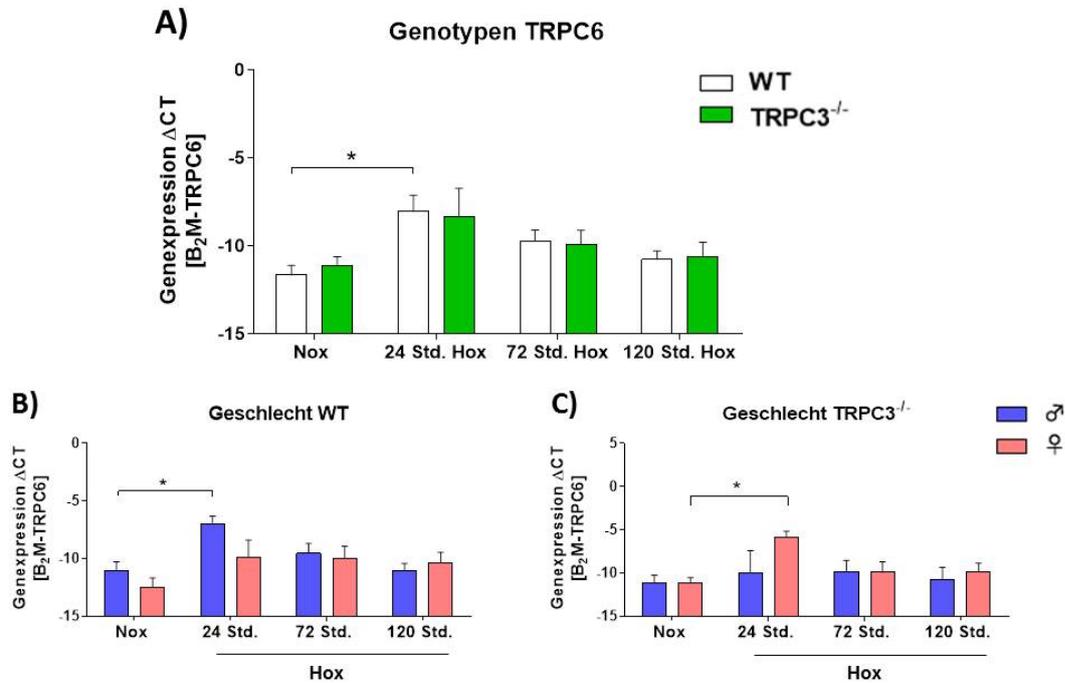


Abbildung 33: Genexpression von TRPC6 in murinen WT und TRPC3^{-/-} PSMCs unter chronischer Hypoxie
 Relative TRPC6 Genexpression in PSMCs (Passage 1) isoliert aus WT und TRPC3^{-/-} Mäusen mittels RTqPCR. Inkubation der PSMCs unter Normoxie (21% O₂) oder in chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂). A) Vergleich von WT (Nox: n=18; Hox: n=16-18) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=12; Hox: n=9-12) Mäusen. B) Vergleich der Männchen (n=9-10) und Weibchen (n=7-8) im WT C) Vergleich der Männchen (n=6-7) und Weibchen (n=3-6) im TRPC3^{-/-}. Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

3.8 Westernblot-Analyse

Um die funktionelle Rolle des TRPC3 Proteins zu untersuchen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierbei wurden zwei anti-TRPC3 Antikörper getestet. Auf Proteinebene wurden bei 75 kDa Banden detektiert, was nicht der Größe von TRPC3 (96 kDa) entspricht. Diese Proteinbanden wurden sowohl in Proteinlysaten von WT als auch von TRPC3^{-/-} Mäusen beobachtet. Die getesteten Antikörper zeigten sich für TRPC3 unspezifisch, weshalb weitere Analysen von TRPC3 auf Proteinebene nicht durchgeführt werden konnten (**Abbildung 34**).

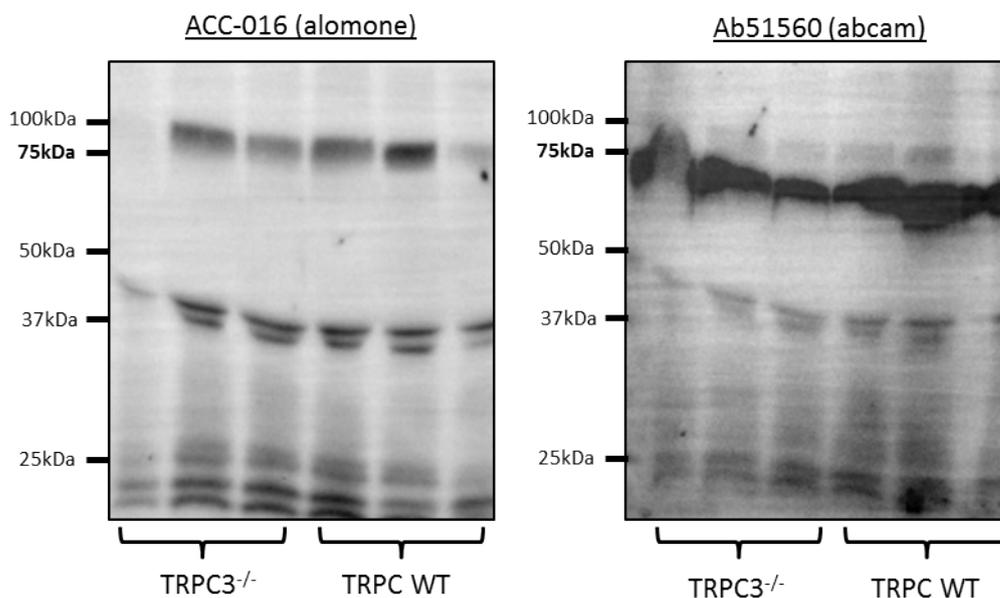


Abbildung 34: Western Blot Analyse zur Detektion von TRPC3

TRPC3 sollte mit den anti-TRPC3 Antikörpern ACC-016 und ab51560 detektiert werden. Proteine isoliert aus WT und TRPC3^{-/-} PASM (n=3) wurden aufgetragen. Repräsentative Western Blots sind dargestellt. kDa: Kilodalton.

3.9 Proliferation muriner PSMCs nach hypoxischer Stimulation

Zur Charakterisierung des Einfluss von TRPC3 auf die Proliferation von PSMCs, wurden Genexpressionsanalysen der Proliferationsmarker Cyclin D1, *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) und ki67 nach 30 Minuten, 1, 3, 24, 72 und 120 Stunden hypoxischer Exposition durchgeführt. Es konnte keine relevante Änderung der Expression von Proliferationsmarkern nach 30 Minuten, 1 und 3 Stunden Hypoxie in WT oder TRPC3^{-/-} PSMCs festgestellt werden, wobei Cyclin D1 auch unter chronischer Hypoxie unreguliert blieb. Aus Übersichtsgründen sind an dieser Stelle nur die regulierten Gene unter chronischer Hypoxie (24, 72 und 120 Stunden) dargestellt. Alle weiteren Ergebnisse können dem Anhang entnommen werden (**Abbildung 41, Abbildung 42, Abbildung 43**).

Ergebnisse

Die Expression von PCNA wurde in WT und in TRPC3^{-/-} PSMCs nach 24 Stunden hypoxischer Exposition signifikant hochreguliert (**Abbildung 35 A**).

Unter Normoxie zeigte sich eine geringere Expression von PCNA in WT Männchen als in WT Weibchen. Nach 24 und 72 Stunden Hypoxie wurde eine Heraufregulation von PCNA bei den WT Männchen beobachtet. Nach 120 Stunden Hypoxie war PCNA bei den WT Männchen weniger exprimiert als bei den WT Weibchen (**Abbildung 35 B**). Es konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede der PCNA Expression in TRPC3^{-/-} PSMCs beobachtet werden (**Abbildung 35 C**).

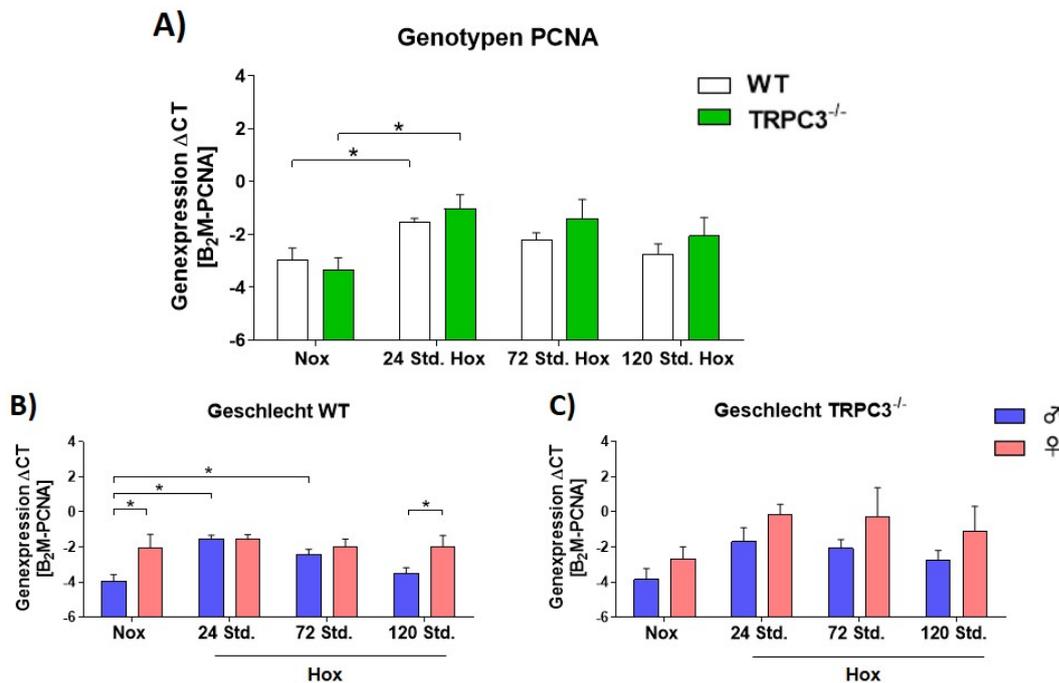


Abbildung 35: Genexpression von PCNA in murinen WT und TRPC3^{-/-} PSMCs unter chronischer Hypoxie
 Relative PCNA Genexpression in PSMCs (Passage1) isoliert aus WT und TRPC3^{-/-} Mäusen mittels RTqPCR. Inkubation der PSMCs unter Normoxie (21% O₂) oder in chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂). A) Vergleich von WT (Nox: n=19; Hox: n=19) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=14; Hox: n=13-14) Mäusen. B) Vergleich der Männchen (n=9-10) und Weibchen (n=9) im WT C) Vergleich der Männchen (n=6-8) und Weibchen (n=5-6) im TRPC3^{-/-}. Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

Der Proliferationsmarker ki67 wurde unter Hypoxie nach 24 und 72 Stunden in WT und TRPC3^{-/-} PASCs hochreguliert (Abbildung 36 A).

In männlichen WT und TRPC3^{-/-} Mäusen wurde ki67 verglichen zur Normoxie nach 24 und 72 Stunden Hypoxie hochreguliert (Abbildung 36 B und C).

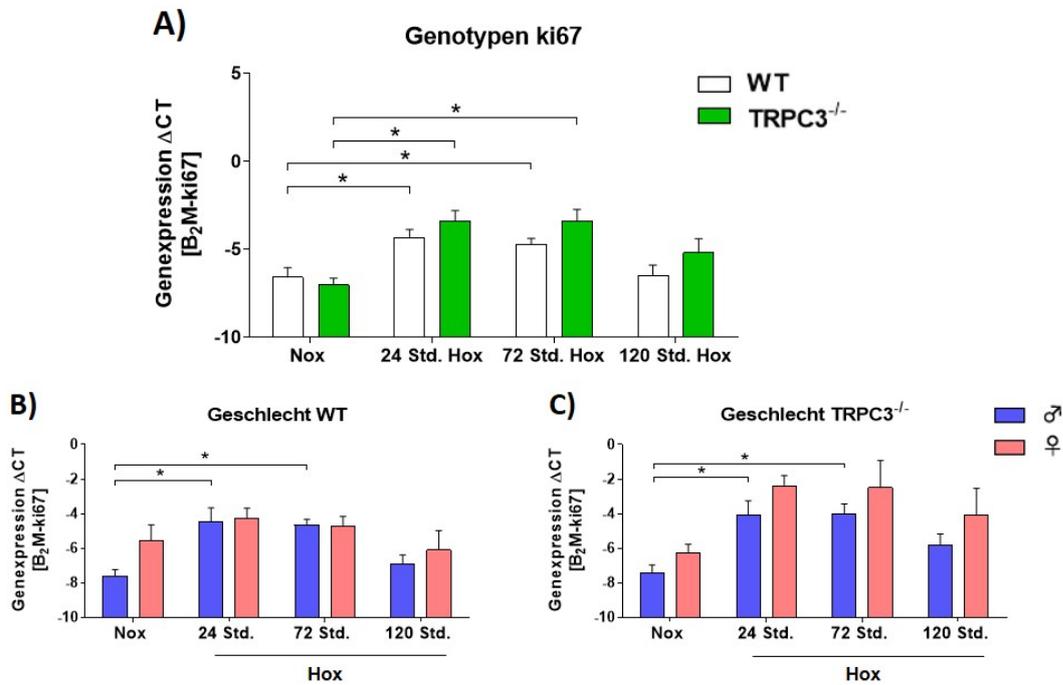


Abbildung 36: Genexpression von ki67 in murinen WT und TRPC3^{-/-} PASCs unter chronischer Hypoxie
 Relative ki67 Genexpression in PASCs (Passage1) isoliert aus WT und TRPC3^{-/-} Mäusen mittels RTqPCR. Inkubation der PASCs unter Normoxie (21% O₂) oder in chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂). A) Vergleich von WT (Nox: n=18; Hypox: n=18) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=13-14; Hypox: n=13-14) Mäusen. B) Vergleich der Männchen (n=9) und Weibchen (n=9) im WT C) Vergleich der Männchen (n=8) und Weibchen (n=5-6) im TRPC3^{-/-}. Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hypox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Ergebnisse

Der EdU-Proliferationsassay von isolierten murinen PASCs der Passage 0 nach 120 Stunden Hypoxie zeigte keine Unterschiede der Proliferation von WT und TRPC3^{-/-} Zellen (**Abbildung 37**).

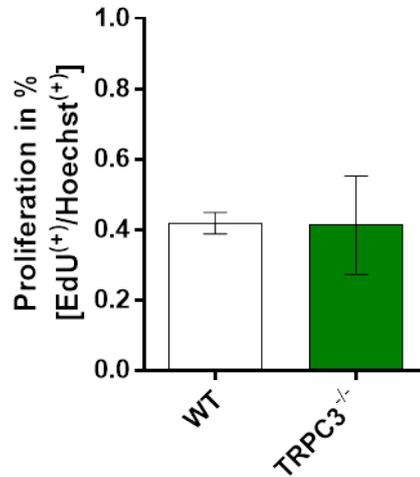


Abbildung 37: Proliferation von PASCs von WT und TRPC3^{-/-} Mäusen unter Hypoxie

Proliferation von murinen PASCs (Passage 0) nach 120 Stunden Hypoxie (1% O₂) mit Hilfe von 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU). Vergleich von WT (Hox: n=5) und TRPC3^{-/-} (Hox: n=3) Mäusen. Proliferation wurde durch Berechnung der Ratio zwischen EdU-positive (EdU⁽⁺⁾) Zellen und Hoechst positiven (Hoechst⁽⁺⁾) Zellen ermittelt. Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von TRPC3 in der HPV und der CHPH untersucht. TRPC Kanäle sind an der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ beteiligt und könnten die Kontraktion und Proliferation von PASMCs beeinflussen. Beides hat Einfluss auf die HPV und das *Remodeling* der Gefäße[157]. Genexpressionsanalysen aus vorhergehenden Untersuchungen zeigten, dass alle TRPC Isoformen in PASMCs exprimiert werden. In PASMCs der Ratte wurden vor allem TRPC1 und TRPC6 nachgewiesen, gefolgt von TRPC3[93]. Ähnliche Beobachtungen wurden bei murinen PASMCs gemacht, wobei TRPC4 ähnlich hoch wie TRPC3 exprimiert war[103]. Auch in murinen Lungenhomogenaten und mikrodisezierten Gefäßen konnte TRPC3 mittels RTqPCR nachgewiesen werden[103]. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Funktion von TRPC3 im Mechanismus der HPV und CHPH der Maus untersucht.

4.1 Rolle von TRPC3 in akuter Hypoxie

Unter akuter Hypoxie versteht man einen kurzzeitig andauernden Abfall des alveolären O_2 -Partialdrucks, die zu einer biphasischen Verengung der pulmonalen Gefäße führt[91, 189]. Während ein Fehlen von TRPC6 zum Verlust der akuten Phase führt[194], konnte kein Einfluss von TRPC3 in der akuten (Sekunden bis Minuten) oder anhaltenden (20 Minuten bis Stunden) Phase gezeigt werden. Ähnliche Beobachtungen konnten bei TRPC1^{-/-} Mäusen gemacht werden[103]. Im Gegensatz zu TRPC1^{-/-} zeigten die TRPC3^{-/-} Lungen tendenziell einen niedrigeren Δ PAP in der verlängerten Hypoxie.

Die Genexpressionsanalyse nach 30- minütiger, 1- und 3- stündiger Hypoxie-Exposition von PASMCs zeigte, dass das Fehlen von TRPC3 unter Hypoxie zur Hochregulation von TRPC1 führt. Zusätzlich war die Expression von TRPC5 in WT PASMCs nach 30 Minuten und einer Stunde hypoxischer Exposition runterreguliert, was in TRPC3^{-/-} PASMCs nicht beobachtet werden konnte. Die Unterschiede in der Expression von TRPC1 und TRPC5 zwischen WT und TRPC3^{-/-} PASMCs könnten die Kontraktilität der Gefäße beeinflussen. TRPC1 und TRPC5 führen über die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ [38, 119, 158, 190]. Die erhöhte Expression von TRPC1 und TRPC5 in TRPC3^{-/-} PASMCs während anhaltender Hypoxie könnte zu einer Erschöpfung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher führen und die Reaktion von pulmonalen Gefäßen unter Hypoxie beeinflussen[191]. Während eine Rolle von TRPC1 in chronischer Hypoxie gezeigt werden konnte[93, 103, 186], wurde TRPC5 bis jetzt

Diskussion

keine Bedeutung in der PH zugeschrieben. In Lungenhomogenaten ist TRPC5 nicht detektierbar[30, 103], wohingegen es in PASMCs exprimiert[103] und Hypoxie abhängig reguliert zu sein scheint. Dies könnte auf eine Rolle von TRPC5 in den pulmonalen Gefäßen hindeuten. Bezzerides et al. zeigten, dass TRPC5 Kanäle in Vesikeln unter der Plasmamembran gespeichert werden und durch Stimulation sehr schnell eingebaut werden können[13], was in der anhaltenden Hypoxie von Bedeutung sein könnte. Außerdem könnte der Verlust von TRPC3 eine Veränderung der Expression und/oder Durchlässigkeit weiterer Ionenkanäle beeinflussen[2, 191]. Neben den spannungsunabhängigen TRPC Kanälen nehmen auch spannungsabhängige Kaliumkanäle und Ca^{2+} -Kanäle[191] Einfluss auf die intrazelluläre Elektrolytkonzentration und das Membranpotential.

4.2 Rolle von TRPC3 in chronischer Hypoxie

Unter chronischer Hypoxie kommt es zur Entstehung einer CHPH, charakterisiert durch einen erhöhten RVSP und einen Umbau der pulmonalen Gefäßwände. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass es zum einen zur Neomuskularisierung von vorher nicht muskularisierten Gefäßen kommt und zum anderen die Muskularisierung von präkapillären pulmonalen Arterien, wahrscheinlich durch Proliferation von PASMCs der Media, zunimmt[163].

Die Untersuchung von WT und TRPC3^{-/-} Mäusen nach 3-wöchiger Hypoxie-Exposition zeigte einen Hypoxie-bedingten Anstieg des RVSP in beiden Genotypen. Das Fehlen von TRPC3 führte zu einem reduzierten RVSP verglichen mit dem WT unter Normoxie und Hypoxie, was auf einen partiellen Schutz der *Knockout* Mäuse hindeutet. Auch TRPC1^{-/-} Mäuse waren nach 3-wöchiger Hypoxie im Vergleich zum WT partiell geschützt[103, 199]. Die genaue Rolle von TRPC6 in der CHPH ist noch unbekannt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert[105]. Weissmann et al. konnten nach 3-wöchiger Hypoxie keinen Einfluss von TRPC6 auf den RVSP feststellen[194]. Xia et al. zeigten hingegen einen verringerten RVSP Anstieg in TRPC6^{-/-} Mäusen nach einer und drei Wochen Hypoxie[199]. Die abweichenden Ergebnisse können jedoch im Alter, dem Geschlechts oder der Abstammung der Mäuse begründet werden[105]. Im Gegensatz zu TRPC1^{-/-} Mäusen wiesen TRPC3^{-/-} Mäuse bereits unter Normoxie einen reduzierten RVSP auf. Diese Beobachtung könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte das Fehlen von TRPC3 unabhängig von der Bedingung zu einem phänotypisch erniedrigten RVSP führen und der partielle Schutz unter Hypoxie dadurch suggeriert

Diskussion

werden. Zum anderen ist der RVSP proportional abhängig vom Herzzeitvolumen (*cardiac output*, CO; Herzfrequenz x Schlagvolumen) und dem PVR ($RVSP - mPAP = PVR \times CO$)[88]. Ein Rechtsherzversagen mit verminderten CO kann zu einem erniedrigten RVSP beitragen. Ein Einfluss von TRPC3 auf die RHH oder Herzfunktion konnte nicht gezeigt werden. Echokardiographische Untersuchungen wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit nicht durchgeführt. Der PVR wird bei der PH wesentlich durch das *Remodeling* der Gefäße beeinflusst[88]. Neben dem RVSP gilt eine Zunahme der Muskularisierung kleiner pulmonaler Gefäße als Charakteristikum der CHPH[73, 183]. Die Hypoxie-bedingte Zunahme der Muskularisierung führt zu einem verkleinerten Gefäßlumen und zu einer Erhöhung des PVRs[70].

Die histologischen Untersuchungen von Mauslungen nach drei Wochen Hypoxie zeigte sowohl in WT als auch in TRPC3^{-/-} Mäusen eine Hypoxie-bedingte Zunahme der Muskularisierung. Dies kann sowohl am erhöhten Schnittpunkt mit der y-Achse der Genotypen, als auch der Zunahme der Muskularisierung der Gefäße <15µm unter Hypoxie festgemacht werden. TRPC3^{-/-} Mäuse wiesen unter Hypoxie und Normoxie einen geringeren Schnittpunkt mit der y-Achse und eine verminderte Muskularisierung der Gefäße <15µm auf. Dies deutet auf einen protektiven Effekt in Bezug auf die Hypoxie-bedingte Zunahme der Muskularisierung bei den TRPC3^{-/-} Mäusen hin. Bei genauerer Analyse der Regressionsgerade zeigte sich, dass TRPC3^{-/-} Mauslungengefäße mit einem Durchmesser <30µm unter Normoxie und TRPC3^{-/-} Mauslungengefäße mit einem Durchmesser <50µm unter Hypoxie weniger stark muskularisiert waren als WT Gefäße. Auch die in der Tendenz erhöhte Steigung bei den TRPC3^{-/-} Mäusen deutet darauf hin, dass der Verlust von TRPC3 vor allem zu einer Verringerung der Muskularisierung in distalen kleinen Gefäßen führen könnte, die maßgeblich an Veränderungen des PVRs beteiligt sind[70]. Auch eine Beteiligung von TRPC3 an der Neomuskularisierung wäre denkbar, da TRPC3^{-/-} Gefäße <15µm im Vergleich zum WT signifikant weniger muskularisiert waren.

Die verminderte Muskularisierung kleiner TRPC3^{-/-} Gefäße und der damit einhergehende erniedrigte PVR könnte zu den erniedrigten RVSP unter Normoxie und Hypoxie beitragen.

In der Literatur wird der Einfluss von TRPC1 und TRPC6 auf die Muskularisierung pulmonaler Gefäße nach chronischer Hypoxie kontrovers diskutiert. Während TRPC1^{-/-} Mäuse höchstwahrscheinlich vor einer Zunahme der Muskularisierung partiell geschützt

Diskussion

sind[103, 199], gibt es für TRPC6 unterschiedliche Ergebnisse. Fuchs et al. wiesen[48], im Gegensatz zu Xia et al.[199], keinen Einfluss von TRPC6 auf die Muskularisierung nach. Als mögliche Ursache der verminderten Muskularisierung in TRPC1^{-/-} Mäusen konnte eine verminderte Proliferation und Migration von TRPC1^{-/-} PSMCs der Passage 0 nach 120 Stunden Hypoxie festgestellt werden[102, 103].

Auch in dieser Arbeit wurde der Einfluss von TRPC3 auf die Proliferation von PSMCs untersucht. Die Betrachtung der Genexpression von Proliferationsmarkern und auch des Proliferationsassays zeigten keine Unterschiede zwischen WT und TRPC3^{-/-} PSMCs unter Hypoxie, weshalb eine Bedeutung von TRPC3 im Mechanismus der Proliferation als Auslöser für die verminderte Muskularisierung unwahrscheinlich scheint.

In der Literatur wird eine TRPC3-abhängige Hyperproliferation von glatten Muskelzellen der Atemwege bei Asthmatikern beschrieben, die vermutlich zum asthmabedingten *Remodeling* des Bronchialsystems führt[188]. Möglicherweise hat TRPC3 keinen direkten Einfluss auf die Proliferation in PSMCs unter Hypoxie, könnte aber bei den *in vivo* Versuchen Einfluss auf glatte Muskelzellen des Bronchialsystems nehmen und darüber die PH indirekt beeinflussen. Ein Umbau des Bronchialsystems mit einhergehender Entzündungsreaktion könnte über Mediatoren oder die entstehende Hypoxie Einfluss auf die Genese der PH nehmen. Untersuchungen zum Einfluss der TRPCs auf die Proliferation von Tumorzellen zeigten, dass eine Runterregulation von TRPC3 zu einer verminderten Proliferation von Tumorzellen der Ovarien führt[204]. Jiang et al. wiesen eine Bedeutung von TRPC1, 4 und 6 in der Proliferation von Lungenkrebszellen nach, wohingegen TRPC3 keinen Einfluss nahm[74].

Bei der Untersuchung des Gefäßremodelings in der CHPH sollten multifaktorielle Mechanismen in Betracht gezogen werden. Neben der von der Ca²⁺-abhängigen[16, 44] Hyperproliferation von PSMCs der Media[106, 173], könnten auch Veränderungen in der Apoptose und Migration von PSMCs eine Rolle spielen[133, 151].

Die Neomuskularisierung von kleinen Gefäßen ist am ehesten auf die Migration von dedifferenzierten glatten Muskelzellen aus proximalen in weiter distale Abschnitte der Gefäße zurückzuführen[133, 151]. In Studien zur Rolle von TRPC3 im Tumorwachstum, konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von TRPC3 Kanälen zu einer verminderten Migration von Tumorzellen[6] der Ovarien[204], des Pankreas[165],

Diskussion

der Haut[122] und der Blase[77] führt. Es wäre denkbar, dass der Verlust von TRPC3 über eine verringerte Migration zu einer reduzierten Neomuskularisierung führt und es darüber zu einem verminderten RVSP kommt.

Als weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Struktur und Funktion von pulmonalen Gefäßen gilt die Apoptose von PASMCs. Unter Hypoxie wird die verminderte Apoptose hauptsächlich durch einen Anstieg $[K^+]_i$ verursacht[115, 136]. Für das Glioblastom konnte gezeigt werden, dass eine selektive Blockade von TRPC3 zu einer verminderten Proliferation und Migration und gesteigerten Apoptose von Tumorzellen führt. Der Einfluss von TRPC3 auf die Migration und Apoptose von PASMCs wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Mehrere Quellen beschreiben einen Einfluss von TRPC3 auf die Zellproliferation – migration und -apoptose, es zeigen sich allerdings krankheits- und zellspezifische Unterschiede. Gemeinsam ist den betrachteten Studien, dass eine Änderung der TRPC3 Expression und die damit einhergehende Abweichung der Zellfunktion erst in pathologischen Prozessen relevant werden.

Die Analyse der Proliferationsmarker zeigte, dass ki67 nach 24 und 72 Stunden Hypoxie und PCNA nach 24 Stunden Hypoxie in WT und TRPC3^{-/-} PASMCs hochreguliert sind und die Expression nach 120 Stunden Hypoxie wieder runterreguliert ist. Wie in der HPV könnten auch Zellen zu bestimmten Zeitpunkten unterschiedlich auf Hypoxie reagieren. Eine vorübergehende Dysregulation der Proliferation nach kurzer Expositionsdauer könnte einen gravierenden Effekt auf die Proliferation haben, da auch nach Beendigung der Hypoxie die Zellzahl dauerhaft erhöht bleibt. Auch TRPC4 und TRPC6 waren lediglich zu einem bestimmten Hypoxie Zeitpunkt (24 Stunden) hochreguliert und fielen nach 120 Stunden wieder auf den Normoxie-Wert ab. Die Phase zwischen 24 und 72 Stunden Hypoxie könnte in den PASMCs entscheiden für die Fehlregulation des Zellzyklus sein und die pathologischen Prozesse im Krankheitsverlauf verursachen. Die Bedeutung und die Auswirkung dieser kurzzeitigen Änderung der Expressionsmuster auf den Pathomechanismus bleibt jedoch unklar und erschwert die Analyse. Eine weitere Erklärung für den Abfall von Proliferationsmarkern nach 120 Stunden Hypoxie, könnte eine erhöhte Zelldichte sein. Für einige Zelltypen konnte bereits gezeigt werden, dass die Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte bei hoher Konfluenz anti-proliferativ und pro-apoptotisch wirken können[58, 80].

Diskussion

Neben den drei untersuchten Markern, spielen eine Vielzahl Proliferations-assoziiierter Proteine (z. B. weitere Cycline oder das Statin 57-KD[71]) eine Rolle, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

Zur genaueren Charakterisierung möglicher Unterschiede zwischen den Genotypen und der Reaktion auf Hypoxie wurden Genexpressionsmuster der TRPCs in Lungenhomogenaten nach 3-wöchiger Hypoxie und in PASMCs unter chronischer Hypoxie von WT und TRPC3^{-/-} Mäusen untersucht. In den WT Lungenhomogenaten zeigte sich, wie auch schon vorher von Malczyk et al. beschrieben[103], keine Hypoxie-bedingte Regulation von TRPC3. Die TRPC3^{-/-} Lungenhomogenate zeigten verglichen zum WT unter Normoxie eine erniedrigte Expression von TRPC1 und TRPC6, wohingegen unter Hypoxie keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden konnten. Möglich wäre, dass die erniedrigte Expression von TRPC6 und TRPC1 zu dem erniedrigten RVSP von TRPC3^{-/-} Mäusen unter Normoxie beitragen. Allerdings wurde ein partieller Schutz gegenüber der Erhöhung des RVSP beim Fehlen von TRPC1 oder TRPC6 bis jetzt nur unter Hypoxie nachgewiesen[199]. Das Fehlen von TRPC3 und die Dysregulation von TRPC1 und TRPC6 könnte allerdings auch unter Normoxie zu protektiven Effekten in Bezug auf die Entstehung der PH führen.

Maßgeblich an der Regulation des Durchmessers und des intraluminalen Drucks der Gefäße beteiligt sind PASMCs, weswegen Ihnen eine entscheidende Rolle in der PH zugeschrieben wird[117, 141]. Zur genaueren Analysen kompensatorischer Mechanismen nach TRPC3 Verlust unter chronischer Hypoxie, wurden deshalb murine PASMCs für die Zeitpunkte 24, 72 und 120 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und die Expression aller TRPC Proteine untersucht. Im Gegensatz zu den Lungenhomogenaten zeigten sich keine Unterschiede der TRPC Expression zwischen WT und TRPC3^{-/-} Mäusen unter Normoxie. Dies weist darauf hin, dass die verminderte Expression von TRPC1 und TRPC6 in TRPC3^{-/-} Lungenhomogenaten in anderen Zellen als den PASMCs stattfinden könnte. Möglich wäre z. B. eine verminderte Expression von TRPC1 und 6 in pulmonalen Endothelzellen, die über verschiedene Mediatoren mit den PASMCs interagieren und eine Änderung des Gefäßtonus herbeiführen können[1, 39, 94].

In WT PASMCs zeigte sich eine Hypoxie-bedingter Expressionsanstieg von TRPC1, was bereits in der Pulmonalarterie und PASMCs der Ratte[93, 186] sowie in murinen PASMCs der Passage 2 beschrieben wurde[103]. Auch für TRPC3^{-/-} PASMCs konnte

Diskussion

eine Hochregulation von TRPC1 in chronischer Hypoxie gezeigt werden, welche der Stimulus für die Zunahme der Muskularisierung und die Zunahme des RVSP unter Hypoxie sein könnte[103]. Sowohl TRPC4 als auch TRPC6 waren in den WT PSMCs lediglich nach 24 Stunden Hypoxie hochreguliert, was eine besondere Bedeutung dieses Zeitpunkts vermuten lässt. Während eine Änderung der TRPC4 Expression unter chronischer Hypoxie noch nicht gezeigt werden konnte, ließ sich in der Pulmonalarterie und in PSMCs der Ratte, wie auch für TRPC1, eine Hypoxie-bedingte Hochregulation von TRPC6 nachweisen[93, 186].

Insgesamt zeigten sich bei der TRPC Expression der PSMCs keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Eine Regulation von TRPC3 unter Hypoxie wurde in WT PSMCs nicht beobachtet. Dies deutet auf eine untergeordnete Rolle von TRPC3 unter chronischer Hypoxie in den PSMCs hin. Allerdings können anhand der durchgeführten Versuche weder der Einfluss von TRPC3 auf andere Zellen der Gefäßwand noch auf die Anfangsphase der *in vivo* Exposition beurteilt werden.

Eine kompensatorische Hochregulation von TRPC3 beim Fehlen von TRPC6 konnte in zerebralen Arterien und der Aorta von TRPC6^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden[29], was darauf hindeutet, dass die Expression von TRPC Proteinen durch den Verlust anderer Isoformen beeinflusst wird. Beschrieben wurden funktionelle heteromere Einheiten zwischen TRPC3, -6, und -7 sowie TRPC5 und -6, wobei TRPC1 potentiell mit allen anderen TRPCs Bindungen eingehen kann[64]. Auch weitere, bisher nicht beschriebene heteromere Formationen mit anderen Subfamilien sind denkbar. Die Formation heteromerer Kanäle erschwert die Interpretation der Genexpressionsanalyse bei Verlust eines TRPC Proteins, da unklar bleibt welche Kanäle in welcher Zusammensetzung die Funktion des fehlenden Proteins übernehmen.

Die Genexpressionsanalyse ermöglicht nur eine annähernde Aussage über die letztliche Proteinexpression und die Aktivität der Proteine, da sie posttranslationelle Modifikationen wie Glykosylierungen, Phosphorylierung oder Hydroxylierung[185] nicht berücksichtigen kann. Aufgrund fehlender Antikörper konnte in der vorliegenden Arbeit die Proteinexpression von TRPC3 nicht untersucht werden. Unklar bleibt, wie viel Protein tatsächlich exprimiert wird. Dennoch geben die Daten einen Eindruck über kompensatorische und regulatorische Mechanismen in der CHPH.

Neben RVSP, Muskularisierung, Proliferation und Genexpression wurde der Einfluss von TRPC3 auf weitere Parameter wie die Herzhypertrophie und den SAP untersucht.

Diskussion

Charakteristisch für die PH ist die Entwicklung einer RHH, als Folge der chronischen Druckbelastung des rechten Ventrikels. Die RHH gilt als entscheidender Einflussfaktor auf die Krankheitslast und Mortalität der PH[184]. In der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung der RHH unabhängig vom Genotyp. Obwohl die TRPC3^{-/-} Mäuse einen niedrigeren RVSP aufwiesen, zeigte dies kein Effekt auf die RHH. Möglicherweise ist die Reduzierung des RVSP nicht ausreichend, um den rechten Ventrikel zu entlasten oder die RHH wird unabhängig vom erhöhten PAP, durch Hypoxie-bedingte Umbauprozesse im Herzen selbst ausgelöst. Denkbar wäre auch ein erniedrigter RVSP in TRPC3^{-/-} Mäusen unter Hypoxie durch eine sekundäre Rechtsherzdekompensation mit Dilatation des Ventrikels.

Xia et al. zeigten eine reduzierte RHH bei TRPC1^{-/-} Mäusen nach einer und drei Wochen Hypoxie[199]. Bei TRPC6^{-/-} Mäusen konnte nur nach einer Woche, nicht aber nach drei Wochen Hypoxie ein protektiver Effekt auf die RHH beobachtet werden[199]. Ein Effekt von TRPC3 auf die RHH nach kürzeren Zeitpunkten wurde bis jetzt nicht untersucht. Möglichweise könnte der Verlust von TRPC3 wie auch bei TRPC6 zu einer verzögerten RHH führen, die nach 3 Wochen Hypoxie nicht mehr zu detektieren wäre. Auf der anderen Seite könnte eine Dauer der Hypoxie-Exposition von drei Wochen zu kurz sein, um einen Einfluss von TRPC3 auf die RHH zu bewirken. Nakayama et al. konnten zeigen, dass die Überexpression von TRPC3 bei der essentiellen Hypertonie erst nach 12 Monaten zu einer Verschlechterung der Linksherzhypertrophie führt[118]. Der SAP gibt unter anderem Auskunft über das Vorliegen einer essentiellen Hypertonie und eine mögliche Druckbelastung des linken Herzens, was letztlich eine PH der Gruppe 2 verursachen könnte. Ein Effekt von TRPC3 auf den SAP nach chronischer Hypoxie konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. In der Literatur konnte jedoch eine Hochregulation von TRPC3 in glatten Muskelzellen der Gefäße[95] und in cerebralen Gefäßen[187] der Ratte als Einflussfaktor auf das *Remodeling* bei der systemarteriellen Hypertonie identifiziert werden. Außerdem führte die Inhibierung von TRPC3 und TRPC5 Kanälen in Monozyten zu einer geringeren Entwicklung vaskulären Folgeerkrankungen (z. B. Plaquebildung) der primären Hypertonie[96].

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Hypoxie-induzierten oder TRPC3-assoziierten Veränderungen im LV beobachtet werden. In der Literatur ist unabhängig von Hypoxie ein Einfluss von TRPC3 in der Linksherzhypertrophie bei essentieller Hypertonie beschrieben. In mehreren Untersuchungen konnte eine Überexpression von TRPC1,

Diskussion

TRPC3 und TRPC6 in hypertrophen LV festgestellt werden[19, 31, 86, 118, 123, 149, 150], wobei sowohl die Kontraktilität von Kardiomyozyten, als auch das *Remodeling* der Herzmuskulatur durch TRPCs beeinflusst wurde[31]. Eine Hochregulation von TRPC3 wurde außerdem in ventrikulären Myozyten hypertropher Herzen von Ratten beobachtet, wobei die Zu- bzw. Abnahme der Expression von TRPC3 einen gleichgerichteten Einfluss auf die Expression hypertropher Stimuli nahm[18]. Interessanterweise konnten Seo et al. zeigen, dass ein protektiver Effekt auf die Linksherzhypertrophie *in vivo* nur durch einen doppelten *Knockout* von TRPC3 und TRPC6 erzielt wurde[149]. Heteromere Formationen von TRPC Kanälen und kompensatorischen Mechanismen scheinen auch bezogen auf Herzhypertrophie eine Rolle zu spielen. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit die Genexpression von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 in Herzhomogenaten des rechten und linken Ventrikels weder durch Hypoxie noch durch TRPC3 Verlust beeinflusst.

4.3 Einfluss des Geschlechts auf die PH

Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden bisher vor allem in der PH der Gruppe 1, der PAH beobachtet, könnten aber auch in CHPH eine Relevanz haben[60]. Frauen sind zwar häufiger von PH betroffen, zeigen aber einen mildereren Verlauf mit einer besseren rechtsventrikulären Funktion und einem längeren Überleben. Ventetuolo et al. konnten bei weiblichen Veteranen einen erhöhten PVR feststellen, der Druck im rechten Vorhof war verglichen zu den Männern aber erniedrigt[182]. Dies könnte auf eine bessere Adaptation des rechten Ventrikels trotz erhöhter Nachlast bei Frauen hinweisen. Auch in Tiermodellen von Mäusen, Ratten, Hühnern, Schweinen und Schafen konnten eine Verminderung des Anstieg des RVSP, der Rechtsherzhypertrophie und des vaskulären *Remodelings* in Weibchen gezeigt werden[60]. Man bezeichnet dies auch als „Östrogen Paradoxon“ und geht davon aus, dass verschiedene weibliche Hormone für dieses Phänomen verantwortlich sind[60]. In dieser Arbeit entwickelten WT Weibchen eine stärkere RHH als WT Männchen, wohingegen beim *Knockout* keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zu finden waren. Die TRPC3^{-/-} Weibchen zeigten unter Hypoxie einen signifikant niedrigeren RVSP als die WT Weibchen, während unter Normoxie die TRPC3^{-/-} Männchen einen schwächeren RVSP im Vergleich zum WT aufwiesen. Mögliche protektive Effekte bei den TRPC3^{-/-} Weibchen unter chronischer Hypoxie könnten durch das Zusammenspiel von TRPC3 und Östrogen erklärt werden. Li et al. konnten bezogen auf das Ovarialkarzinom zeigen, dass durch

Diskussion

Östrogen die Expression von TRPC3 erhöht wird[92]. Beim Fehlen von TRPC3 wurde der Östrogen-stimulierte Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle inhibiert[92], was auch bei der PH zu einem erniedrigten RVSP beitragen könnte.

Die Betrachtung der Genexpression von TRPCs und Proliferationsmarkern in den PSMCs zeigte keine eindeutigen geschlechtsspezifischen Unterschiede. Allerdings zeigten sich einige Auffälligkeiten und Tendenzen, die eine Begründung für den erniedrigten RVSP bei TRPC3^{-/-} Weibchen liefern könnte. Die Proliferationsmarkern PCNA und ki67 waren bei den Männchen verglichen zu den Weibchen in beiden Genotypen unter Normoxie weniger stark exprimiert. Unter Hypoxie wurden die Proliferationsmarker nach 24 und 72 Stunden bei den Männchen hochreguliert, während sich die Werte bei den Weibchen nur geringfügig und nicht signifikant änderten. Eine geschlechtsspezifische, unterschiedliche Proliferation der PSMCs nach 24 bis 72 Stunden Hypoxie könnte wie bereits beschrieben nachhaltig Einfluss auf die Anzahl der PSMCs nehmen. Die Untersuchung der Proliferation von PSMCs mittels EdU-Proliferationsassays lässt aufgrund der geringen n-Zahl keine Aussage über geschlechtsspezifische Unterschiede zu. Interessanterweise konnte in der TRPC1 Genexpression nach 3 und 24 Stunden Hypoxie ähnliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern wie bei den Proliferationsmarkern gezeigt werden. TRPC1 war bei den Männchen stärker reguliert und exprimiert. Dies war bei den TRPC3^{-/-} PSMCs stärker auffällig, zeigte sich aber auch in den WT PSMCs. Ein Fehlen von TRPC1 führt, wie bereits nachgewiesen[102], zu einer geringeren Proliferation. Im Umkehrschluss, könnte die erniedrigte TRPC1 Expression bei den Weibchen zu einer verminderten Proliferation von PSMCs beitragen und darüber Einfluss auf den RVSP nehmen. Der partielle Schutz vor PH bei den Weibchen, vor allem der TRPC3^{-/-} Weibchen, könnte durch hormonelle Einflüsse[60] und Änderungen in der Proliferation, bzw. TRPC1 Expression bedingt sein.

In den Lungenhomogenaten zeigte sich für die TRPC3^{-/-} Männchen eine reduzierte Expression von TRPC1 und TRPC6 in Normoxie im Vergleich zu Hypoxie, was zum erniedrigten RVSP der TRPC3^{-/-} Männchen unter Normoxie beitragen könnte. Nach 24 Stunden Hypoxie konnte in den PSMCs der WT Männchen eine Hochregulation von TRPC6 beobachtet werden, wohingegen für TRPC3^{-/-} PSMCs die Expression von TRPC6 in den Weibchen hochreguliert war. Außerdem zeigte sich nach 24 Stunden Hypoxie ein geschlechtsspezifischer Unterschied der Expression von TRPC7, was

Diskussion

wiederum für die Relevanz des Zeitpunktes nach 24 Stunden Hypoxie spricht. Ein *in vivo* Korrelat für diese Beobachtungen konnte nicht gefunden werden, aber die Ergebnisse deuten darauf hin, dass geschlechtsspezifische Expressionsänderungen in der PH relevant sein könnten.

Die WT Weibchen und die TRPC3^{-/-} Männchen wiesen unter Normoxie einen höheren SAP als die WT Männchen auf. Bisherige Untersuchungen zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der systemarteriellen Hypertonie zeigten, dass die Prävalenz der systemarteriellen Hypertonie beim Menschen abhängig vom Alter ist; während in jüngeren Jahren häufiger Männer betroffen sind, nimmt postmenopausal die Prävalenz bei Frauen zu[33], was auf einen hormonellen Einfluss hindeutet. Die Beobachtung, dass *Knockout* Männchen phänotypisch zu einem erhöhten SAP neigen konnte für TRPC6^{-/-} Mäuse bereits von Dietrich et al. gemacht werden[29].

Insgesamt zeigt sich, dass das Geschlecht Einfluss auf die PH nimmt, wobei dieser Einfluss unabhängig von TRPC3 ist.

4.4 TRPC-Kanäle als mögliche therapeutische Zielstruktur

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass TRPC3 durchaus Einfluss auf die Entwicklung der PH nimmt. Der Verlust von TRPC3 zeigt eine Reduktion des RVSP und der Muskularisierung, dessen Mechanismus jedoch bisher ungeklärt bleibt. Die Reaktion der Zellen in Abhängigkeit von der Hypoxie-Dauer sollte bei weiteren Untersuchungen näher betrachtet werden, da sich die Expressionsdaten der TRPCs in den drei Phasen der Hypoxie (akute, anhaltende und chronische Hypoxie) unterscheiden und sich die einzelnen TRPC Proteine gegenseitig beeinflussen können. Der RVSP war unter Hypoxie bei den TRPC3^{-/-} Weibchen signifikant niedriger als bei den WT Weibchen. Eine Suppression von TRPC3 könnte also vor allem bei Frauen therapeutisch relevant werden. Deswegen sollten zukünftig auch geschlechtsspezifische Untersuchungen durchgeführt werden, sodass Therapien individuell angepasst werden können. Die Suche nach einem spezifischen Inhibitor des TRPC3 Kanals und des Signalwegs von TRPC3 stellt aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu anderen TRPCs eine Herausforderung dar. Eine spezifische Inhibition oder Aktivierung ist essentiell, um Nebenwirkungen einer möglichen Therapie zu reduzieren[6]. Deswegen sollten therapeutische Ansätze möglichst zell- und krankheitsspezifisch sein[170]. Allerdings könnte die pharmakologische Steuerung der TRPC3 Aktivität für viele Erkrankungen eine therapeutische Option sein. Voraussetzung dafür ist, dass die Ergebnisse aus den

Diskussion

Tiermodellen auch auf den Menschen übertragbar sind. Für das Glioblastom konnte ein therapeutischer Nutzen durch spezifische Inaktivierung des TRPC3 Proteins bereits gezeigt werden[20]. Zusätzlich ist es essentiell, aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu anderen TRPCs, mehr über die Struktur und Zusammensetzung der TRPC Kanäle zu erfahren[101, 176]. Auch die Klärung des Mechanismus, durch den der RVSP in TRPC3^{-/-} Mäusen gesenkt wird ist wichtig, um eine spezifische Therapie zu ermöglichen. Die pharmakologische Inhibierung des Signalwegs von TRPC6 über DAG[63, 181] führte, wie auch schon der TRPC6 *Knockout*, zu einem signifikanten Abfall des PAP während der HPV in der ILU[176]. Die Übertragung der Ergebnisse aus den *Knockout*-Mausmodellen auf ein Inhibitor-basiertes Verfahren, ist essentiell, um therapeutische Möglichkeiten für den Menschen zu entwickeln. Auch eine Gentherapie, z.B. virale Vektoren wäre denkbar. Zudem sollten die Wechselbeziehungen zwischen den Zelltypen (v.a. PASMCs und ECs) und die Dynamik zwischen den Gefäßschichten (v. a. Media und Interna) genauer betrachtet werden[39, 67], um dem *Remodeling* der Gefäße in PH zukünftig therapeutisch vorbeugen zu können und somit eine Reduktion der Krankheitslast für Patienten mit PH zu bewirken.

5 Zusammenfassung

Bei der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (CHPH) kommt es durch den Umbau von pulmonalarteriellen Gefäßen zu einem dauerhaft erhöhten pulmonalarteriellen Druck (PAP) und einem Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstands (PVR). Die CHPH-Patienten leiden unter Symptomen wie Abgeschlagenheit, Dyspnoe und thorakalem Druckgefühl. Eine Überbelastung des rechten Ventrikels verursacht eine Dilatation, die zur Rechtsherzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen bis hin zum Herzstillstand führen kann. Ursächlich für die chronische Hypoxie können ein Aufenthalt in Höhenluft und/oder Erkrankungen der Lunge (z. B. Lungenfibrose oder Schlafapnoe) sein, die mit einer alveolären Hypoxie einhergehen. Unter akuter und länger anhaltender Hypoxie kommt es zunächst zur physiologischen, reversiblen hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV), die die Perfusion von besser ventilerten Arealen der Lunge begünstigt. Der Mechanismus, der unter chronischer Hypoxie zum irreversiblen Umbau der Gefäße und somit zur CHPH führt, ist noch weitestgehend ungeklärt. Bereits gezeigt wurde, dass die pathologische Induktion der Proliferation von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs) zu einer Gefäßverengung und gesteigerter Kontraktilität führt. Beide Vorgänge sind Calcium-abhängig, weshalb spannungsunabhängige klassische transiente Rezeptorpotential Proteine (TRPC) im Fokus der Forschung stehen.

Es konnte mittels isolierter, ventilierter und blutfrei perfundierter Lunge gezeigt werden, dass TRPC3 in der HPV keinen Einfluss nimmt. Die Genexpressionsanalysen von TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 nach 30-minütiger, 1- und 3-stündiger Inkubation von murinen PASMCs in Hypoxie (1% O₂) zeigte eine Herabregulation von TRPC5 in WT Zellen und eine Hochregulation von TRPC1 in TRPC3 knockout (TRPC3^{-/-}) PASMCs.

Unter chronischer Hypoxie (21 Tage, 10% O₂) gehaltene TRPC3^{-/-} Mäuse waren durch einen verringerten RVSP und einer verminderten Muskularisierung in Normoxie und Hypoxie charakterisiert. Dies deutet auf einen partiellen Schutz vor CHPH bei TRPC3^{-/-} Mäusen hin. Unterschiede der Genotypen in Bezug auf die Proliferation von PASMCs, als mögliche Ursache für die verminderte Muskularisierung, konnten nicht nachgewiesen werden.

In der Normoxie konnte in TRPC3^{-/-} Lungenhomogenaten eine Runterregulation von TRPC1 und TRPC6 festgestellt werden, was zur Reduktion des RVSP unter Normoxie

Zusammenfassung

beitragen könnte. Bei der Analyse der Genexpression der verschiedenen TRPC Proteine (außer TRPC2) in PASMC nach 24-, 72- und 120-stündiger hypoxischer Inkubation (1% O₂) konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Allerdings konnte ein Anstieg von TRPC1 in WT und TRPC3^{-/-} PASMCs und TRPC6 in WT PASMCs unter chronischer Hypoxie beobachtet werden.

Es zeigte sich kein Einfluss von TRPC3 auf die Rechts- oder Linksherzhypertrophie. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass TRPC3 in der CHPH relevant sein könnte und ein mögliches therapeutisches Ziel darstellt.

6 Summary

Chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension (CHPH) is a severe disease where patients suffer from exertional dyspnea, chest pain, fatigue and dizziness. The raise in right ventricular systolic pressure (RVSP) causes a dilatation of the right ventricle, which can result in right heart insufficiency and malignant cardiac arrhythmia. CHPH is caused by the remodeling of the pulmonary arteries in hypoxic conditions at high altitude or due to lung diseases, causing alveolar hypoxia. It leads to increased pulmonary arterial pressure (PAP) and pulmonary vascular resistance (PVR). In acute hypoxia the physiological mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) leads to a better perfusion of the superior ventilated areas. This process is physiological and fully reversible. The pathomechanism of the remodeling in CHPH is largely unknown. There is evidence that the increased proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) results in reduced vessel diameter and increased contractility. Both are driven by changes in intracellular calcium concentration. Classical transient receptor potential (TRPC) channels which belong to voltage-independent calcium channels consist of seven types with largely unknown role in CHPH. They can form homo- and heterotetrameric nonspecific cation channels which are selective for calcium and sodium. It was already shown that TRPC6 deficient mice lack HPV in response to acute hypoxia. Furthermore, TRPC1 deficient mice were characterized by a lower increase in RVSP, less remodeling and reduced PASMC proliferation after exposure to chronic hypoxia. This work focuses on the possible role of TRPC3 in HPV and CHPH.

Isolated lung experiments with hypoxic ventilation (1% O₂) for 180 minutes showed no alteration by the loss of TRPC3 on acute and sustained hypoxic response. The gene expression analyzes of TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 and TRPC7 after 30- minutes, 1- and 3- hours incubation in hypoxic conditions (1% O₂) showed a downregulation of TRPC5 in WT but not in TRPC3^{-/-} cells and an upregulation of TRPC1 only in TRPC3^{-/-} PASMCs.

TRPC3-deficient mice kept under chronic hypoxia (21 days, 10% O₂) exhibited a milder RVSP and muscularization in normoxia and hypoxia. TRPC3^{-/-} mice seem to be at least partially protected of CHPH. The analysis of the Proliferation showed no differences between the genotypes as possible cause for the reduced muscularization.

Summary

In TRPC3^{-/-} lunghomogenates a decreased gene expression of TRPC1 and TRPC6 compared to the WT was shown and could influence the RVSP in normoxia.

When analyzing the gene expression of different TRPCs (except of TRPC2) in PASMC under chronic hypoxic conditions (24, 72 and 120 minutes), an increased gene expression of TRPC1 in WT and TRPC3^{-/-} PASMCs and TRPC6 in WT was observed.

Finally, there was no influence of TRPC3 on right or left heart hypertrophy.

In conclusion TRPC3 influences the development of CHPH and might be a potent target in CHPH therapy.

7 Anhang

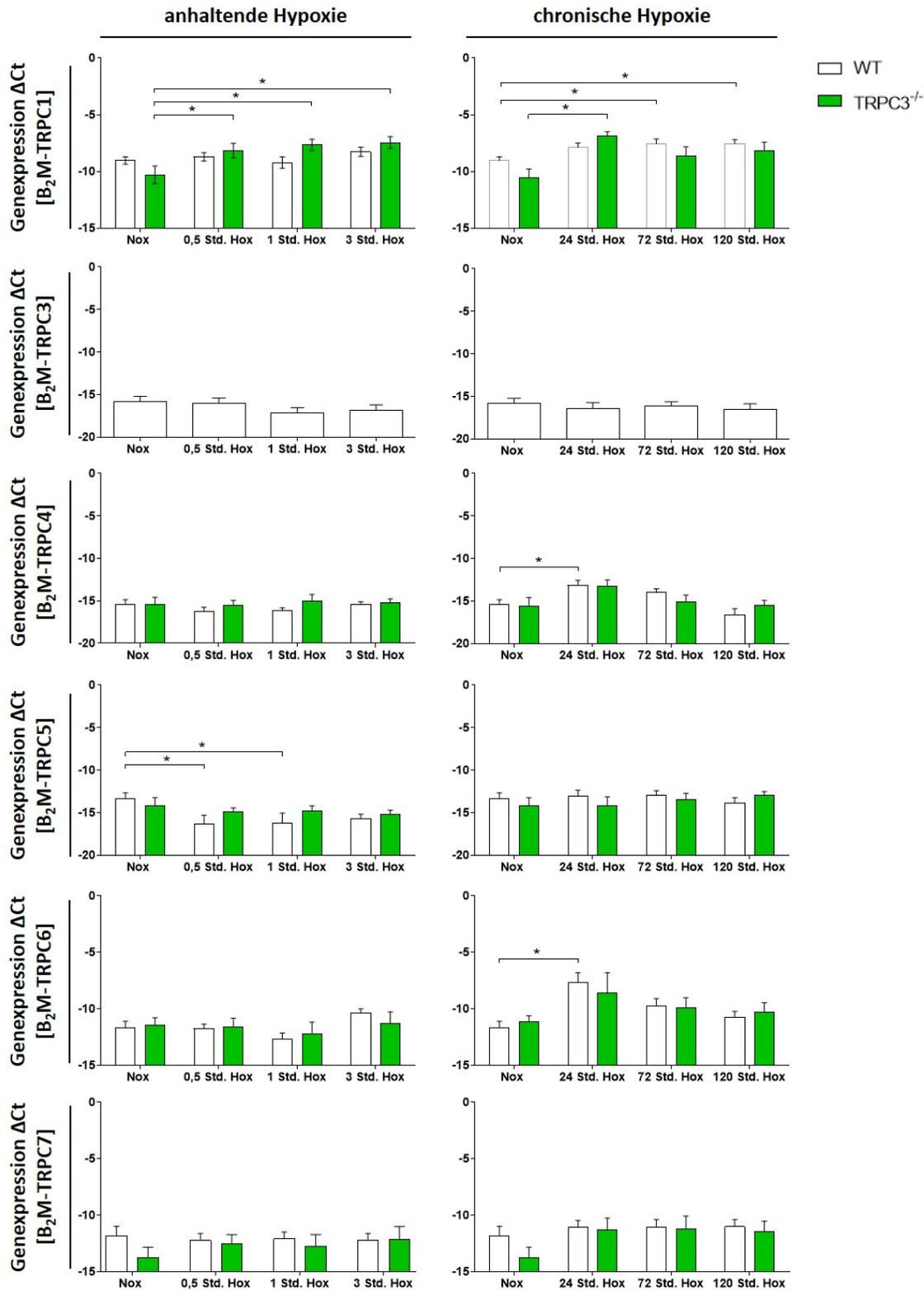


Abbildung 38: TRPC Expression in WT und TRPC3^{-/-} PSMCs unter Normoxie und Hypoxie
 Relative TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 Genexpression nach anhaltender (0,5 Std., 1 Std., 3 Std.) und chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std) Hypoxie (1% O₂) in WT (Nox: n=14-19; Hox: n=10-19) und TRPC3^{-/-} (Nox: n=9-15; Hox: n=7-15) PSMCs. Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05). Std.: Stunde; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Anhang

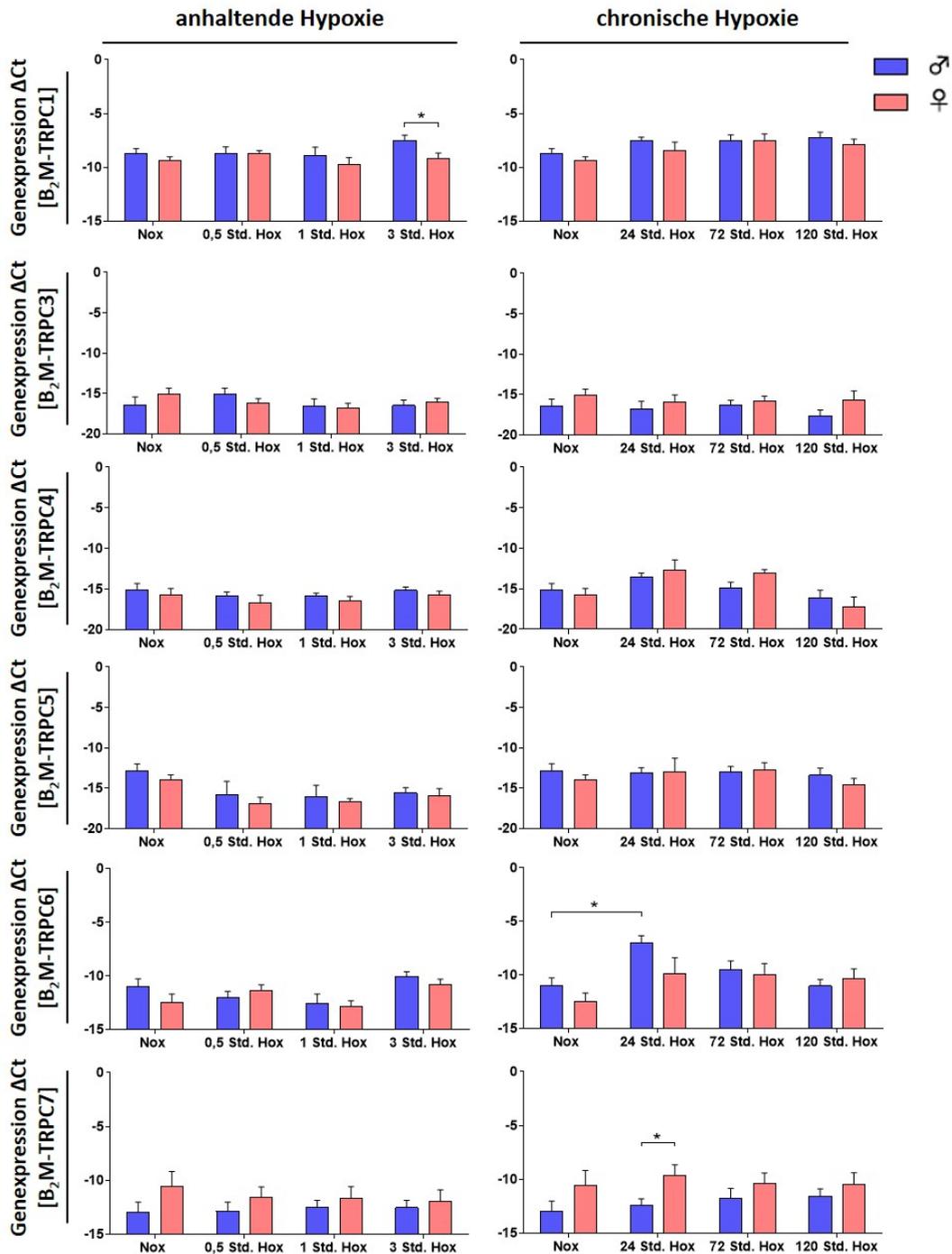


Abbildung 39: TRPC Expression in WT PSMCs in Abhängigkeit des Geschlechts unter Normoxie und Hypoxie

Relative TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 Genexpression nach anhaltender (0,5 Std., 1 Std., 3 Std.) und chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂) in WT Männchen (Nox: n=9-10; Hox: n=7-10) und WT Weibchen (Nox: n=5-9; Hox: n=2-9). Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Anhang

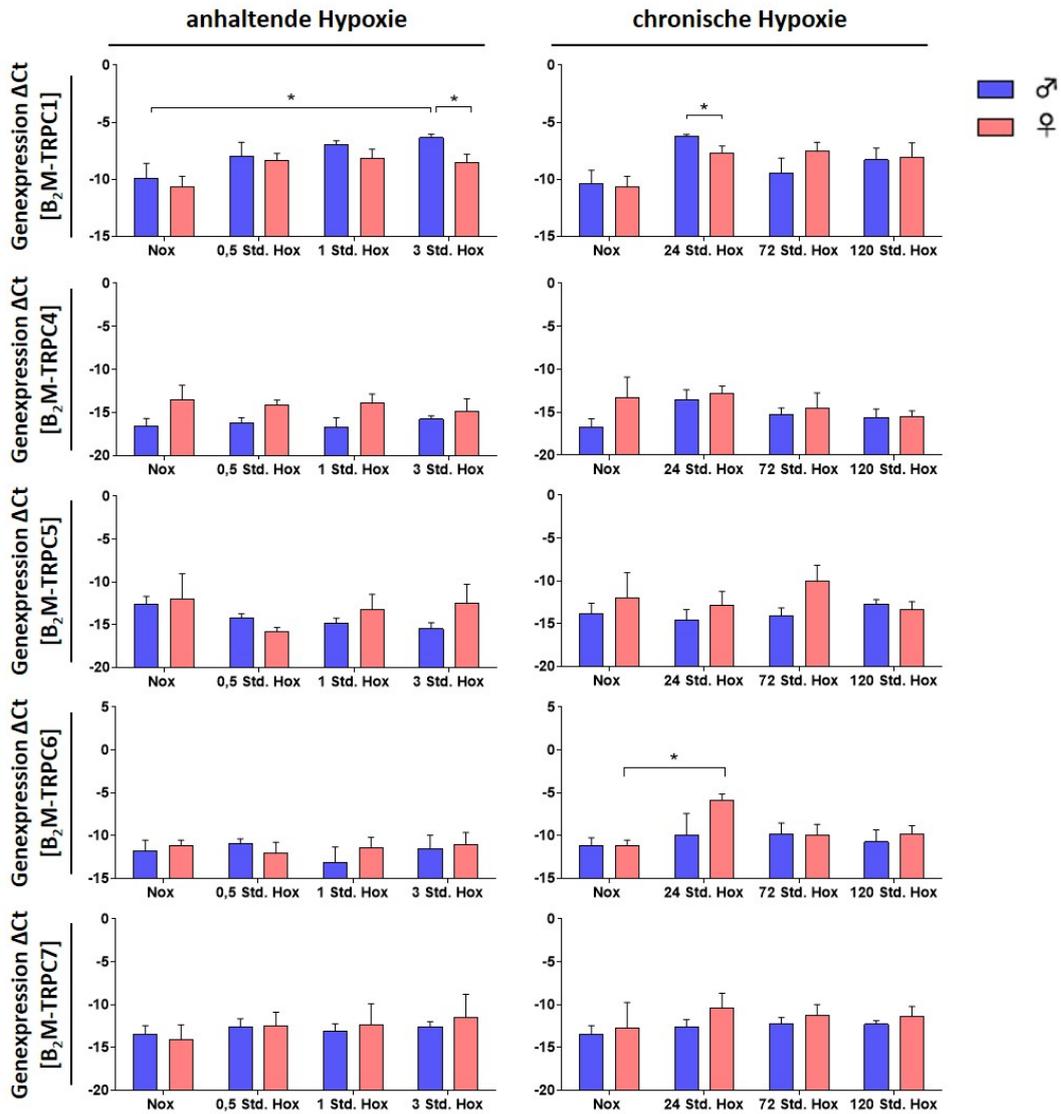


Abbildung 40: TRPC Expression in TRPC3^{-/-} PSMCs in Abhängigkeit des Geschlechts unter Normoxie und Hypoxie

Relative TRPC1, TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 Genexpression nach anhaltender (0,5 Std., 1 Std., 3 Std.) und chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂) in TRPC3^{-/-} Männchen (Nox: n=5-8; Hox: n=3-8) und TRPC3^{-/-} Weibchen (Nox: n=3-7; Hox: n=2-7). Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Anhang

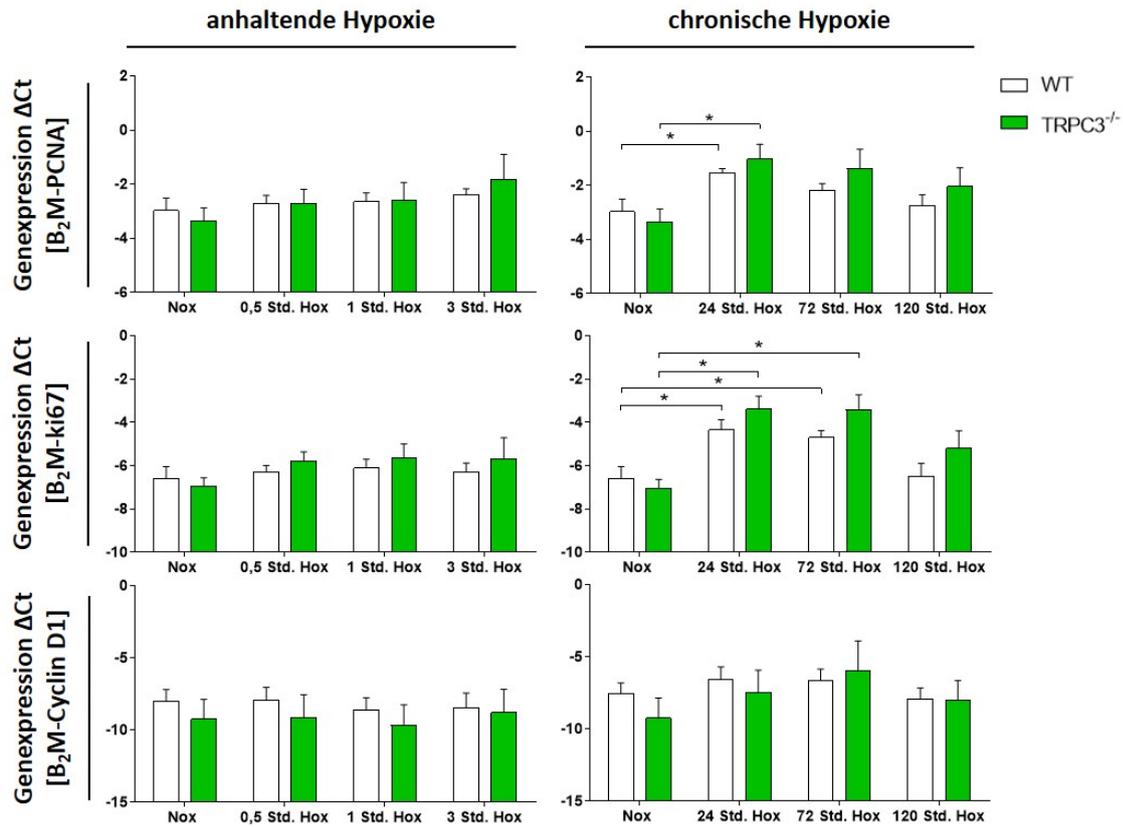


Abbildung 41: Expression von Proliferationsmarkern in WT und TRPC3^{-/-} PSMCs unter Normoxie und Hypoxie

Relative PCNA, ki67 und Cyclin D1 Genexpression nach anhaltender (0,5 Std., 1 Std., 3 Std.) und chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂) in WT (n=17-19) und TRPC3^{-/-} (n=12-14) PSMCs. Signifikanter Unterschied, wenn *(p≤0,05). Std.: Stunde; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

Anhang

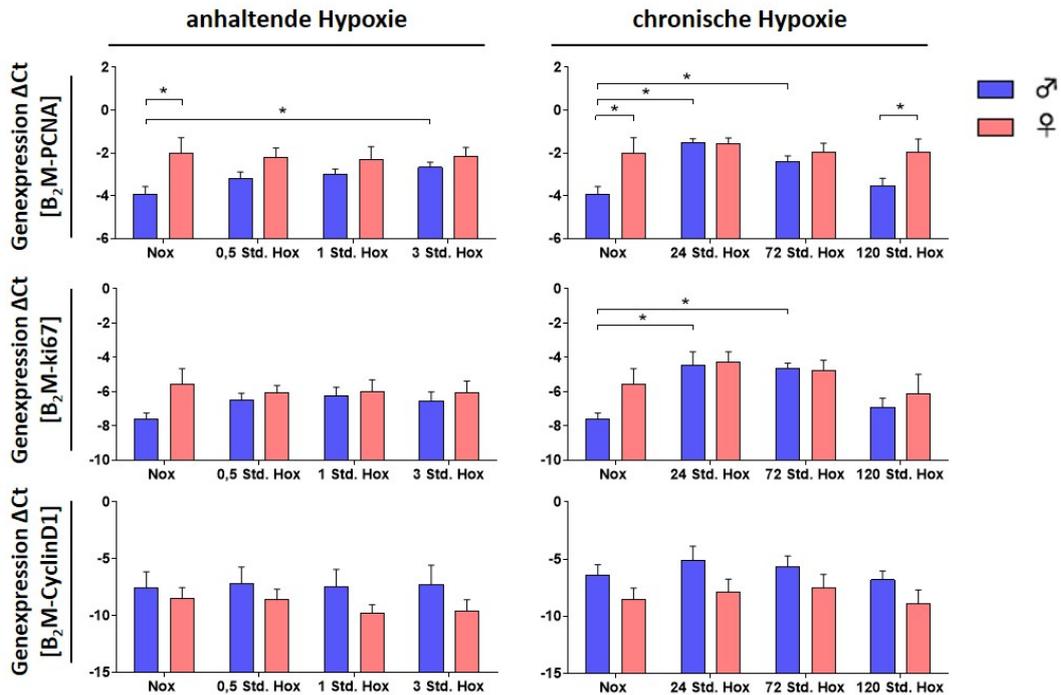


Abbildung 42: Expression von Proliferationsmarkern in WT PASCs in Abhängigkeit des Geschlechts unter Normoxie und Hypoxie

Relative PCNA, ki67 und Cyclin D1 Genexpression nach anhaltender (0,5 Std., 1 Std., 3 Std.) und chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂) in WT Männchen (n=8-10) und WT Weibchen (n=9). Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

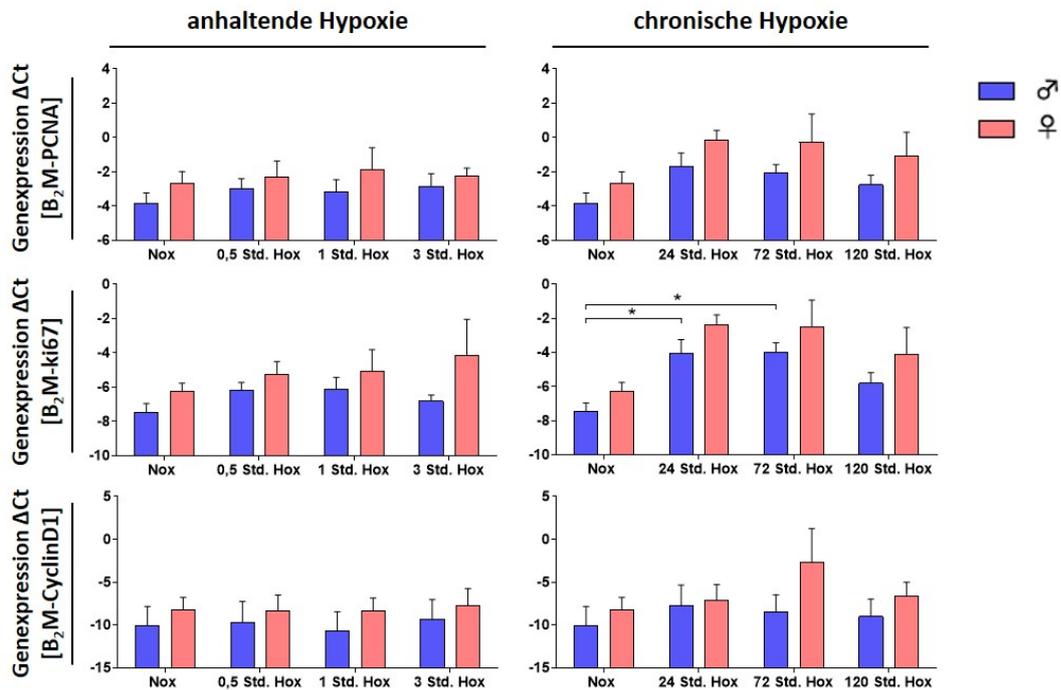


Abbildung 43: Expression von Proliferationsmarkern in TRPC3^{-/-} PASCs in Abhängigkeit des Geschlechts unter Normoxie und Hypoxie

Relative PCNA, ki67 und Cyclin D1 Genexpression nach anhaltender (0,5 Std., 1 Std., 3 Std.) und chronischer (24 Std., 72 Std., 120 Std.) Hypoxie (1% O₂) in TRPC3^{-/-} Männchen (n=6-8) und TRPC3^{-/-} Weibchen (n=5-6). Signifikanter Unterschied, wenn *(p<0,05). Std.: Stunde; ♂: Männchen; ♀: Weibchen; Hox: Hypoxie; Nox: Normoxie.

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
[K ⁺] _i	intrazelluläre Kaliumkonzentration
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Adventitia
AK	Antikörper
An	Ankyrin
APS	Ammonium persulfat
B ₂ M	β ₂ Mikroglobulin
BMPR2	<i>bone morphogenetic protein receptor 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CHPH	chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (<i>chronic hypoxic pulmonary hypertension</i>)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO	Herzzeitvolumen (<i>cardiac output</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COOH	Carboxylgruppe
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
Ct	Schwellenzyklus (<i>cycle treshold</i>)
CTEPH	Chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (<i>chronic thromboembolic pulmonary hypertension</i>)
d. h.	das heißt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin

Abkürzungsverzeichnis

DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DPBS	Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)
dyn	Maßeinheit für Kraft
E	Endothel
EdU	5'Ethynyl-2'desoxyuridine
EKG	Elektrokardiogramm
E _m	Membranpotential
FBS	fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Größe in Gauge
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hox	Hypoxie
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPV	hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HZV	Herz-Zeit-Volumen
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
ILU	Isolierte, ventilierte und blutfrei-perfundierte Lunge
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPF	idiopathische Lungenfibrose
IVC	<i>Individually Ventilated Cages</i>
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
kPa	Kilopascal
LV	linker Ventrikel
LVP	linksventrikulärer Druck (<i>left ventricular systolic pressure</i>)
M	Molar
M	Media
mAmp	Milliampere
mg	Miligramm
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck (<i>mean pulmonary arterial pressure</i>)
MRT	Magnetresonanztomografie
n	Anzahl Einzelexperimente
N	Newton
Na ⁺	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
x H ₂ O	
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₂	Aminogruppe
nm	Nanometer
Nox	Normoxie
NSCC	Nicht-selektiver Kationen-Kanal (<i>non-selective cation channel</i>)
O ₂	Sauerstoff
OD	<i>Optical Density</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
P0, P1	Passage 0, Passage 1

Abkürzungsverzeichnis

PA	Pulmonalarterie
PAEC	pulmonale Endothelzelle (<i>pulmonary arterial endothelia cell</i>)
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck (<i>pulmonary arterial pressure</i>)
PASMC	pulmonal arterielle glatte Muskelzelle (<i>pulmonary arterial smooth muscle cell</i>)
PAWP	pulmonalarterieller Verschlussdruck (<i>pulmonary artery wedge pressure</i>)
PBS	Phosphatpufferlösung (<i>phosphat-buffered saline</i>)
PCNA	<i>proliferating-cell-nuclear-antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	thombozyten-abstammender Wachstumsfaktor (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck (<i>positive end-expiratory pressure</i>)
pH	negative dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PH	Pulmonale Hypertonie
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand (<i>pulmonary vascular resistance</i>)
RHH	Rechtsherzhypertrophie
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleine acid</i>)
RTqPCR	quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (<i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>)
RV	Rechter Ventrikel
RVSP	Rechtsventrikulärer systolischer Druck (<i>right ventricular systolic pressure</i>)
S	Septum
SAP	systemearterieller Druck (<i>systemic arterial pressure</i>)
SMC	glatte Muskelzelle (<i>smooth muscle cell</i>)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Std.	Stunden
T	Transmembrandomäne
TAPSE	<i>tricuspid annular plane systolic excursion</i>

Abkürzungsverzeichnis

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Transienter Rezeptor Potential Protein (<i>transient receptor potential</i>)
TRPA	ankyrin TRP
TRPC	klassischer (<i>classical</i>) TRP
TRPM	melastatin TRP
TRPML	mucolipin TRP
TRPN	kein Mechanorezeptor potential C (<i>no mechanoreceptor potential C</i> , NOMPC) TRP
TRPP	polycystein TRP
TRPV	vanilloid TRP
VC	<i>Vena Cava</i>
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VOCC	spannungsaktivierter Calcium-Kanal (<i>voltage-operated calcium channel</i>)
VP	Ventilationsdruck
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organisation</i>)
WT	Wildtyp
WU	Wood-Einheiten
z. B.	zum Beispiel
Δ	delta, Differenz

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Blutkreislaufs	3
Abbildung 2: Klinische Klassifikation der PH	7
Abbildung 3: Mechanismus der HPV	13
Abbildung 4: Phasen der Vasokonstriktion unter Hypoxie.....	14
Abbildung 5: Ca ²⁺ -Homöostase in chronischer Hypoxie.....	16
Abbildung 6: Struktur von TRPC Kanälen	17
Abbildung 7: Unterteilung der TRP-Superfamilie	18
Abbildung 8: Ablauf der in vivo Versuche	29
Abbildung 9: Lungenspülung nach hämodynamischer Messung	31
Abbildung 10: Histologische Bestimmung des Muskularisierungsgrades eines Gefäßes.....	35
Abbildung 11: ILU Protokoll der verlängerten Hypoxie	36
Abbildung 12: Aufbau der ILU	37
Abbildung 13: Isolierung von murinen PASMCs aus präkapillären Gefäßen	38
Abbildung 14: Schematische Darstellung der hypoxischen Exposition von PASMC für Genexpressionsanalysen.....	40
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Click-iT Reaktion bei der EdU Färbung	42
Abbildung 16: Akute und länger anhaltende Hypoxie in WT und TRPC3 ^{-/-} Lungen.....	45
Abbildung 17: Genexpression von TRPC1 in murinen WT und TRPC3 ^{-/-} PASMCs unter anhaltender Hypoxie	46
Abbildung 18: Genexpression von TRPC3 in murinen WT PASMCs unter anhaltender Hypoxie	47
Abbildung 19: Genexpression von TRPC5 in murinen WT und TRPC3 ^{-/-} PASMCs unter anhaltender Hypoxie	48
Abbildung 20: Einfluss von TRPC3 den SAP	49
Abbildung 21: Einfluss von TRPC3 auf den RVSP.....	51
Abbildung 22: Einfluss von TRPC3 auf den Hämatokrit-Wert	52
Abbildung 23: Einfluss von TRPC3 die Hypoxie-assoziierte Rechtsherzhypertrophie .	53
Abbildung 24: Einfluss von TRPC3 auf das Gewicht des rechten Ventrikels im Verhältnis zur Länge der Tibia.....	54
Abbildung 25: Einfluss von TRPC3 auf das Gewicht des linken Ventrikels inklusive Septum im Verhältnis zur Länge der Tibia	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26: Genexpression von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 in Lungenhomogenaten nach 3-wöchiger Hypoxie.....	56
Abbildung 27: Genexpression von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 in Herzhomogenaten nach 3-wöchiger Hypoxie	57
Abbildung 28: Histologische Untersuchung der Gefäßmuskularisierung mittels Regressionsgeraden.....	58
Abbildung 29: Analyse Gefäßmuskularisierung nach 3-wöchiger Hypoxie	59
Abbildung 30: Genexpression von TRPC1 in murinen WT und TRPC3 ^{-/-} PSMCs unter chronischer Hypoxie	60
Abbildung 31: Genexpression von TRPC3 in murinen WT PSMCs unter chronischer Hypoxie	61
Abbildung 32: Genexpression von TRPC4 in murinen WT und TRPC3 ^{-/-} PSMCs unter chronischer Hypoxie	62
Abbildung 33: Genexpression von TRPC6 in murinen WT und TRPC3 ^{-/-} PSMCs unter chronischer Hypoxie	63
Abbildung 34: Western Blot Analyse zur Detektion von TRPC3	64
Abbildung 35: Genexpression von PCNA in murinen WT und TRPC3 ^{-/-} PSMCs unter chronischer Hypoxie	65
Abbildung 36: Genexpression von ki67 in murinen WT und TRPC3 ^{-/-} PSMCs unter chronischer Hypoxie	66
Abbildung 37: Proliferation von PSMCs von WT und TRPC3 ^{-/-} Mäusen unter Hypoxie	67
Abbildung 38: TRPC Expression in WT und TRPC3 ^{-/-} PSMCs unter Normoxie und Hypoxie	84
Abbildung 39: TRPC Expression in WT PSMCs in Abhängigkeit des Geschlechts unter Normoxie und Hypoxie.....	85
Abbildung 40: TRPC Expression in TRPC3 ^{-/-} PSMCs in Abhängigkeit des Geschlechts unter Normoxie und Hypoxie	86
Abbildung 41: Expression von Proliferationsmarkern in WT und TRPC3 ^{-/-} PSMCs unter Normoxie und Hypoxie.....	87
Abbildung 42: Expression von Proliferationsmarkern in WT PSMCs in Abhängigkeit des Geschlechts unter Normoxie und Hypoxie	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 43: Expression von Proliferationsmarkern in TRPC3 ^{-/-} PSMCs in Abhängigkeit des Geschlechts unter Normoxie und Hypoxie	88
--	----

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Einteilung der Schweregrade der PH.....	6
Tabelle 2: Färbung mit α -Aktin.....	33
Tabelle 3: Färbung mit von-Willebrand-Faktor	34
Tabelle 4: Ablauf der cDNA Synthese.....	41
Tabelle 5: Reaktionsprotokoll der RTqPCR	41
Tabelle 6: Standard zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe	43

11 Formelverzeichnis

Formel 1: Fulton-Index als Maß für die RHH.....	32
Formel 2: Formel zur Berechnung der Ct-Werte	41

12 Literatur

1. Aaronson PI, Robertson TP, Ward JPT (2002): Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir Physiol Neurobiol* 132(1): 107–120
2. Aaronson PI, Robertson TP, Knock GA, Becker S, Lewis TH, Snetkov V, Ward JPT (2006): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. Mechanisms and controversies. *J Physiol (Lond)* 570(Pt 1): 53–58
3. Adapala RK, Thoppil RJ, Luther DJ, Paruchuri S, Meszaros JG, Chilian WM, Thodeti CK (2013): TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals. *J Mol Cell Cardiol* 54: 45–52
4. Aldred MA, Vijayakrishnan J, James V, Soubrier F, Gomez-Sanchez MA, Martensson G et al (2006): BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat* 27(2): 212–213
5. Archer SL, Weir EK, Wilkins MR (2010): Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians. New concepts and experimental therapies. *Circulation* 121(18): 2045–2066
6. Asghar MY, Törnquist K (2020): Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels as Modulators of Migration and Invasion. *Int J Mol Sci* 21(5)
7. Aumüller G (2007): Anatomie, 2. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
8. Bächli E, Bassetti S, Battegay M, Bauerfeind P (2017): Differenzialdiagnose Innerer Krankheiten, 21. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
9. Badesch DB, Orton EC, Zapp LM, Westcott JY, Hester J, Voelkel NF, Stenmark KR (1989): Decreased arterial wall prostaglandin production in neonatal calves with severe chronic pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1(6): 489–498
10. Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, Krichman AM, Farber HW, Frost AE et al (2010): Pulmonary arterial hypertension. Baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* 137(2): 376–387
11. Battegay E (2013): Siegenthalers Differenzialdiagnose, 20. Aufl. Thieme, Stuttgart
12. Behrends JC ((c) 2017): Physiologie, 3. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
13. Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE (2004): Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 6(8): 709–720

Literaturverzeichnis

14. Bigna JJR, Sime PSD, Koulla-Shiro S (2015): HIV related pulmonary arterial hypertension. *Epidemiology in Africa, physiopathology, and role of antiretroviral treatment*. *AIDS Res Ther* 12: 36
15. Bogatcheva NV, Garcia JGN, Verin AD (2002): Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry Mosc* 67(1): 75–84
16. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, Smet P de et al (2001): Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* 12(1): 3–10
17. Bourguignon LY, Chu A, Jin H, Brandt NR (1995): Ryanodine receptor-ankyrin interaction regulates internal Ca²⁺ release in mouse T-lymphoma cells. *J Biol Chem* 270(30): 17917–17922
18. Brenner JS, Dolmetsch RE (2007): TrpC3 regulates hypertrophy-associated gene expression without affecting myocyte beating or cell size. *Plos One* 2(8): 802
19. Bush EW, Hood DB, Papst PJ, Chapo JA, Minobe W, Bristow MR, Olson EN, McKinsey TA (2006): Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J Biol Chem* 281(44): 33487–33496
20. Chang H-H, Cheng Y-C, Tsai W-C, Tsao M-J, Chen Y (2018): Pyr3 Induces Apoptosis and Inhibits Migration in Human Glioblastoma Cells. *Cell Physiol Biochem* 48(4): 1694–1702
21. Chen YF, Oparil S (2000): Endothelin and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 35(4 Suppl 2): 49-53
22. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001): The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2(6): 387–396
23. Clapham DE (2007): Calcium signaling. *Cell* 131(6): 1047–1058
24. Cleva R de, Herman P, Pugliese V, Zilberstein B, Saad WA, Rodrigues JJG, Laudanna AA (2003): Prevalence of pulmonary hypertension in patients with hepatosplenic Mansonic schistosomiasis-prospective study. *Hepatogastroenterology* 50(54): 2028–2030
25. Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, Prince MA, Robbins IM, Hedges LK et al (2006): High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 174(5): 590–598

Literaturverzeichnis

26. Coppock EA, Martens JR, Tamkun MM (2001): Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. Role of voltage-gated K⁺ channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(1): 1-12
27. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT (1991): Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 115(5): 343–349
28. Diermeier-Daucher S, Clarke ST, Hill D, Vollmann-Zwerenz A, Bradford JA, Brockhoff G (2009): Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry. *Cytometry A* 75(6): 535–546
29. Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G et al (2005): Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 25(16): 6980–6989
30. Dietrich A, Chubanov V, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T (2006): Cation channels of the transient receptor potential superfamily. Their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacol Ther* 112(3): 744–760
31. Dietrich A, Kalwa H, Fuchs B, Grimminger F, Weissmann N, Gudermann T (2007): In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium* 42(2): 233–244
32. dos Santos Fernandes CJC, Jardim CVP, Hovnanian A, Hoette S, Dias BA, Souza S, Humbert M, Souza R (2010): Survival in schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 56(9): 715–720
33. Dumas M, Papademetriou V, Faselis C, Kokkinos P (2013): Gender differences in hypertension. Myths and reality. *Curr Hypertens Rep* 15(4): 321–330
34. Duffels MGJ, Engelfriet PM, Berger RMF, van Loon RLE, Hoendermis E, Vriend JWJ, van der Velde ET, Bresser P, Mulder BJM (2007): Pulmonary arterial hypertension in congenital heart disease. An epidemiologic perspective from a Dutch registry. *Int J Cardiol* 120(2): 198–204
35. Dumas JP, Bardou M, Goirand F, Dumas M (1999): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Gen Pharmacol* 33(4): 289–297

Literaturverzeichnis

36. Dunham-Snary KJ, Wu D, Sykes EA, Thakrar A, Parlow LRG, Mewburn JD, Parlow JL, Archer SL (2017): Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. From Molecular Mechanisms to Medicine. *Chest* 151(1): 181–192
37. Duong HT, Erzurum SC, Asosingh K (2011): Pro-angiogenic hematopoietic progenitor cells and endothelial colony-forming cells in pathological angiogenesis of bronchial and pulmonary circulation. *Angiogenesis* 14(4): 411–422
38. Earley S, Brayden JE (2015): Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev* 95(2): 645–690
39. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A-M, Dewachter L, Fadel E, Dartevielle P et al (2006): Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension. Critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 113(15): 1857–1864
40. Engelfriet PM, Duffels MGJ, Möller T, Boersma E, Tijssen JGP, Thaulow E, Gatzoulis MA, Mulder BJM (2007): Pulmonary arterial hypertension in adults born with a heart septal defect. The Euro Heart Survey on adult congenital heart disease. *Heart* 93(6): 682–687
41. Euler USv, Liljestrand G (1946): Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat. *Acta Physiologica Scandinavica* 12(4): 301–320
42. Faller DV (1999): Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(1): 74–84
43. Fedullo PF, Auger WR, Kerr KM, Rubin LJ (2001): Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 345(20): 1465–1472
44. Firth AL, Remillard CV, Yuan JX-J (2007): TRP channels in hypertension. *Biochim Biophys Acta* 1772(8): 895–906
45. Fischer MJM, Balasuriya D, Jeggle P, Goetze TA, McNaughton PA, Reeh PW, Edwardson JM (2014): Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. *Pflugers Arch* 466(12): 2229–2241
46. Fourie PR, Coetzee AR, Bolliger CT (1992): Pulmonary artery compliance. Its role in right ventricular-arterial coupling. *Cardiovasc Res* 26(9): 839–844
47. Freichel M, Vennekens R, Olausson J, Hoffmann M, Müller C, Stolz S, Scheunemann J, Weissgerber P, Flockerzi V (2004): Functional role of TRPC proteins in vivo. Lessons from TRPC-deficient mouse models. *Biochem Biophys Res Commun* 322(4): 1352–1358

Literaturverzeichnis

48. Fuchs B, Dietrich A, Gudermann T, Kalwa H, Grimminger F, Weissmann N (2010): The role of classical transient receptor potential channels in the regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Adv Exp Med Biol* 661: 187–200
49. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A et al (2016): 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 69(2): 177
50. Galiè N, McLaughlin VV, Rubin LJ, Simonneau G (2019): An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. *Eur Respir J* 53(1)
51. Garcia RL, Schilling WP (1997): Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 239(1): 279–283
52. Guibert C, Marthan R, Savineau J-P (2007): Modulation of Ion Channels in Pulmonary Arterial Hypertension. *CPD* 13(24): 2443–2455
53. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J et al (2005): Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. A French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum* 52(12): 3792–3800
54. Hadengue A, Benhayoun MK, Lebrec D, Benhamou J-P (1991): Pulmonary hypertension complicating portal hypertension. Prevalence and relation to splanchnic hemodynamics. *Gastroenterology* 100(2): 520–528
55. Hartmann J, Dragicevic E, Adelsberger H, Henning HA, Sumser M, Abramowitz J et al (2008): TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* 59(3): 392–398
56. Heath D, Smith P, Rios Dalenz J, Williams D, Harris P (1981): Small pulmonary arteries in some natives of La Paz, Bolivia. *Thorax* 36(8): 599–604
57. Heath D, Williams D, Rios-Dalenz J, Calderon M, Gosney J (1990): Small pulmonary arterial vessels of Aymara Indians from the Bolivian Andes. *Histopathology* 16(6): 565–571
58. Heng BC, Bezerra PP, Preiser PR, Law SKA, Xia Y, Boey F, Venkatraman SS (2011): Effect of cell-seeding density on the proliferation and gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells within ex vivo culture. *Cytotherapy* 13(5): 606–617

Literaturverzeichnis

59. Herget J, Wilhelm J, Novotná J, Eckhardt A, Vytásek R, Mrázková L, Ostádal M (2000): A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res* 49(5): 493–501
60. Hester J, Ventetuolo C, Lahm T (2019): Sex, Gender, and Sex Hormones in Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure. *Compr Physiol* 10(1): 125–170
61. Hoeper MM, Ghofrani HA, Gorenflo M, Grünig E, Rosenkranz S, Schranz D (2010): Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie. *Kardiologie* 4(3): 189–207
62. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M et al (2013): Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62(25 Suppl): 42-50
63. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999): Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397(6716): 259–263
64. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002): Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(11): 7461–7466
65. Hotta Y, Benzer S (1969): Abnormal Electroretinograms in Visual Mutants of *Drosophila*. *Nature* 222(5191): 354–356
66. Huang D, Cheng Y-Y, Chan P-H, Hai J, Yiu K-H, Tse H-F et al (2018): Rationale and design of the screening of pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus (Sophie) study. *ERJ Open Res* 4(1)
67. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM et al (2004): Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43(12 Suppl S): 13-24
68. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V et al (2006): Pulmonary arterial hypertension in France. Results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 173(9): 1023–1030
69. Humbert M, Yaici A, Groote P de, Montani D, Sitbon O, Launay D et al (2011): Screening for pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis. Clinical characteristics at diagnosis and long-term survival. *Arthritis Rheum* 63(11): 3522–3530

Literaturverzeichnis

70. Hunter KS, Lammers SR, Shandas R (2011): Pulmonary vascular stiffness. Measurement, modeling, and implications in normal and hypertensive pulmonary circulations. *Compr Physiol* 1(3): 1413–1435
71. Iatropoulos MJ, Williams GM (1996): Proliferation markers. *Experimental and Toxicologic Pathology* 48(2-3): 175–181
72. Jacobs W, van de Veerdonk MC, Trip P, Man F de, Heymans MW, Marcus JT, Kawut SM, Bogaard H-J, Boonstra A, Vonk Noordegraaf A (2014): The right ventricle explains sex differences in survival in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Chest* 145(6): 1230–1236
73. Jeffery TK, Wanstall JC (2001): Pulmonary vascular remodeling. A target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 92(1): 1–20
74. Jiang H-N, Zeng B, Zhang Y, Daskoulidou N, Fan H, Qu J-M, Xu S-Z (2013): Involvement of TRPC channels in lung cancer cell differentiation and the correlation analysis in human non-small cell lung cancer. *Plos one* 8(6): e67637
75. Kay BK, Williamson MP, Sudol M (2000): The importance of being proline. The interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* 14(2): 231–241
76. Khanna D, Gladue H, Channick R, Chung L, Distler O, Furst DE et al (2013): Recommendations for screening and detection of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum* 65(12): 3194–3201
77. Kim J-M, Heo K, Choi J, Kim K, An W (2013): The histone variant MacroH2A regulates Ca(2+) influx through TRPC3 and TRPC6 channels. *Oncogenesis* 2: 77
78. Kim NH, Delcroix M, Jenkins DP, Channick R, Darteville P, Jansa P et al (2013): Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62(25 Suppl): 92-99
79. Kim NHS (2006): Assessment of operability in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 3(7): 584–588
80. Kim DS, Lee MW, Ko YJ, Chun YH, Kim HJ, Sung KW, Koo HH, Yoo KH (2016): Cell culture density affects the proliferation activity of human adipose tissue stem cells. *Cell Biochem Funct* 34(1): 16–24
81. Kitajima N, Numaga-Tomita T, Watanabe M, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K et al (2016): TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. *Sci Rep* 6: 37001

Literaturverzeichnis

82. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y et al (2009): Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(13): 5400–5405
83. Kizub IV, Strielkov IV, Shaifta Y, Becker S, Prieto-Lloret J, Snetkov VA, Soloviev AI, Aaronson PI, Ward JPT (2013): Gap junctions support the sustained phase of hypoxic pulmonary vasoconstriction by facilitating calcium sensitization. *Cardiovasc Res* 99(3): 404–411
84. Klinker R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Baumann R, Brenner B, Gay R, Rothenburger A (Hrsg) (2010): *Physiologie*, 6. Aufl. Thieme, Stuttgart
85. Kourembanas S, Bernfield M (1994): Hypoxia and endothelial-smooth muscle cell interactions in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11(4): 373–374
86. Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, Olson EN (2006): TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest* 116(12): 3114–3126
87. Kwapiszewska G, Hoffmann J, Kovacs G, Stacher E, Olschewski A, Olschewski H (2016): Pulmonal (arterielle) Hypertonie. *Pneumologie* 70(10): 630–637
88. Lai Y-C, Potoka KC, Champion HC, Mora AL, Gladwin MT (2014): Pulmonary arterial hypertension. The clinical syndrome. *Circ Res* 115(1): 115–130
89. Lang IM (2004): Chronic thromboembolic pulmonary hypertension--not so rare after all. *N Engl J Med* 350(22): 2236–2238
90. Lapa MS, Ferreira EVM, Jardim C, Martins BdCdS, Arakaki JSO, Souza R (2006): Características clínicas dos pacientes com hipertensão pulmonar em dois centros de referência em São Paulo. *Rev Assoc Med Bras* (1992) 52(3): 139–143
91. Leach RM, Robertson TP, Twort CH, Ward JP (1994): Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 266(3 Pt 1): 223-231
92. Li S, Jiang K, Li J, Hao X, Chu W, Luo C, Zhu Y, Xie R, Chen B (2020): Estrogen enhances the proliferation and migration of ovarian cancer cells by activating transient receptor potential channel C3. *J Ovarian Res* 13(1): 20
93. Lin M-J, Leung GPH, Zhang W-M, Yang X-R, Yip K-P, Tse C-M, Sham JSK (2004): Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. A novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 95(5): 496–505

Literaturverzeichnis

94. Liu Q, Sham JS, Shimoda LA, Sylvester JT (2001): Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries. Endothelium and endothelin dependence. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(5): 856-865
95. Liu D, Yang D, He H, Chen X, Cao T, Feng X et al (2009): Increased transient receptor potential canonical type 3 channels in vasculature from hypertensive rats. *Hypertension* 53(1): 70–76
96. Liu DY, Thilo F, Scholze A, Wittstock A, Zhao ZG, Harteneck C, Zidek W, Zhu ZM, Tepel M (2007): Increased store-operated and 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol-induced calcium influx in monocytes is mediated by transient receptor potential canonical channels in human essential hypertension. *J Hypertens* 25(4): 799–808
97. Loga F, Domes K, Freichel M, Flockerzi V, Dietrich A, Birnbaumer L, Hofmann F, Wegener JW (2013): The role of cGMP/cGKI signalling and Trpc channels in regulation of vascular tone. *Cardiovasc Res* 100(2): 280–287
98. Lowe BS, Therrien J, Ionescu-Ittu R, Pilote L, Martucci G, Marelli AJ (2011): Diagnosis of pulmonary hypertension in the congenital heart disease adult population impact on outcomes. *J Am Coll Cardiol* 58(5): 538–546
99. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F (2012): Taschenlehrbuch Histologie, 4. Aufl. Thieme, Stuttgart
100. Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE et al (2009): Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl): 32-42
101. Maier T, Follmann M, Hessler G, Kleemann H-W, Hachtel S, Fuchs B et al (2015): Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels. *Br J Pharmacol* 172(14): 3650–3660
102. Malczyk M (2017): Die Rolle von TRPC-Kanälen in der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in der Maus. Dissertation, Justus-Liebig-Universität
103. Malczyk M, Veith C, Fuchs B, Hofmann K, Storch U, Schermuly RT et al (2013): Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 188(12): 1451–1459

Literaturverzeichnis

104. Malczyk M, Veith C, Schermuly RT, Gudermann T, Dietrich A, Sommer N, Weissmann N, Pak O (2016): NADPH oxidases-do they play a role in TRPC regulation under hypoxia? *Pflugers Arch* 468(1): 23–41
105. Malczyk M, Erb A, Veith C, Ghofrani HA, Schermuly RT, Gudermann T, Dietrich A, Weissmann N, Sydykov A (2017): The Role of Transient Receptor Potential Channel 6 Channels in the Pulmonary Vasculature. *Front Immunol* 8: 707
106. Mandegar M, Fung Y-CB, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX-J (2004): Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. Role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res* 68(2): 75–103
107. Meyrick B, Reid L (1980): Endothelial and subintimal changes in rat hilar pulmonary artery during recovery from hypoxia. A quantitative ultrastructural study. *Lab Invest* 42(6): 603–615
108. Michaely P, Bennett V (1993): The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats. *J Biol Chem* 268(30): 22703–22709
109. Minke B, Cook B (2002): TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82(2): 429–472
110. Montani D, Günther S, Dorfmueller P, Perros F, Girerd B, Garcia G et al (2013): Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis* 8: 97
111. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V (2002): The TRP Channels, a Remarkably Functional Family. *Cell* 108(5): 595–598
112. Moraes DL, Colucci WS, Givertz MM (2000): Secondary pulmonary hypertension in chronic heart failure. The role of the endothelium in pathophysiology and management. *Circulation* 102(14): 1718–1723
113. Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR et al (2009): Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl): 20-31
114. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL (2005): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 98(1): 390–403
115. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL (2006): The role of k⁺ channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis. Implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension. *Microcirculation* 13(8): 615–632

Literaturverzeichnis

116. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, Black CM, Coghlan JG (2003): Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. Application of a registry approach. *Ann Rheum Dis* 62(11): 1088–1093
117. Murray TR, Chen L, Marshall BE, Macarak EJ (1990): Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3(5): 457–465
118. Nakayama H, Wilkin BJ, Bodi I, Molkentin JD (2006): Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *Faseb J* 20(10): 1660–1670
119. Ng LC, Wilson SM, Hume JR (2005): Mobilization of sarcoplasmic reticulum stores by hypoxia leads to consequent activation of capacitative Ca^{2+} entry in isolated canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Physiol (Lond)* 563(Pt 2): 409–419
120. Nilius B, Owsianik G (2010): Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Arch* 460(2): 437–450
121. Noorani MMZ, Noel RC, Marrelli SP (2011): Upregulated TRPC3 and Downregulated TRPC1 Channel Expression during Hypertension is Associated with Increased Vascular Contractility in Rat. *Front Physiol* 2: 42
122. Oda K, Umemura M, Nakakaji R, Tanaka R, Sato I, Nagasako A et al (2017): Transient receptor potential cation 3 channel regulates melanoma proliferation and migration. *J Physiol Sci* 67(4): 497–505
123. Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Takahashi Y, Iino K, Kuromitsu S, Mori Y, Ono K, Iijima T, Ito H (2007): Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 42(3): 498–507
124. Olschewski A, Hong Z, Nelson DP, Weir EK (2002): Graded response of K^{+} current, membrane potential, and Ca^{2+} to hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(5): 1143-1150
125. Olschewski A, Papp R, Nagaraj C, Olschewski H (2014): Ion channels and transporters as therapeutic targets in the pulmonary circulation. *Pharmacol Ther* 144(3): 349–368
126. Opravil M, Pechère M, Speich R, Joller-Jemelka HI, Jenni R, Russi EW, Hirschel B, Lüthy R (1997): HIV-associated primary pulmonary hypertension. A case

Literaturverzeichnis

- control study. Swiss HIV Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* 155(3): 990–995
127. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJV, Caballero L, Stewart S (2007): An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 30(1): 104–109
128. Phillips AM, Bull A, Kelly LE (1992): Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8(4): 631–642
129. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tuder RM (2004): Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43(12 Suppl S): 25-32
130. Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, Limsuwan A, Krick S, Juhaszova M, Seiden JE, Rubin LJ, Yuan JX (2000): Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol , Cell Physiol* 279(5): 1540-1549
131. Preston IR, Hill NS, Warburton RR, Fanburg BL (2006): Role of 12-lipoxygenase in hypoxia-induced rat pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(2): 367-374
132. Pugliese SC, Poth JM, Fini MA, Olschewski A, El Kasmi KC, Stenmark KR (2015): The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension. From cellular mechanisms to clinical phenotypes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308(3): 229-252
133. Rabinovitch M (2008): Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 118(7): 2372–2379
134. Rabinovitch M (2012): Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 122(12): 4306–4313
135. Reading SA, Earley S, Waldron BJ, Welsh DG, Brayden JE (2005): TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5): 2055-2061
136. Remillard CV, Yuan JX-J (2005): High Altitude Pulmonary Hypertension. Role of K⁺ and Ca²⁺ Channels. *High Altitude Medicine & Biology* 6(2): 133–146
137. Remillard CV, Yuan JX-J (2006): TRP channels, CCE, and the pulmonary vascular smooth muscle. *Microcirculation* 13(8): 671–692

Literaturverzeichnis

- 138.Rohács T, Lopes CMB, Michailidis I, Logothetis DE (2005): PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8(5): 626–634
- 139.Rosado JA (2016): *Calcium Entry Pathways in Non-excitabile Cells*. Springer International Publishing, Cham
- 140.Rounds S, Hill NS (1984): Pulmonary Hypertensive Diseases. *Chest* 85(3): 397–405
- 141.Rubin LJ (1997): Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 336(2): 111–117
- 142.Runo JR, Loyd JE (2003): Primary pulmonary hypertension. *The Lancet* 361(9368): 1533–1544
- 143.Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF (2009): Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension. Apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respir Res* 10: 95
- 144.Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F (2011): Mechanisms of disease. Pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 8(8): 443–455
- 145.Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M et al (2005): Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 115(10): 2811–2821
- 146.Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2011): *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*, 3. Aufl. Prometheus. Thieme, Stuttgart
- 147.Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2012): *Innere Organe*, 3. Aufl. Prometheus. Thieme, Stuttgart
- 148.Seeger W, Adir Y, Barberà JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V et al (2013): Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *J Am Coll Cardiol* 62(25 Suppl): 109-116
- 149.Seo K, Rainer PP, Shalkey Hahn V, Lee D-I, Jo S-H, Andersen A et al (2014): Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(4): 1551–1556
- 150.Seth M, Zhang Z-S, Mao L, Graham V, Burch J, Stiber J et al (2009): TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circ Res* 105(10): 1023–1030

Literaturverzeichnis

151. Sheikh AQ, Lighthouse JK, Greif DM (2014): Recapitulation of developing artery muscularization in pulmonary hypertension. *Cell Rep* 6(5): 809–817
152. Shimoda LA, Laurie SS (2014): HIF and pulmonary vascular responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 116(7): 867–874
153. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A et al (2013): Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62(25 Suppl): 34-41
154. Sitbon O, Lascoux-Combe C, Delfraissy J-F, Yeni PG, Raffi F, Zuttere D de, Gressin V, Clerson P, Sereni D, Simonneau G (2008): Prevalence of HIV-related pulmonary arterial hypertension in the current antiretroviral therapy era. *Am J Respir Crit Care Med* 177(1): 108–113
155. Smith P, Heath D (1979): Electron microscopy of the plexiform lesion. *Thorax* 34(2): 177–186
156. Smith P, Heath D, Yacoub M, Madden B, Caslin A, Gosney J (1990): The ultrastructure of plexogenic pulmonary arteriopathy. *J Pathol* 160(2): 111–121
157. Smith KA, Ayon RJ, Tang H, Makino A, Yuan JX-J (2016): Calcium-Sensing Receptor Regulates Cytosolic Ca²⁺ and Plays a Major Role in the Development of Pulmonary Hypertension. *Front Physiol* 7: 517
158. Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Gudermann T, Schulz R, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N (2008): Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. Basic mechanisms. *Eur Respir J* 32(6): 1639–1651
159. Sommer N, Richter MJ, Tello K, Grimminger F, Seeger W, Ghofrani HA, Gall H (2017): Update pulmonalerterielle Hypertonie. Definitionen, Diagnose, Therapie. *Internist (Berl)* 58(9): 937–957
160. Stenmark KR, Gerasimovskaya E, Nemenoff RA, Das M (2002): Hypoxic Activation of Adventitial Fibroblasts*. *Chest* 122(6): 326-334
161. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG (2006): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. Cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* 99(7): 675–691
162. Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M (2006): Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)* 21: 134–145
163. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF (2009): Animal models of pulmonary arterial hypertension. The hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(6): 1013-1032

Literaturverzeichnis

164. Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, Riddle SR, Frid MG (2013): The adventitia. Essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol* 75: 23–47
165. Storck H, Hild B, Schimmelpfennig S, Sargin S, Nielsen N, Zaccagnino A, Budde T, Novak I, Kalthoff H, Schwab A (2017): Ion channels in control of pancreatic stellate cell migration. *Oncotarget* 8(1): 769–784
166. Stroud RC, Rahn H (1952): Effect of O₂ and CO₂ Tensions Upon the Resistance of Pulmonary Blood Vessels. *Am J Physiol* 172(1): 211–220
167. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JPT (2012): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* 92(1): 367–520
168. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL (2018): Pulmonary arterial hypertension. Pathogenesis and clinical management. *BMJ* 360: 5492
169. Thorneloe KS, Cheung M, Bao W, Alsaïd H, Lenhard S, Jian M-Y et al (2012): An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure. *Sci Transl Med* 4(159): 148
170. Tiapko O, Groschner K (2018): TRPC3 as a Target of Novel Therapeutic Interventions. *Cells* 7(7)
171. Tozzi CA, Christiansen DL, Poiani GJ, Riley DJ (1994): Excess collagen in hypertensive pulmonary arteries decreases vascular distensibility. *Am J Respir Crit Care Med* 149(5): 1317–1326
172. Tuder RM, Cool CD, Yeager M, Taraseviciene-Stewart L, Bull TM, Voelkel NF (2001): The pathobiology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 22(3): 405–418
173. Tuder RM, Marecki JC, Richter A, Fijalkowska I, Flores S (2007): Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 28(1): 23–42
174. Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Morrell NW (2013): Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62(25 Suppl): 4–12
175. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airò P, Cozzi F, Carreira PE et al (2010): Causes and risk factors for death in systemic sclerosis. A study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (Eustar) database. *Ann Rheum Dis* 69(10): 1809–1815

Literaturverzeichnis

176. Urban N, Hill K, Wang L, Kuebler WM, Schaefer M (2012): Novel pharmacological TRPC inhibitors block hypoxia-induced vasoconstriction. *Cell Calcium* 51(2): 194–206
177. Vachiéry J-L, Adir Y, Barberà JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V et al (2013): Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *J Am Coll Cardiol* 62(25 Suppl): 100-108
178. van de Veerdonk MC, Kind T, Marcus JT, Mauritz G-J, Heymans MW, Bogaard H-J, Boonstra A, Marques KMJ, Westerhof N, Vonk-Noordegraaf A (2011): Progressive right ventricular dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension responding to therapy. *J Am Coll Cardiol* 58(24): 2511–2519
179. Vassort G, Alvarez J (2009): Transient receptor potential. A large family of new channels of which several are involved in cardiac arrhythmia. *Can J Physiol Pharmacol* 87(2): 100–107
180. Veit F, Pak O, Brandes RP, Weissmann N (2015): Hypoxia-dependent reactive oxygen species signaling in the pulmonary circulation. Focus on ion channels. *Antioxid Redox Signal* 22(6): 537–552
181. Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL (2003): Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* 278(31): 29031–29040
182. Ventetuolo CE, Hess E, Austin ED, Barón AE, Klinger JR, Lahm T et al (2017): Sex-based differences in veterans with pulmonary hypertension. Results from the veterans affairs-clinical assessment reporting and tracking database. *Plos one* 12(11): e0187734
183. Voelkel NF, Tuder RM (1997): Cellular and molecular biology of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* 10(5-6): 231–241
184. Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR et al (2006): Right ventricular function and failure. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation* 114(17): 1883–1891
185. Voolstra O, Huber A (2014): Post-Translational Modifications of TRP Channels. *Cells* 3(2): 258–287
186. Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA (2006): Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and

Literaturverzeichnis

- elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 98(12): 1528–1537
187. Wang M, Tang Y-B, Ma M-M, Chen J-H, Hu C-P, Zhao S-P, Peng D-Q, Zhou J-G, Guan Y-Y, Zhang Z (2016): TRPC3 channel confers cerebrovascular remodelling during hypertension via transactivation of EGF receptor signalling. *Cardiovasc Res* 109(1): 34–43
188. Wang Y-X, Wang L, Zheng Y-M (2020): Canonical Transient Potential Receptor-3 Channels in Normal and Diseased Airway Smooth Muscle Cells. *Adv Exp Med Biol* 1131: 471–487
189. Ward JPT, McMurtry IF (2009): Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension. New findings for an old problem. *Curr Opin Pharmacol* 9(3): 287–296
190. Ward JPT, Robertson TP, Aaronson PI (2005): Capacitative calcium entry. A central role in hypoxic pulmonary vasoconstriction? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(1): 2-4
191. Weir EK, Olschewski A (2006): Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia. *Cardiovasc Res* 71(4): 630–641
192. Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W (2001): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. A multifactorial response? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(2): 314-317
193. Weissmann N, Akkayagil E, Quanz K, Schermuly RT, Ghofrani HA, Fink L, Hänze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F (2004): Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 139(2): 191–202
194. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrescu R et al (2006): Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50): 19093–19098
195. WHO Expert Committee on Chronic Cor Pulmonale & World Health Organization (1961): Chronic cor pulmonale. Report of an expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 213: 35
196. Wilcox JN, Okamoto EI, Nakahara KI, Vinten-Johansen J (2001): Perivascular responses after angioplasty which may contribute to postangioplasty restenosis. A

Literaturverzeichnis

- role for circulating myofibroblast precursors? *Ann N Y Acad Sci* 947: 68-90; discussion 90-92
197. Williamson MP (1994): The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* 297(2): 249–260
198. Wu L-J, Sweet T-B, Clapham DE (2010): International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* 62(3): 381–404
199. Xia Y, Yang X-R, Fu Z, Paudel O, Abramowitz J, Birnbaumer L, Sham JSK (2014): Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions. *Hypertension* 63(1): 173–180
200. Xu T, Wu B-M, Yao H-W, Meng X-M, Huang C, Ni M-M, Li J (2015): Novel insights into TRPM7 function in fibrotic diseases. A potential therapeutic target. *J Cell Physiol* 230(6): 1163–1169
201. Yaginuma G, Mohri H, Takahashi T (1990): Distribution of arterial lesions and collateral pathways in the pulmonary hypertension of congenital heart disease. A computer aided reconstruction study. *Thorax* 45(8): 586–590
202. Yamaguchi Y, Iribe G, Nishida M, Naruse K (2017): Role of TRPC3 and TRPC6 channels in the myocardial response to stretch. Linking physiology and pathophysiology. *Prog Biophys Mol Biol* 130(Pt B): 264–272
203. Yang D, Luo Z, Ma S, Wong WT, Ma L, Zhong J et al (2010): Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. *Cell Metab* 12(2): 130–141
204. Yang SL, Cao Q, Zhou KC, Feng YJ, Wang YZ (2009): Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer. *Oncogene* 28(10): 1320–1328
205. Yildirim E, Dietrich A, Birnbaumer L (2003): The mouse C-type transient receptor potential 2 (TRPC2) channel. Alternative splicing and calmodulin binding to its N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5): 2220–2225
206. Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX-J (2004): Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(38): 13861–13866

Literaturverzeichnis

207. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1996): trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 85(5): 661–671
208. Zuckerman BD, Orton EC, Stenmark KR, Trapp JA, Murphy JR, Coffeen PR, Reeves JT (1991): Alteration of the pulsatile load in the high-altitude calf model of pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* 70(2): 859–868

13 Veröffentlichungen

13.1 Vorträge

- Mayser C, Erb A, Kraut S, Seeger W, Dietrich A, Weißmann N and Brosien M: Loss of the classical transient receptor potential 3 protein partially protects from hypoxia-induced pulmonary hypertension in mouse. DGP 2020, Leipzig, Deutschland. **(Abstract angenommen, der Kongress wurde allerdings aufgrund der SARS-CoV-2 Pandemie abgesagt)**

13.2 Postervorträge

- Malczyk M, Fuchs B, Mayser C, Erb A, Veith-Berger C, Kraut S, Quanz K, Henneke I, Schermuly RT, Seeger W, Gudermann T, Dietrich A und Weißmann N: Klassische transiente Rezeptor Potential Proteine in der Pathogenese der chronisch Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie. Science Day 2017, Justus-Liebig-Universität Giessen, Deutschland.
- Mayser C, Brosien M, Schaffelhofer L., Erb A, Kraut S, Seeger W, Dietrich A und Weißmann N:
Loss of the classical transient receptor potential 3 protein partially protects from hypoxia-induced pulmonary hypertension in mouse. DGIM 2020, Wiesbaden, Deutschland **(Abstract angenommen, der Kongress wurde allerdings aufgrund der SARS-CoV-2 Pandemie abgesagt).**

14 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

15 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen Bedanken, die mir bei der Bearbeitung meiner Doktorarbeit geholfen haben. Sowohl fachlich als auch menschlich gebührt mein Dank vor allem der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Weißmann. Ich habe mich dort während meiner Zeit im Labor und auch danach immer sehr wohl gefühlt. Aber auch allen Freunden und Verwandten, die mich in der Bearbeitung der Doktorarbeit unterstützt haben, möchte ich danken, dass sie mich stets ermuntert haben weiter zu machen.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Weißmann, dass er dieses Projekt ermöglicht hat und mir die Chance gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe zu forschen. Die Auswahl des Themas sowie weitere Anregungen zur Vertiefung erfolgten in regelmäßigem Austausch. Ohne die Finanzierung und technische Ausstattung des Labors wäre eine Doktorarbeit in diesem Umfang nur schwer zu realisieren gewesen.

Durch die Kooperation mit Prof. Dr. Alexander Dietrich vom Walther-Straub-Institut München war ein reger Austausch von Wissen und Material möglich, der das Projekt bereicherte. Ihn verdanke ich auch das zur Verfügung stellen der *Knockout*-Mäuse.

Ganz besonders hervorzuheben ist Frau Dr. Monika Brosien. Ihr habe ich die direkte thematische Deutung zu verdanken. Ich habe mich von ihr stets gut unterstützt und betreut gefühlt. Ich schätze sie nicht nur für ihr unglaubliches wissenschaftliches Verständnis und ihren klugen Kopf, sondern auch für ihre Persönlichkeit.

Außerdem danke ich ganz herzlich den technischen Assistenten der Arbeitsgruppe Weißmann. Von Ihnen habe ich die Methoden erlernt und sie haben mich stets geduldig auch weiterhin bei Fragen unterstützt. Hervorzuheben ist sind dabei Frau Carmen Homberger, Frau Elisabeth Kappes und Herr Nils Schupp, die mich bei den Versuchen in der Zellkultur unterstützt haben. Außerdem Frau Ingrid Breitenborn-Müller, die mich vor allem in der Molekularbiologie unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für Probleme hatte. Ein großer Dank gilt auch Frau Karin Quanz, die mir bei den ILUs und bei den hämodynamischen Messungen geholfen hat und die auch sonstige Problemstellung immer ein offenes Ohr hatte.

Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei Frau Alexandra Erb für die Hilfe bei den ILUs, bei Frau Katharina Schäfer für ihre Hilfe beim Umsetzen der in vivo Versuche und bei Frau Dr. Simone Kraut für die Betreuung in der Histologie.

Danksagung

Einen ganz persönlichen Dank möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern aussprechen, dafür dass sie immer hinter mir stehen und mich unterstützen. Nicht nur in guten, sondern vor allem in schlechten Zeiten kann ich immer auf sie zählen.

Auch bei meinen Freunden möchte ich mich bedanken. Sie haben mich ermutigt nicht aufzugeben und stets das Positive zu sehen. Besonders hervorzuheben ist Frau Julia Stockburger, mit der ich schon während der Laborzeit in regem Austausch stand und die mir immer mit Rat und Tat Beiseite stand.

Ein besonderer persönlicher Dank gilt Herrn Sebastian Hiller, der mit sehr viel Geduld alle Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit miterlebt und immer an mich geglaubt hat.