

Aus dem Exzellenzcluster Kardiopulmonales System

Innere Medizin II

am Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Inaugural-Dissertation

Die Rolle von TRPC-Kanälen in der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in der Maus

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

von

Monika Malczyk (MSc)

aus Erlensee

Gießen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Wissemann
Institut für Botanik, FB 08
Heinrich-Buff-Ring 17
35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Lakes-Harlan
Institut für Tierphysiologie, FB 08
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 38
35392 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Weißmann
Exzellenzcluster Kardiopulmonales System (ECCPS)
Medizinische Klinik II/IV, FB 11
Aulweg 130
35392 Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 2017

*„Vom Weltall aus gesehen, ist der Planet ein blauer.
Vom Weltall gesehen, ist der Planet die Welt des Wals.
Und nicht die des Menschen.“*

Healthcote Williams, Kontinent der Wale

„Wer nur ein Leben rettet, der rettet die ganze Welt.“

Babylonischer Talmud Traktat Sanhedrin 37a

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Graduierentenkollegs *Molecular Biology and Medicine of the Lung* (MBML), *Signaling Mechanisms in Lung Physiology and Disease* (SMLPD) und *International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences* (GGL) am Exzellenzcluster Kardiopulmonales System der Justus-Liebig-Universität Gießen, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II/V angefertigt. Diese Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 2011 bis Januar 2017 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Weißmann fertiggestellt.

Abkürzungen

Abkürzungen

Δ	delta, Differenz
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
%	Prozent
α -SMA	glattmuskuläres α -Aktin (<i>α-smooth muscle actin</i>)
AEC I	Typ I Pneumozyten (<i>alveolar epithelial cell type I</i>)
AEC II	Typ II Pneumozyten (<i>alveolar epithelial cell type I</i>)
AM	Azetoxymethylester
AngII	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β -MeEtOH	β -Mercaptoethanol
B ₂ M	β_2 Mikroglobulin
BG	Bindegewebe
bFGF	einfacher Fibroblasten Wachstumsfaktor (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
BM	Basalmembran
BMP	knochenmorphogenetisches Protein (<i>bone morphogenetic portein</i>)
bp	Basenpaare
BrdU	5'-Brom-2'-Desoxyuridin (Bromdesoxyuridin)
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
Ca^{2+}	Kalzium-Ionen
$[\text{Ca}^{2+}]$	Kalziumkonzentration
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
cc	cc-Domäne (<i>coined-coil domaine</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (<i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
CHPH	chronisch Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CIRB	Calmodulin/IP ₃ Rezeptor Bindestelle (<i>calmodulin/IP₃ receptor binding</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COOH	Carboxylgruppe
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CPA	Cyklopiazonsäure (<i>cyclopiazonic acid</i>)
Ct	Schwellenzyklus (<i>cycle threshold</i>)
CTEPH	Chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (<i>chronic thromboembolic pulmonary hypertension</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin

Abkürzungen

DAG	Diazylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DPBS	Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>dulbecco's phosphat buffered saline</i>)
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Erythrozyten
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Endothelzellen (<i>endothelial cells</i>)
EdU	5'Ethynyl-2'-desoxyuridine
EGF	endothelialer Wachstumsfaktor (<i>endothelial growth factor</i>)
ECGS-H	endothelialer Zellwachstumszusatz (<i>endothelial cell growth supplement</i>) mit Heparin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Erk1/2	Extrazelluläre signalregulierte Kinasen 1 und 2
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alteri</i>)
ET-1	Endothelin-1
EtOH	Ethanol
FB	Fibroblasten
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
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (<i>G-protein-coupled receptor</i>)
h	Stunden
HA ₂ TRPC1	doppelt Hämagglutinin-markiertes TRPC1
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung (<i>hank's balanced salt solution</i>)
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
Hox	Hypoxie
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
hPASMC	humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (<i>human pulmonary arterial smooth muscle cells</i>)
HR	Hepes Ringer Lösung
HRE	Hypoxie Bindesequenz (<i>hypoxia responsive elements</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
H ₂ O	Wasser

Abkürzungen

I.E.	internationale Einheiten
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1 (<i>insulin-like growth factor 1</i>)
IL	Interleukin
IL-1/2/6/8/10	Interleukine 1/2/6/8/10
ILU	Isolierte, ventilierte und blutfrei-perfundierte Lunge
i.p.	intraperitoneal
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K ⁺	Kalium-Ionen
[K ⁺] _i	intrazelluläre Kaliumkonzentration
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Ki67	Antigen Ki67
K _v -Kanal	spannungsabhängiger Kalium-Kanal
L	Liter
L.	Lumen
LPS	Lipopolisaccharid
LV	linker Ventrikel
M	Molar (Mol pro Liter)
m ²	Quadratmeter
MAPK	mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCT	Monocrotalin
Min.	Minuten
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
mAmp	Milliampère
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPASM	murine/Maus pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (<i>murine/mouse pulmonary arterial smooth muscle cells</i>)
mRNA	Boten RNA (<i>messenger RNA</i>)
MØ	alveolare Makrophagen
n	Anzahl Einzelexperimente
Na ⁺	Natrium-Ionen

Abkürzungen

NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFAT	Nukleusfaktor der aktivierten T-Zellen (<i>nuclear factor of activated T-cells</i>)
ng	Nanogramm
NHE	Na ⁺ /H ⁺ Austauscher (Na ⁺ /H ⁺ <i>exchanger</i>)
NH ₂	Aminogruppe
NF-κB	Nukleusfaktor leichter κ-Ketten der aktivierten B-Zelle (<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>)
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid (<i>nitric oxide</i>)
Nox	Normoxie
NOX	NADPH Oxidase
N ₂	Stickstoff (Gas)
NP-40	Tergitol Typ NP-40
Nr.	Nummer
NSCC	nicht-selektive Kationen Kanäle (<i>non-selectiv cation channel</i>)
O ₂	Sauerstoff
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
OH	Hydroxy-Gruppe
Orai1	Ca ²⁺ aktivierbares Ca ²⁺ -Kanalprotein 1 (<i>Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel protein 1</i>)
P0, P1, P2	Passage 0, Passage 1, Passage 2
PA	Pulmonalarterie (<i>Arteria pulmonalis</i>)
PAEC	pulmonalarterielle Endothelzellen (<i>pulmonary arterial endothelial cells</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck (<i>pulmonary arteriel pressure</i>)
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (<i>pulmonary arterial smooth muscle cells</i>)
PBS	Phosphatpufferlösung (<i>phosphat-buffered saline</i>)
PBST	PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PDGF	thombozyten-abstammender Wachstumsfaktor (<i>platelet-derived growth factor</i>)
p-Erk1/2	phosphorylierte Erk1/2
PGI ₂	Prostaglandin/Prostazyklin
pH	negative dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
PH	Pulmonale Hypertonie
PHD	Prolyl-Hydroxylase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

Abkürzungen

pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand (<i>pulmonary vascular resistance</i>)
p-Wert	Signifikanzwert (<i>probability value</i>)
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassaypuffer (<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROC	Rezeptor-aktivierbarer Kanal (<i>receptor-operated channel</i>)
ROCE	Rezeptor-vermittelter Kalziumeinstrom (<i>receptor-operated calcium entry</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rPASC	Ratten pulmonalerarterielle glatte Muskelzellen (<i>rat pulmonary arterial smooth muscle cells</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</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
S1-S6	Transmembrandomänen 1 bis 6
SAP	systemischer arterieller Druck (<i>systemic arterial pressure</i>)
SBS	STIM-Bindestelle
Sek.	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of mean</i>)
sGC	lösliche Guanylatcyclase (<i>soluble guanylyl cyclase</i>)
siRNA	kleine interferierende RNA (<i>small-interfering RNA</i>)
siR	kleine interferierende RNA ohne Zielsequenz (<i>random small-interfering RNA</i>)
siTRPC1	kleine interferierende RNA gegen TRPC1
siHIF-1 α	kleine interferierende RNA gegen HIF-1 α
SMC	glatte Muskelzelle (<i>smooth muscle cell</i>)
SOC	Speicher-aktivierbarer Kanal (<i>store-operated channel</i>)
SOCE	Speicher-vermittelter Kalziumeinstrom (<i>store-operated calcium entry</i>)
Stau	Staurosporin
STIM-1	stromales Interaktionsmolekül 1 (<i>stromal interaction molecule 1</i>)
SU5416	Semaxanib, Tyrosine-Kinase Inhibitor
T.	<i>Tunica</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin
TBST	Trispufferlösung (<i>tris buffer saline</i>) mit 0,1% Tween

Abkürzungen

TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPA	ankyrin TRP
TRPC	klassischer (<i>classical</i>) TRP
TRPM	melastatin TRP
TRPML	mucolipin TRP
TRPN	kein Mechanorezeptor <i>potential C</i> (<i>no mechanoreceptor potential C</i> , NOMPC) TRP
TRPP	polycystein TRP
TRPV	vanilloid TRP
TXA ₂	Thromboxan A ₂
U	Einheit (<i>unit</i>)
u. a.	unter anderem/n
V	Volt
VDCC	spannungsaktivierte Ca ²⁺ -Kanäle (<i>voltage-dependend calcium channel</i>)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VHL	Von-Hippel-Lindau
v/v	Volumen pro Volumen
vWF	von-Willebrand Faktor
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organisation</i>)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsangabe

1	Einleitung	1
1.1	Lungen	1
1.1.1	Anatomie der Säugetierlunge.....	1
1.1.2	Funktion der Säugetierlunge	4
1.2	Blutkreislauf.....	4
1.2.1	Lungen- und Körperkreislauf von Säugetieren	4
1.2.2	Anatomie von Blut- und Kapillargefäßen	5
1.3	Einfluss von Hypoxie auf die pulmonale Vaskulatur	6
1.3.1	Mechanismus der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV)	10
1.4	Pulmonale Hypertonie (PH).....	10
1.4.1	Klassifikation der PH.....	11
1.4.2	Charakteristische Veränderungen im pulmonalvaskulären Gefäßumbau	14
1.4.3	Mechanismus des vaskulären Gefäßumbaus.....	16
1.5	<i>Transient Receptor Potential</i> (TRP)-Ionenkanäle	22
1.5.1	Die TRP-Superfamilie	22
1.5.2	Die Subfamilie der klassischen TRP (TRPC) Proteine.....	24
1.5.3	TRP-Kanäle in PH	26
1.6	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	26
2	Material und Methoden	29
2.1	Material.....	29
2.1.1	Geräte.....	29
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3	Chemikalien.....	36
2.1.4	Kits und Assays	39
2.1.5	Wachstumsfaktoren	40
2.1.6	Antikörper.....	41
2.1.7	Enzyme, Marker, Standards.....	42
2.1.8	Plasmide, siRNA.....	42
2.1.9	Primer	43
2.1.10	Standards	45
2.1.11	Gele.....	45
2.1.12	Puffer und Lösungen.....	45
2.1.13	Medien	48
2.1.14	Zellen und Mauslinien	51
2.1.15	Software.....	51

Inhaltsangabe

2.2	Versuchstiere.....	52
2.2.1	Mauslinien	52
2.2.2	Genotypisierung.....	52
2.2.3	Versuchstierhaltung	53
2.2.4	Versuchsgenehmigungen	54
2.3	Chronische Hypoxie-Exposition der Mäuse	55
2.3.1	Versuchstiergruppen	55
2.3.2	Hämodynamische Messung	55
2.3.3	Hämatokrit-Messung	56
2.3.4	Präparation der Lunge.....	56
2.3.5	Rechtsherzhypertrophie	57
2.3.6	Akute und anhaltende Hypoxie in isolierter, ventilierter und blutfrei-perfundierter Lunge (ILU)	57
2.4	<i>In vitro</i> Experimente	59
2.4.1	Zellkultur	59
2.4.2	Normoxische und hypoxische Exposition von Zellen	63
2.4.3	Transfektion.....	64
2.4.4	Migrationsassay	64
2.4.5	Proliferationsassay	66
2.4.6	Apoptoseassay	70
2.4.7	Stimulierung mit Wachstumsfaktoren	71
2.4.8	Kalziummessungen.....	71
2.5	Molekularbiologische Methoden	74
2.5.1	Immunohistochemie - Muskularisierung	74
2.5.2	Laser-Capture Mikrodissektion	77
2.5.3	Genexpressionsanalysen	77
2.5.4	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (RTqPCR)	78
2.5.5	cDNA-Microarray-Analyse.....	79
2.5.6	Proteinextraktion.....	80
2.5.7	Western Blot	81
2.5.8	ELISA.....	82
2.5.9	Plasmidamplifikation und -isolation	82
2.5.10	Promoteranalyse	83
2.6	Statistik	83
3	Ergebnisse	85
3.1	Einfluss von chronischer Hypoxie auf die TRPC-Expression	85
3.1.1	Regulation in homogenisierten Mauslungen.....	85
3.1.2	Regulation in mikrodisezierten murinen Gefäßen.....	86

Inhaltsangabe

3.1.3	Regulation in isolierten murinen PASMCMC	87
3.1.4	Regulation von TRPC1 auf Protein-Ebene	88
3.1.5	Regulation in Ratten und humanen PASMCMC	89
3.2	Charakterisierung von WT und TRPC1 ^{-/-} Mäusen.....	90
3.2.1	Einfluss von TRPC1 in akuter und anhaltender Hypoxie	91
3.2.2	Einfluss von TRPC1 auf die CHPH.....	91
3.3	Charakterisierung der chronisch hypoxischen WT und TRPC1 ^{-/-} mPASMCMC	94
3.3.1	Einfluss von TRPC1 auf die mPASMCMC Proliferation	94
3.3.2	Einfluss von TRPC1 auf die mPASMCMC Migration	97
3.3.3	Einfluss von TRPC1 auf die mPASMCMC Apoptose.....	98
3.4	Einfluss von TRPC1 auf den Ca ²⁺ -Haushalt in chronisch hypoxischen mPASMCMC.....	99
3.4.1	Untersuchung des Rezeptor-vermittelten Ca ²⁺ -Einstroms (ROCE)	99
3.4.2	Untersuchung des Speicher-vermittelten Ca ²⁺ -Einstroms (SOCE).....	101
3.5	Molekulare Untersuchungen der chronisch hypoxischen WT und TRPC1 ^{-/-} Mäuse	104
3.5.1	Molekulare Veränderungen in WT Mäusen nach chronischer Hypoxie-Exposition	104
3.5.2	Molekulare Veränderungen in TRPC1 ^{-/-} Mäusen nach chronischer Hypoxie-Exposition	107
3.5.3	Einfluss von HIF-1 α auf die TRPC1-Expression.....	110
3.5.4	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die TRPC1-Expression.....	111
4	Diskussion	117
4.1	Auswahl von TRPC1 als Kandidat in CHPH.....	117
4.2	Rolle von TRPC1 <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	118
4.2.1	Rolle von TRPC1 <i>in vivo</i>	118
4.2.2	Rolle von TRPC1 <i>in vitro</i>	119
4.3	Aufklärung des Signalweges in der Hypoxie-induzierten Proliferation der mPASMCMC.....	123
4.3.1	Die Aktivierung von TRPC1-assoziierten Kationenkanälen	123
4.3.2	<i>Upstream</i> - und <i>Downstream</i> -Signalwege	128
4.4	Kritische Betrachtung der verwendeten Modelle.....	135
4.4.1	Das Tiermodell	135
4.4.2	Das Zellmodell.....	137
4.5	Fazit.....	138
4.6	Ausblick	139
5	Zusammenfassung.....	141
6	Summary	143
7	Promotersequenz	145

Inhaltsangabe

8	cDNA-Microarray-Analyse	146
9	Abbildungsverzeichnis	147
10	Tabellenverzeichnis	149
11	Formelverzeichnis	149
12	Literaturverzeichnis	150
13	Eigenständigkeitserklärung	206
14	Danksagung	207
15	Anhang	209
15.1	Veröffentlichungen	209
15.2	Vorträge	209
15.3	Posterpräsentation	209
15.4	Awards	210
15.5	Lebenslauf	211

1 Einleitung

1.1 Lungen

Die Lunge erfüllt in allen Vertebraten drei Aufgaben: 1) die Aufnahme von Sauerstoff (O_2) (Oxygenierung) in das Blut, 2) die Abgabe von Kohlendioxid (CO_2) an die Atmosphäre sowie 3) die Säure-Basen-Regulation durch CO_2 -Abgabe⁴. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen in verschiedenen Vertebraten in ihrer respiratorischen Oberfläche. Die primitivsten Lungen besitzen die Lungenfische und die Amphibien. Die Lungen von Reptilien ermöglichen durch Vorwölbungen oder Kammerung der Oberfläche (Schildkröten und Krokodile) einen effizienteren Gasaustausch. Die größte Oberflächenvergrößerung erreichen Säugetierlungen durch starke Kammerung und Lungenbläschen (Alveolen). Die menschliche Lunge enthält 300×10^6 Alveolen, welche eine Oberfläche von 50 bis 100 m² bilden⁴. Die Vogellunge unterscheidet sich in ihrem Aufbau wesentlich von Lungen anderer Vertebraten. Sie ist relativ statisch und besitzt ein Röhrenaustauschsystem (Parabronchien), welches sich in die Luftkapillare öffnet und mit dem Blutkapillarnetz verbunden ist. Außerdem ist die Vogellunge beidseitig offen und wird durch zusätzliche Luftsäcke in der Ventilation unterstützt. Der spezielle Aufbau der Vogellunge ermöglicht im Vergleich zu anderen Vertebraten eine sehr hohe Effizienz im Gasaustausch⁵.

1.1.1 Anatomie der Säugetierlunge

Die Säugetierlunge besteht aus einer unterschiedlichen Anzahl von Lungenlappen, deren Oberfläche durch eine Pleura (*Tunica serosa*) überzogen ist. Die luftleitenden Atmungsorgane bestehen bei Säugetieren aus Nasenhöhle (*Cavum nasi*), Rachenraum (*Pharynx*), Kehlkopf (*Larynx*), Luftröhre (*Trachea*), Bronchien und Bronchiolen, welche in die Alveolen münden⁶; ⁷. Die 10 bis 12 cm lange humane Trachea wird durch 16 bis 20 gebogene Knorpelspannen in der Vorderwand gestützt. Sie teilt sich in zwei Hauptbronchien, die in die linke und die rechte Lunge münden. Der linke Hauptbronchus teilt sich in zwei, der rechte in drei Lappenbronchien. Die Lappenbronchien verzweigen sich 19 mal dichotom in knorpelhaltige Segmentbronchien, die mit einer Schleimhaut ausgekleidet sind, welche mukusproduzierende Becherzellen und zilienträgende Epithelzellen enthält. Die Segmentbronchien teilen sich schließlich in muskel- und knorpellose Bronchiolen, die mit einer dünnen, Becherzellen-freien Epithelschicht ausgekleidet sind. Die Bronchiolen enden in den Endbronchiolen (*Broncholus terminales*), die

Einleitung

in die respiratorischen Bronchiolen (*Bronchiolus respiratorii*) und Alveolarsäckchen (*Sacculi alveolares*) münden⁶. Die Alveolen werden von Epithelzellen (Typ I Pneumozyten) ausgekleidet, welche den Gasaustausch ermöglichen. Bei Typ I Pneumozyten handelt es sich um differenzierte Epithelzellen vom Typ II (Typ II Pneumozyten), welche sich ebenfalls in der Alveolarwand befinden und Surfactant zur Verringerung der Oberflächenspannung produzieren. Surfactant ist essenziell um einen Alveolenkollaps zu verhindern (**Abbildung 1**). Die angrenzenden Kapillargefäße sind von einer Basalmembran umgeben. Die Diffusionsstrecke zwischen den Kapillaren und den Alveolen misst dabei weniger als $1\text{ }\mu\text{m}$ ^{4; 6}.

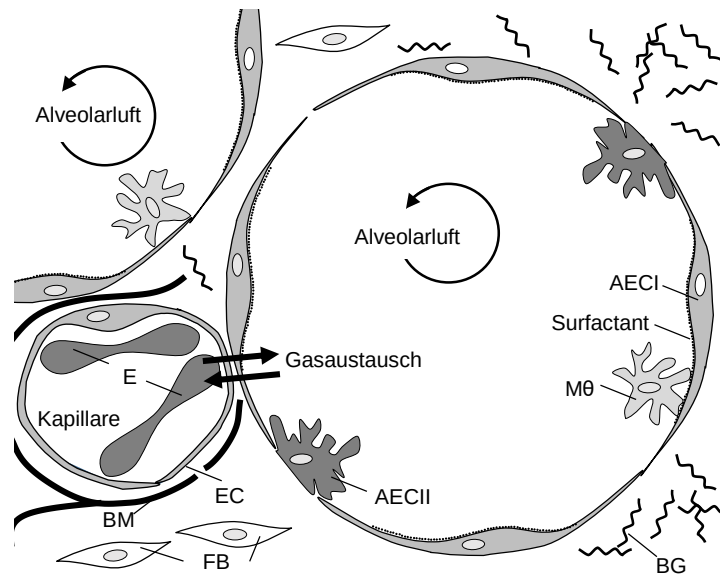


Abbildung 1: Aufbau der Diffusionsbarriere.

Die eingeatmete Luft gelangt in die Alveolen. Die Alveolen werden unter anderem von Typ I Pneumozyten (*alveolar epithelial cell type I*, AEC I) gebildet, welche Surfactant produzieren. In den Alveolen sind zudem weitere Zelltypen, wie Typ II Pneumozyten (*alveolar epithelial cell type II*, AEC II) und alveolare Makrophagen (M0), zu finden. Die Alveolen sind in engen Kontakt mit den Kapillargefäßen, die durch Endothelzellen (*endothelial cells*, EC) ausgekleidet sind. Durch die geringe Diffusionsstrecke können Gase effizient ausgetauscht werden. BM: Basalmembran; BG: Bindegewebe; E: Erythrozyten; FB: Fibroblasten.

Alle Säugetierlungen sind grundsätzlich ähnlich aufgebaut, unterscheiden sich jedoch innerhalb der Arten in ihrer Anatomie. Die Unterschiede werden durch die Körperhaltung (aufrechte oder horizontale Körperhaltung), die Körpergröße sowie den Lebensraum (Wasser, Land, große Höhen) beeinflusst. So unterscheiden sich die Länge der Trachea sowie die Anzahl der Knorpelspangen in unterschiedlichen Spezies (Pferd 48 bis 60, Katze 38 bis 43, Schwein 29 bis 36)⁷. Die meisten Haus-Säugetiere (Hund, Katze, Schweine) haben jeweils drei Lungenlappen auf der einen und zwei auf der anderen Lungenseite⁷. Die Maus hingegen besitzt vier Lungenlappen auf der rechten Seite und nur einen Lungenlappen auf der linken Seite¹⁸. Bei manchen Meeressäugern, wie den Walen (*Cetacea*) und Seekühen (*Sirenia*), fehlt eine

Einleitung

Unterteilung in Lungenlappen völlig²⁰.

Die meisten Säugetierlungen verzweigen sich im Durchschnitt 20 mal dichotom, d.h. gleichmäßig auf zwei Teile⁵. Die Anzahl der Verzweigungen der Bronchien und Bronchiolen, die Art der Verzweigung, die Anzahl der Alveolen sowie die Größe der Lunge, hängen von der entsprechenden Tierart ab. So beschränkt sich das Vorhandensein der Knorpelringe bei den Mäusen auf die extrapulmonalen Atemwege. Des Weiteren verzweigen sich die Atemwege 13 bis 17 mal monopodial. Die submukösen Drüsen, die Mukus und andere Faktoren produzieren, sind nur im proximalen Teil der Trachea vorhanden. Im Gegensatz zum Menschen fehlen Mäusen außerdem respiratorische Bronchien und die Alveolen sind kleiner (39 bis 80 μm) als beim Menschen (200 bis 400 μm)^{18; 24}.

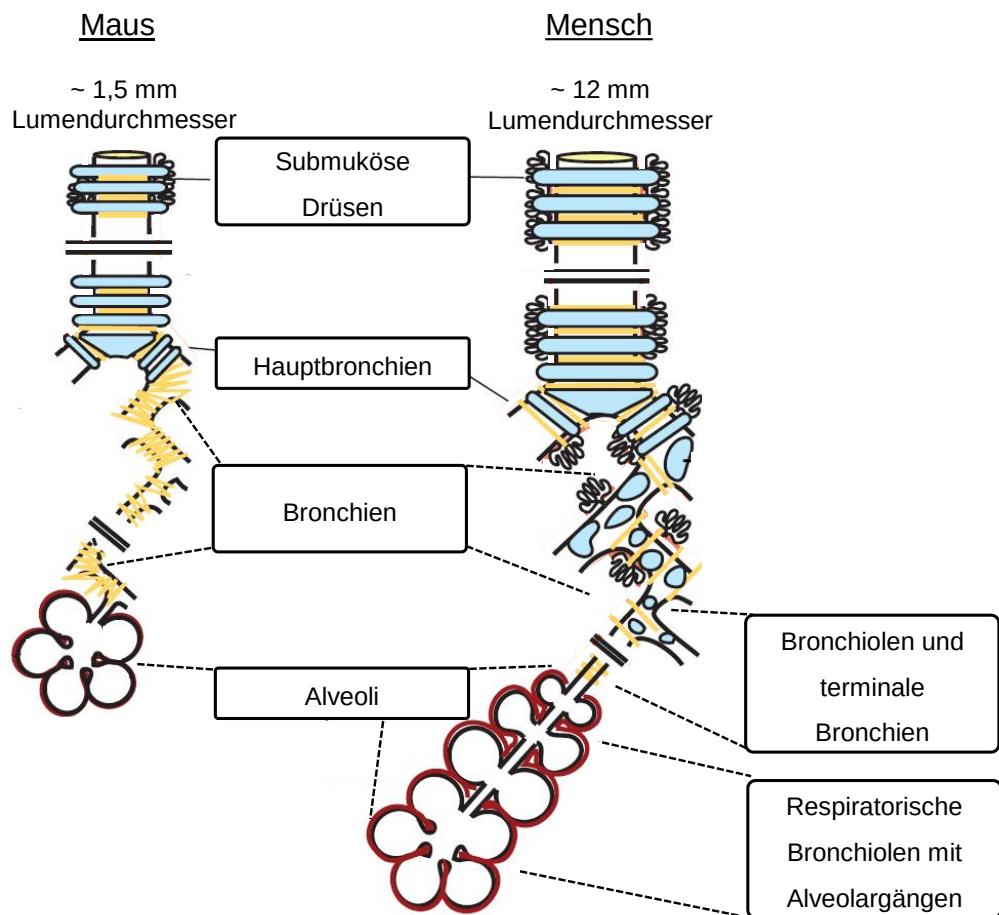


Abbildung 2: Schematischer Vergleich des Lungenaufbaues der Maus und des Menschen.

Links: Die Mastrachea hat einen Durchmesser von ~1,5 mm, ist mit Epithelzellen und glatten Muskelzellen (gelb) ausgekleidet und besitzt submuköse Drüsen im proximalen Teil. Die Trachea verzweigt sich zunächst in zwei Hauptbronchien und dann monopodial in weitere Bronchiolen. Der terminale Bronchus endet im bronchoalveolaren Dukt. Rechts: Die humane Trachea hat einen Durchmesser von ~12 mm und ist ebenfalls mit Epithelzellen und glatten Muskelzellen ausgekleidet. Die Trachea und die größeren Atemwege sind durch Knorpelspangen verstärkt. Die Trachea teilt sich in zwei Hauptbronchien, welche sich dichotom in Bronchien und Bronchiolen verzweigen und in respiratorische Bronchien mit Alveolen enden. Verändert nach Rock et al.²⁴.

Einleitung

1.1.2 Funktion der Säugetierlunge

Bei der Inspiration kontrahieren Zwerchfell (Diaphragma) und innere Zwischenrippenmuskeln (*Musculi intercostales externi*), wobei sich die Rippen nach oben bewegen. Die Lunge expandiert passiv durch einen negativen interpleuralen Druck. Es entsteht außerdem ein Unterdruck in den Alveolen. Bei der Expiration dilatiert das Diaphragma, die *Musculi intercostales interni* kontrahieren, die Rippen senken sich und es entsteht ein Überdruck in den Alveolen⁴. Frequenz der In- und Expiration wird im Hirnstamm in der *Substantia reticularis* gesteuert.

Der Gasaustausch während der Atmung basiert auf Unterschieden in den Gaspartialdrücken und wird in den Alveolen durch Diffusion ermöglicht. Die Diffusionsgeschwindigkeit hängt maßgeblich von den Diffusionseigenschaften der Gase, der Größe des Druckgradienten, der Dicke der alveolokapillären Membran und der Größe der Diffusionsfläche ab⁴. Die alveolokapilläre Membran besteht aus dem Flüssigkeitsfilm der Alveolen, den Alveolarepithelzellen mit der Basalmembran, dem interstitiellen Raum, der Basalmembran der Kapillare und des Kapillarendothels²⁷. Rund 1/3 der eingeatmeten Luft (78% Stickstoff, 21% O₂, 0,03% CO₂, 1% Edelgase) erreicht nicht die Alveolen sondern verbleibt in den Bereichen, die nicht am Gasaustausch beteiligt sind (nicht-respiratorischen Atemwegen, Totraum)⁴.

1.2 Blutkreislauf

1.2.1 Lungen- und Körperkreislauf von Säugetieren

Das Gefäßsystem der Säugetiere besteht aus einem großen Körperkreislauf (Hochdrucksystem, mittlerer Blutdruck: ~100 mmHg beim Menschen) und einem kleinen Lungenkreislauf (Niederdrucksystem, mittlerer Blutdruck: <20 mmHg beim Menschen)^{5; 31}. Das Blut aus dem Körperkreislauf wird über die Hohlvene (*Vena cava*) in das rechte Atrium geleitet, von wo es über den rechten Ventrikel mit einem mittleren Druck von 20 mmHg in die Pulmonalarterie (*Arteria pulmonaris*, PA) gepumpt wird^{4; 32}. Durch die Elastizität der PA wird der Blutdruck im Lungenkreislauf gepuffert, sodass Schwankungen im Blutdruck verringert werden⁵. Die PA verzweigt sich parallel zu den Atemwegen in immer kleinere Gefäße, deren Durchmesser sich fortlaufend verringert, bis hin zum Kapillarsystem, welches die Alveolen umschließt. Nach erfolgtem Gasaustausch wird das Blut aus dem Lungenkreislauf zurück zum Herzen geleitet. Durch die Pulmonalvenen (*Venae pulmonales*) erreicht das Blut das linke Atrium und wird über den linken Ventrikel mit einem mittleren Druck von 100 mmHg in den Körperkreislauf

Einleitung

gepumpt^{4; 32}. Durch die Windkesselfunktion wird das Gefäßsystem des Körperkreislaufes als Druckreservoir genutzt, wodurch der Unterschied zwischen dem systolischen (Maximalwert abhängig von der Herauswurfleistung) und dem diastolischen (Minimalwert während der Herzfüllungsphase) Druck gepuffert wird. So wird der pulsierende Blutstrom in einen gleichmäßigen Volumenstrom umgewandelt und eine kontinuierliche Durchblutung ermöglicht. Durch Querschnittsveränderungen und präkapilläre Sphinkter der vorgeschalteten Arteriolen und Venolen wird die Durchblutung moduliert, wobei das Kapillarsystem keinen aktiven Einfluss auf die Durchblutung der Gewebe hat⁵.

1.2.2 Anatomie von Blut- und Kapillargefäßen

Das Gefäßsystem besteht aus Arterien, die vom Herzen wegführen, und Venen, die zum Herzen führen. Die Arterien teilen sich in kleine Blutgefäße, die Arteriolen, während sich die Venen in Venolen verzweigen. Ein Netzwerk aus kleinsten Haargefäßen (Kapillaren) verbindet Arteriolen und Venolen³¹ (**Abbildung 3**).

Die meisten Gefäße bestehen aus drei Schichten, der inneren Schicht (*Tunica intima*), der mittleren Schicht (*Tunica media*) und der äußeren Schicht (*Tunica adventita*). Die *Tunica intima* besteht aus einer Endothelschicht, welche von einer Schicht Bindegewebsfasern (*Stratum subendotheliale*) umgeben wird. Diese Schicht verdichtet sich bei den Arterien zur *Membrana elastica interna*, die die *Tunica adventita* und die *Tunica media* separiert³¹. Die *Tunica media* besteht hauptsächlich aus Muskelzellen, teilweise sind jedoch auch Elastin, Kollagen (Typ I und II) sowie Proteoglykane eingelagert³¹. Diese Schicht wird von einer weiteren Schicht Bindegewebsfasern, der *Media elastica externa*, umgeben. Die *Media elastica externa* ist größtenteils in großen Gefäßen zu finden und ist in Arterien, verglichen mit Venen gleicher Größe, prominenter ausgebildet. Die Hauptaufgabe der *Tunica media* ist die Regulation des Gefäßtonus³¹. Die äußerste Schicht, die *Media adventitia*, ist aus Bindegewebe und Fibroblasten aufgebaut. In großen Gefäßen (Aorta) wird die *Tunica adventita*, teilweise auch die *Tunica media*, über die *Vasa vasorum* mit Blut versorgt⁴¹. In dieser Schicht sind kleine Blutgefäße eingelagert⁴² (**Abbildung 3**). Die Gefäße des Kapillarsystems bestehen aus einer einlagigen Endothelschicht, aufgelagerten Perizyten und einer Basalmembran³¹ (**Abbildung 3**). Das Kapillarsystem ermöglicht den Austausch der Nährstoffe und Gase. Für kleine Moleküle, wie Wasser, Ionen und Gase, ist es durchlässig, für den transzellulären Transport größerer Moleküle sind Vesikeln notwendig⁴³.

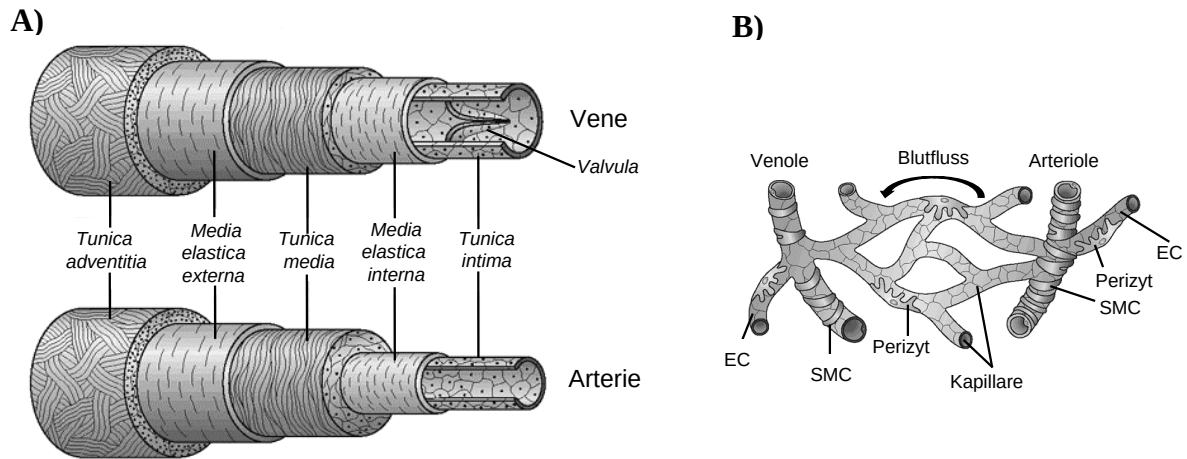


Abbildung 3: Aufbau von großen, kleinen und kapillaren Gefäßen.

A) Große Gefäße bestehen aus drei Schichten, der *Tunica intima*, der *Tunica media* und der *Tunica adventitia*. Zusätzlich besitzen große Gefäße eine *Media elastica intima* und *externa*. Venen besitzen zudem kleine Klappen (*Valvula*), die den Rückfluss des Blutes verhindern. **B)** Der Kapillarbereich besteht aus Kapillargefäßen, Arteriolen und Venolen. Im Unterschied zu Kapillargefäßen, bestehen Arteriolen und Venolen aus einer *Tunica intima* und einer partiellen *Tunica media*. Die Kapillargefäße bestehen nur aus der *Tunica intima* und Perizyten. EC: *endothelial cells* (Endothelzellen); SMC: *smooth muscle cells* (glatte Muskelzellen). Verändert nach Cleaver und Melton⁴⁴.

1.3 Einfluss von Hypoxie auf die pulmonale Vaskulatur

Um eine optimale Sauerstoffaufnahme und -versorgung des Körperkreislaufes zu gewährleisten, gibt es evolutionär konservierte, dynamische Mechanismen. Diese passen die Perfusion der Gefäße an die alveolare Ventilation an. Kommt es zu einem akuten Sauerstoffmangel (Hypoxie), so reagieren pulmonale Gefäße mit einer Vasokonstriktion, die als hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) oder als Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnet wird⁴⁵. Durch diesen Mechanismus, der bei verschiedenen Säugetieren^{50–52}, Vögeln⁵³, Reptilien⁵⁴ und Fischen⁵⁸ nachgewiesen wurde, wird die Perfusion an die aktuelle alveolare Ventilation angepasst⁵⁹, um den Gasaustausch zu optimieren (**Abbildung 4**).

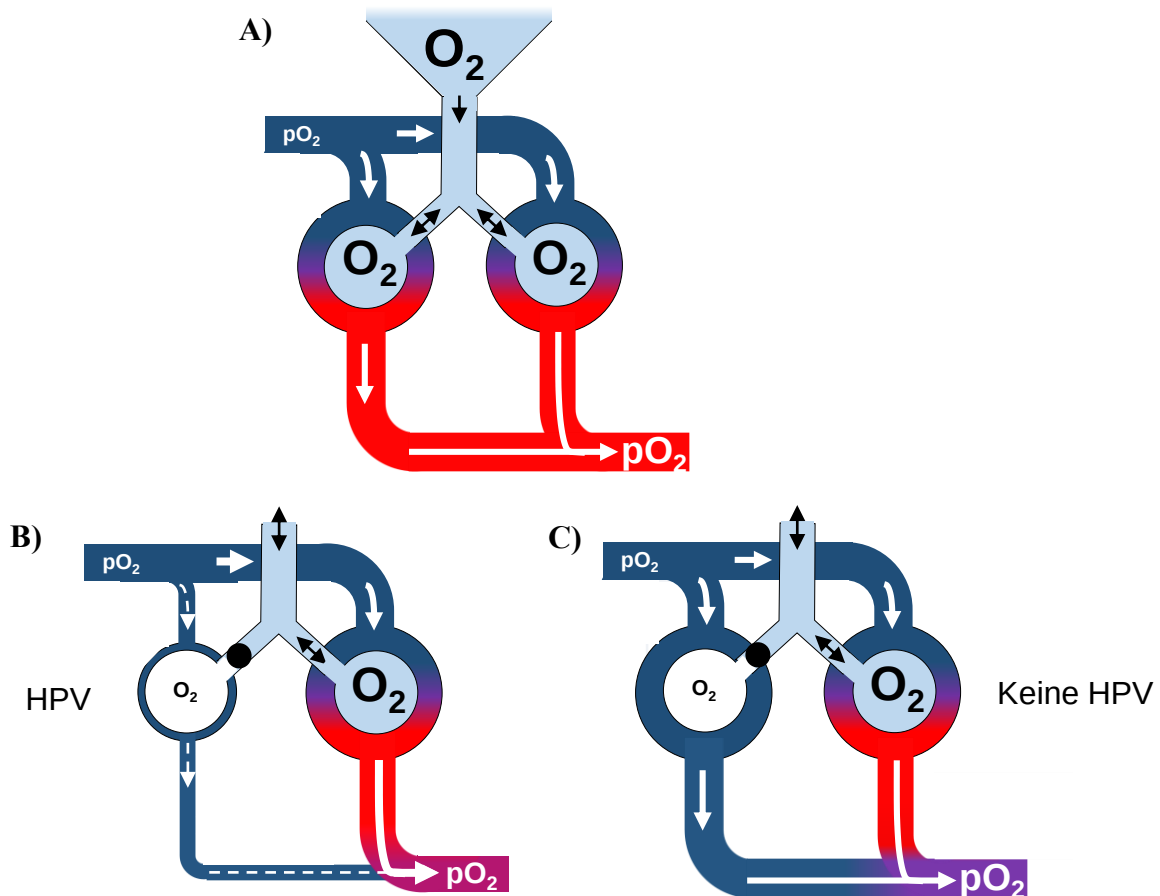


Abbildung 4: Schematische Darstellung der HPV.

A) Unter physiologischen Bedingungen werden die Alveolen bei optimaler Ventilation gleichmäßig perfundiert. Dabei wird das sauerstoffarme Blut mit Sauerstoff angereichert. **B)** Durch Ventilationsbehinderung oder Verschluss der Alveolen wird die Ventilation dieser vermindert oder es kommt zum vollständigen Erliegen der Ventilation. In Folge dessen wird die Perfusion der entsprechenden Blutgefäße durch die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) minimiert. Gleichzeitig werden andere ausreichend ventilierter Areale der Lunge verstärkt perfundiert, wodurch das Blut ausreichend oxygeniert werden kann. **C)** Ist der Mechanismus der HPV durch pathophysiologische Prozesse gestört, so kommt es zum Missverhältnis zwischen Ventilation und Perfusion. Dabei werden nicht ausreichend ventilierter Areale unvermindert perfundiert und das Blut wird nicht ausreichend oxygeniert. pO_2 : Sauerstoffpartialdruck; blau: desoxygeniertes Blut; rot: oxygeniertes Blut. Verändert nach Sylvester et al.⁶⁰.

Bei der Aktivierung der HPV, welche bereits bei einem Sauerstoffpartialdruck von weniger als 100 mmHg erfolgt^{51; 60; 66}, kontrahieren glatten Muskelzellen in kleinen pulmonalen Arteriolen und Venolen, wodurch es zu einer Verengung der Gefäße kommt (**Abbildung 5**). Diese führt zur Erhöhung des Gefäßwiderstands^{67; 68} und des pulmonalarteriellen Drucks (*pulmonary arterial pressure, PAP*)⁶⁹.

Einleitung

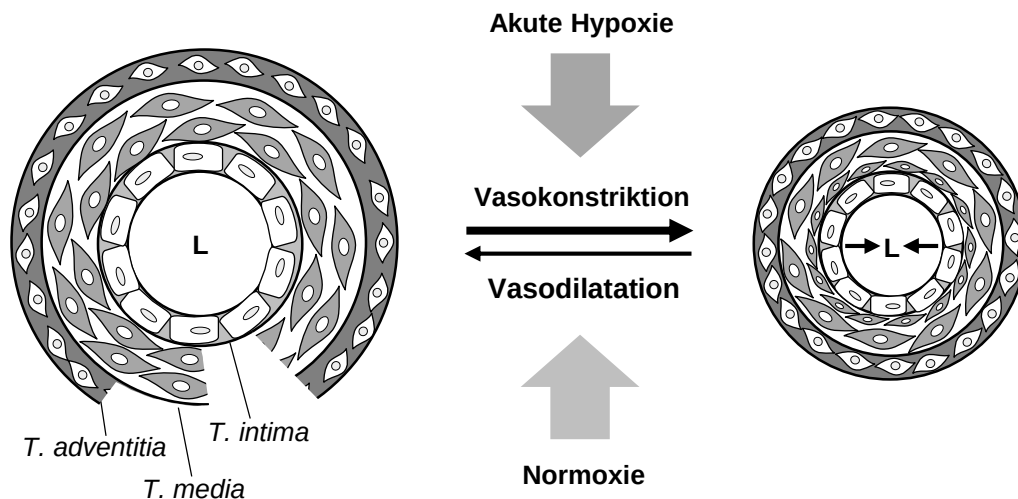


Abbildung 5: Einfluss von akuter Hypoxie auf die pulmonalen Arterien.

Pulmonale Arterien reagieren auf akute Hypoxie mit einer Vasokonstriktion. Dieser physiologische Mechanismus, der als hypoxische pulmonale Vasokonstriktion bezeichnet wird, ist unter Normoxie durch Vasodilatation der Gefäße vollständig reversibel. L: Lumen, T: *Tunica*. Verändert nach Malczyk et al.⁷⁰.

Die Reaktion der Lunge auf akute (wenige Sekunden) und anhaltende Hypoxie (mehrere Stunden) kann im Modell der isolierten, ventilierten und blutfrei-perfundierten Lunge (ILU) untersucht werden. Untersuchungen zeigen, dass Hypoxie zu einer reversiblen, bi-phasischen Zunahme des pulmonalen Gefäßwiderstands (*pulmonary vascular resistance*, PVR) führt^{12; 71; 72}. Die erste, akute Phase hält 10 bis 15 Minuten an und wird von einer zweiten, anhaltenden Phase, die einige Stunden dauern kann, gefolgt^{60; 66; 73–76} (**Abbildung 6**).

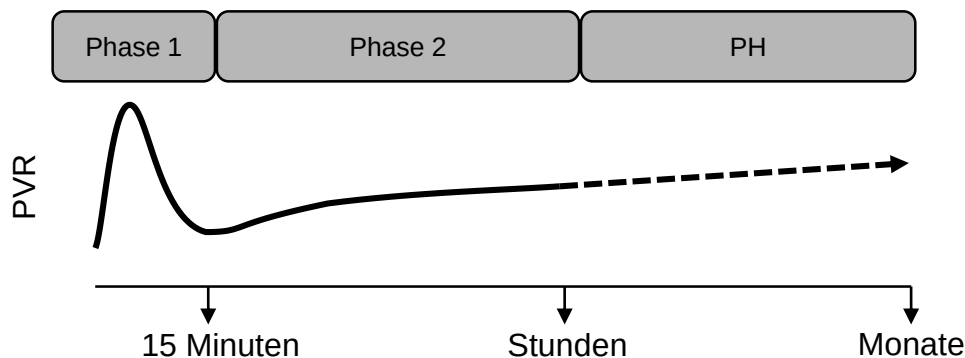


Abbildung 6: Einfluss von Hypoxie auf den pulmonalen vaskulären Widerstand.

Hypoxie-Exposition der Lunge löst einen bi-phasischen Anstieg des pulmonalen vaskulären Widerstands (*pulmonary vascular resistance*, PVR) der Gefäße durch Vasokonstriktion aus, welche als hypoxische pulmonale Vasokonstriktion bekannt ist. Die erste Phase erfolgt als Antwort auf akute Hypoxie. Auf diese Phase folgt eine zweite Phase, die bei anhaltender Hypoxie zu beobachten ist. Bei anhaltender Hypoxie manifestiert sich dauerhaft ein erhöhter Widerstand, welcher als pulmonale Hypertonie (PH) bezeichnet wird. Verändert nach Ward und McMurtry⁷⁷.

Die HPV wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, zu denen das Geschlecht, vasoaktive Substanzen, der pH-Wert, der Partialdruck von CO₂ und Erythrozyten zählen^{78–80}.

Einleitung

Im Gegensatz zur akuten und anhaltenden Hypoxie, resultiert die chronische (über mehrere Stunden, Tage und Wochen), globale Hypoxie in einer irreversiblen Verengung der Gefäße. Dieser Prozess wird durch einen Gefäßumbau (*remodeling*) verursacht⁶⁶. Weiterhin kommt es zur Neomuskularisierung von vorher nicht-muskularisierten pulmonalen Gefäßen^{74; 75} (**Abbildung 7**). Der Gefäßumbau und der damit einhergehende, dauerhaft erhöhte Gefäßwiderstand führt zur Entstehung der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (CHPH)⁸¹. Der Zustand von globaler chronischer Hypoxie wird durch sauerstoffarme Atemluft (Höhenluft) oder durch verminderte Sauerstoffaufnahme in Folge von Erkrankungen [z. B. chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD), Schlafapnoe, Fibrose] verursacht⁸².

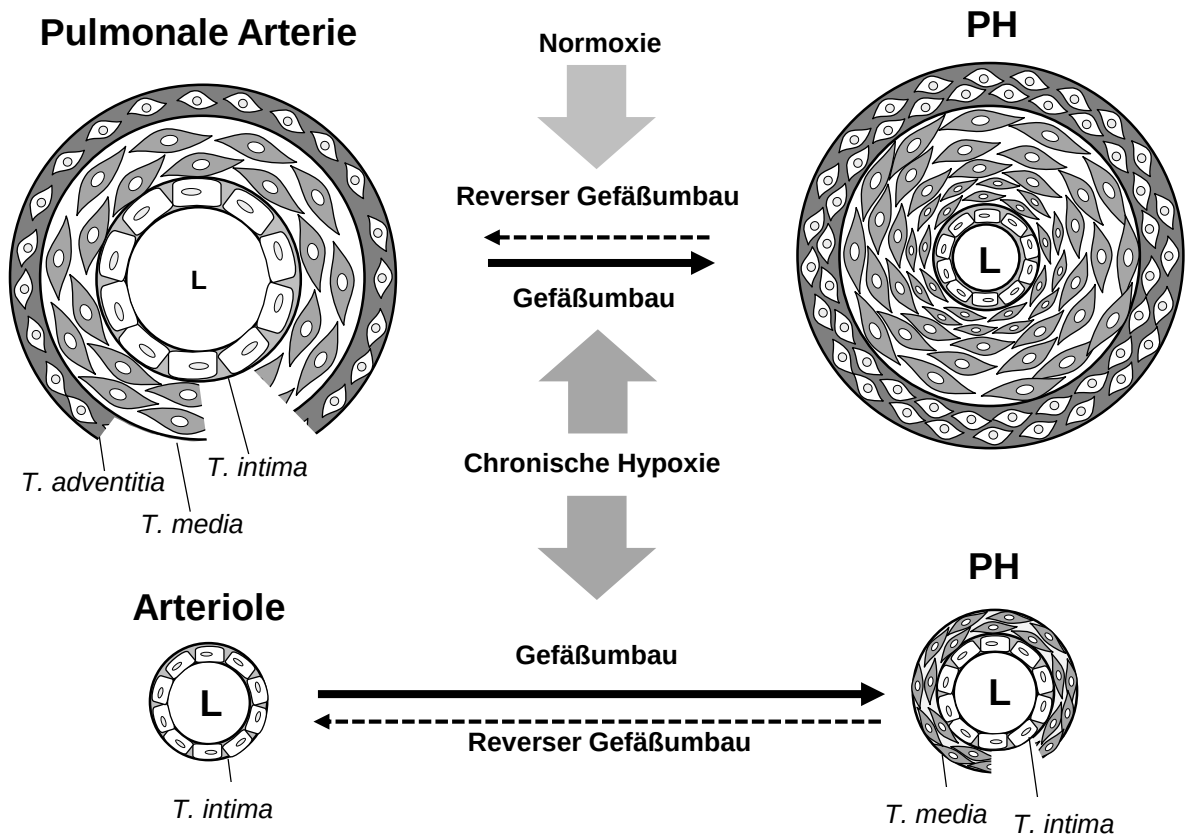


Abbildung 7: Einfluss von chronischer Hypoxie auf pulmonale Arterien.

Die chronische Hypoxie induziert in pulmonalen Arterien und pulmonalen Arteriolen einen Gefäßumbau, der charakteristisch für die pulmonale Hypertonie (PH) ist. Dieser Gefäßumbau ist nur spontan unter Normoxie reversibel. In pulmonalen Arterien kennzeichnet sich der Gefäßumbau durch eine verdickte *Tunica adventitia* und eine verdickte *Tunica media*. In pulmonalen Arteriolen wird die Einwanderung von Muskelzellen beobachtet, sodass sich eine *Tunica media* bildet. L: Lumen, T: *Tunica*. Verändert nach Malczyk et al.⁷⁰.

Einleitung

1.3.1 Mechanismus der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV)

Die der HPV zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind bisher nicht entschlüsselt. In der ersten Phase der HPV spielen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cells*, PASM) eine wichtige Rolle^{83–86}, indem sie auf akute Hypoxie mit einer Kalzium-abhängigen Kontraktion reagieren^{60; 87–91}. Hypoxie-Exposition führt dabei zur verminderten Leitfähigkeit von Kaliumkanälen (K^+ -Kanäle)⁹². Der zugrundeliegende Mechanismus, welcher zur Hypoxie-vermittelten Hemmung der K^+ -Kanäle führt, ist unklar^{93; 94}. Die verminderte intrazelluläre Kaliumkonzentration ($[K^+]_i$) führt zu einer Membrandepolarisation^{95–97}, die einen Einstrom von Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) durch spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle (*voltage-dependent calcium channel*, VDCC), insbesondere durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, zur Folge hat^{98; 99}. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) führt zu einer Kontraktion der PASM durch eine Ca^{2+} -induzierte Phosphorylierung von leichten Myosinketten^{100; 101}. Neben den VDCC kann Ca^{2+} auch durch nicht-selektive Kationen-Kanäle (*non-selectiv cation channel*, NSCC), die in Speicher-aktivierbare (*store-operated channel*, SOC) und Rezeptor-aktivierbare Kanäle (*receptor-operated channels*, ROC) gliedert werden, einströmen^{102; 103}. Zu diesen NSCC zählen Proteine der *transient receptor potential* (TRP) Proteinfamilie^{103–105}.

Die zweite anhaltende Phase der HPV ist von Änderungen in der Ca^{2+} -Konzentration unabhängig^{60; 106; 107}. Vielmehr ist sie mit einer durch die Aktivierung von Rho-Kinasen-verbundenen Ca^{2+} -Sensibilisierung assoziiert^{108–110}, welche zum erhöhten PVR beiträgt^{111–113}. Des Weiteren ist die zweite anhaltende Phase mit einer gesteigerten Kontraktionsfähigkeit der PASM verbunden¹¹⁴. Im Gegensatz zur akuten Phase der HPV sind die pulmonalarterielle Endothelzellen (*pulmonary arterial endothelial cells*, PAEC) hauptsächlich von Bedeutung^{83–86}.

1.4 Pulmonale Hypertonie (PH)

Als pulmonale Hypertonie (PH) werden Erkrankungen bezeichnet, die durch eine Zunahme des Gefäßwiderstands mit einer mittlerer pulmonalarterieller Druckerhöhung (≥ 25 mmHg, Hypertonie) in Ruhe gekennzeichnet sind¹¹⁵. Jährlich erkranken 15 bis 50 Menschen pro einer Million an der PH¹¹⁶. Damit ist die Prävalenz im Vergleich zu anderen Erkrankungen niedrig, es gibt jedoch Formen der PH, die bei manchen Patienten gehäuft auftreten (z. B. Patienten mit systemischer Sklerose 7-12%)^{117; 118}.

Die PH wird in vier Schweregrade (funktionelle Klasse) von der Weltgesundheitsorganisation

Einleitung

(world health organisation, WHO) gegliedert¹¹⁹. So zeigen die Patienten der Klasse I keine Einschränkungen bei normaler physikalischer Aktivität, während die Patienten der Klasse II unter übermäßiger Dyspnoe, unter Fatigue, Brustschmerzen oder drohender Synkope leiden. Die Patienten der Klasse III verspüren in Ruhe keine Symptome, geringe physikalische Aktivität löst bereits übermäßige Dyspnoe, Fatigue, Brustschmerzen oder drohende Synkope aus, während Patienten der Klasse IV bereits in Ruhe Dyspnoe und/oder Fatigue bekommen. Diese Patienten sind unfähig körperliche Aktivitäten ohne Symptome durchzuführen. Die Diagnose von PH erfolgt meistens im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf¹²⁰.

1.4.1 Klassifikation der PH

Die PH wird nach ihrer Ätiologie in fünf Gruppen eingeteilt (Nizza-Klassifikation 2013, 5te Weltkonferenz der WHO), die ihrerseits weiter aufgeteilt sind (**Tabelle 1**)¹. Die unterschiedlichen Gruppen der PH teilen similäre pathologische Befunde und gleichartige hämodynamische Merkmale. Allen PH Formen sind die strukturellen Veränderungen im pulmonalen Gefäßsystem gemeinsam, die mit der übermäßigen pulmonalen Vasokonstriktion und dem Gefäßumbau verbunden sind. Die Veränderungen führen zur Erhöhung des PVR, wodurch es zur erhöhten Nachlast des rechten Ventrikels kommt. In Folge dessen hypertrophiert der rechte Ventrikel und wird schließlich insuffizient (*Cor pulmonale*)¹²¹. Die einzelnen PH Gruppen unterscheiden sich jedoch in ihren pathologischen^{121; 122} und pathobiologischen Ursachen^{123–125}.

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der PH (2013, Nizza, verändert nach Simonneau et al.¹).

I. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

1. Idiopathische PAH (IPAH)
2. Heritäre PAH
 - 2.1. Knockenmorphogenetischer Protein (bone morphogenic protein, BMP) Rezeptor Typ 2
 - 2.2. Activin receptor-like Kinase 1 (ALK-1), Endoglin, Smad9, Caveolin-1, K⁺-Kanal der Subfamilie K Mitglied 3
 - 2.3. Unbekannt
3. Arzneimittel- und toxininduziert
4. Assoziierte PAH bei
 - 4.1. Kollagenosen (Bindegewbserkrankung)
 - 4.2. Humane Immundefizienz-Virus (HIV)-Infektion
 - 4.3. Portaler Hypertonie
 - 4.4. Angeborenen Herzfehler
 - 4.5. Schistosomiasis
- 1° Pulmonale venookklusion Erkrankung und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose
- 1° Persistierende PH des Neugeborenen

II. PH bei Erkrankungen des linken Herzens

1. Linksventrikuläre systolische Dysfunktion

Einleitung

2. Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion
3. Herzklappenerkrankungen (Mitralklappen- oder Aortenklappenfehler)
4. Angeborene/erworbene Ein-/Ausflussobstruktion des linken Herzens und erbliche Kardiomyopathie

III. PH bei Erkrankungen und/oder Hypoxie

1. COPD
2. Interstitielle Lungenerkrankung
3. Andere restriktiv und obstruktiv gemischte pulmonale Erkrankungen
4. Schlafapnoe-Syndrom
5. Alveoläres Hyperventilationssyndrom
6. Chronische Höhenkrankheit
7. Pulmonale Fehlentwicklung

IV. PH aufgrund chronischer Thromboembolien (CTEPH)

V. PH mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen

1. Hämatologische Erkrankungen: Chronisch hämatologische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Zustand nach einer Splenektomie
2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonaler Langerhanszellenhistozytose, Lymphangioleiomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
3. Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
4. Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronischer Niereninsuffizienz, segmentale PH

Die prä-kapilläre **PH der Gruppe 1** (pulmonalarterielle Hypertonie, PAH, **Tabelle 1**) ist eine seltene Erkrankung mit bis zu 12 neuen Erkrankungen unter einer Million Menschen im Jahr¹²⁶. PAH ist durch histologisch nachweisbare Verdickung der pulmonalarteriellen Gefäßwände, besonders der kleinen und der distalen pulmonalen Arterien (Durchmesser $>500 \mu\text{m}$ ¹²⁷), durch plexiforme Läsionen und durch schwere hämodynamische Veränderungen (Erhöhung des PVR) charakterisiert^{1; 2}.

Die PAH wird in mehrere Untergruppen eingeteilt (**Tabelle 1**) und hat multifaktorielle Ursachen^{1; 119}. Während die idiopathische PAH (IPAH) spontan und bei nur zwei bis drei Personen pro einer Million Einwohner auftritt¹²⁸, wurde in 80% aller erblichen PAH Fällen Mutationen im knochenmorphogenischen Protein (*bone morphogenic protein*, BMP) Rezeptor Typ 2-Gen nachgewiesen¹²⁹, welches BMP [transformierende Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* , TGF- β) Superfamilie] bindet. 5% aller Fälle weisen Mutationen in anderen Proteinen der TGF- β -Familie auf¹³⁰ sowie im Endoglin-Gen¹³¹ oder im Smad9-Gen¹³². Kürzlich wurden Mutationen in Proteinen, wie Calveolin¹³³ und K⁺-Kanal der Subfamilie K Mitglied 3¹³⁴ nachgewiesen, welche indirekt im Zusammenhang mit dem TGF- β Signalweg stehen.

Bestimmte Medikamente, wie Appetitzügler (Aminorex, Fenfluramin), Antidepressiva (Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer) sowie Drogen (Amphetamine, Methamphetamine, Kokain), können PAH verursachen und stellen Risikofaktoren dar¹. Des Weiteren ist PAH mit Bindegewebserkrankungen (assoziierte PAH; Prävalenz von 7-12% bei

Einleitung

Sklerodermapatienten)^{117; 118}, der humanen Immundefizienz-Virus (HIV)-Infektion (Prävalenz von 0,5%)¹³⁵, der portalen Hypertonie (Portopulmonale Hypertonie; Prävalenz von 2-6%)^{136; 137}, angeborenen Herzfehlern (*congenital heart disease*, Prävalenz von 10%)¹³⁸ und der Schistosomiasis (*schistosomiasis-associated PH*) assoziiert (**Tabelle 1**).

Gruppe 2 PH der WHO-Klassifizierung (**Tabelle 1**) ist mit Erkrankungen des linken Herzens assoziiert und ist die am häufigsten vorkommende Form der PH¹²⁶. Charakteristisch sind eine Vergrößerung und eine Verdickung der pulmonalen Venen sowie eine Dilatation des pulmonalen Kapillarsystems. Es kommt zu interstitiellen Ödemen, alveolaren Hämorrhagien (Blutung), Vergrößerung der lymphatischen Gefäße und Lymphknoten. Auch in dieser Form der PH kann es zur Hypertrophie der *Tunica media* und der *Tunica intima* kommen¹¹⁹.

PH der Gruppe 3 der WHO-Klassifizierung ist mit Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie (CHPH) assoziiert (**Tabelle 1**). PH der Gruppe 3 tritt am zweithäufigsten auf¹²⁶. Kennzeichnend für Gruppe 3 PH ist die Hypertrophie der *Tunica media* und die Proliferation der intimalen Zellen in den distalen pulmonalen Arterien^{119; 139} sowie die Neomuskularisierung^{92; 140–143}. Es gibt mannigfache Ursachen für die Entstehung der PH der Gruppe 3¹¹⁹. Im Wesentlichen sind die anhaltende HPV, der mechanische Stress durch Lungenüberblähung, der Verlust von Kapillargefäßen, die Entzündungsprozesse (Inflammation) und die toxischen Effekte von verschiedenen Substanzen (Zigarettenrauch) Auslöser. Ein Ungleichgewicht von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren des Endothels wird ebenfalls vermutet¹¹⁹. Die PH der Gruppe 3 ist assoziiert mit Lungenerkrankungen, wie der COPD, der idiopathischen Lungenerkrankung und der idiopathischen Lungenfibrose. Genetische Ursachen könnten ebenfalls eine Rolle in der Krankheitsentstehung spielen. Umstritten ist, ob die mit Lungenerkrankungen assoziierte PH durch die Erkrankungen verursacht wird (Gruppe 3) oder sich unabhängig von diesen entwickelt (Gruppe 1)¹⁴⁴. Die PH der Gruppe 3 ist außerdem mit Hypoxie assoziiert. Bei globaler und anhaltender Hypoxie kommt es zur dauerhaften Aktivierung der HPV¹³⁹ und intimaler Obstruktion in den distalen pulmonalen Arterien¹¹⁹. Der Schweregrad der PH ist gering bis mittel (milde Form der PH)^{145; 146}. Schwere Formen mit einem mittleren PAP von mehr als 40 mmHg¹⁴⁷ und der Bildung von intimalen Läsionen werden unter „*out-of proportion*“ zusammengefasst¹⁴⁸. Die schweren Formen der PH sind durch einen stärkeren Grad des Gefäßumbaus charakterisiert¹⁴⁸. Die Mortalität durch Rechtsherzversagen ist zudem erhöht³. Vermutlich wird diese schwere Form der „nicht traditionellen hypoxischen PH“ durch weitere Faktoren außer Hypoxie ausgelöst³. In der **Gruppe 4 PH** der WHO-Klassifizierung (**Tabelle 1**) werden Erkrankungen zusammengefasst, die mit chronischer Thromboembolie assoziiert sind (CTEPH). Es kann

Einleitung

zwischen proximalen und distalen Formen der CTEPH nicht unterschieden werden. Charakteristisch kommt es durch Thromben zu Läsionen bis hin zum völligen Verschluss der pulmonalen Arterien¹⁴⁹. Obwohl die Ursache weitgehend unklar ist, sind Defekte im Koagulationssystem vermutlich involviert¹⁵⁰. In der **Gruppe 5 PH** der WHO-Klassifizierung werden alle Formen der Erkrankung erfasst, die keinen eindeutigen Auslöser haben und denen ein multifaktorieller Mechanismus zugrunde liegt. Die PH tritt in unterschiedlichen Erscheinungen auf, wozu hämatologische, systemische, metabolische Erkrankungen und andere seltene Erkrankungen zählen¹¹⁹.

Auf die PH der Gruppen 2, 4 und 5 wird in der vorliegenden Arbeit nicht weiter eingegangen.

1.4.2 Charakteristische Veränderungen im pulmonalvaskulären Gefäßumbau

Die PH ist eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung, die mit einem strukturellen Gefäßumbau verbunden ist¹⁵¹. Dieser Gefäßumbau findet charakteristisch in allen drei Schichten, der *Tunica intima*, der *Tunica media* und der *Tunica adventitia*, statt². In diesen Schichten kommt es in den jeweils dominanten Zelltypen zu erhöhter Proliferation (Hyperplasie), erhöhtem Zellwachstum (Hypertrophie) und gesenkter Apoptose^{93; 152}. Die Folgen sind die Minderung des Gefäßdurchschnitts, die Steigerung des PVR und die Verdickung der Gefäßwände^{3; 119; 121; 153}. Zusätzlich kommt es zur Muskularisierung von zuvor nicht- und/oder partiell-muskularisierten peripheren Arterien^{140–143; 152}. Durch Ablagerung von extrazellulären Matrix-Komponenten, wie Kollagen, Elastin und Fibronectin¹⁵², sinkt die Dehnbarkeit bzw. Elastizität (*Compliance*) in den großen pulmonalen Arterien, wodurch es zur Erhöhung der Nachlast des rechten Ventrikels kommt¹⁵⁴. Die Folgen sind erhöhter PAP und erhöhter PVR.

Neben den beschriebenen Veränderungen im Gefäßbett kommt es in einigen Formen der PH zur Ausbildung von plexiformen¹⁴³ und neointimalen Läsionen¹⁵². Zudem wurde eine, in der Literatur umstrittene, verminderte Anzahl an Gefäßen in Lunge mit PH beschrieben¹⁵².

1.4.2.1 Die *Tunica intima*

Die Veränderungen in der *Tunica intima* sind im Vergleich zu den anderen Schichten am schwächsten ausgebildet^{155–159}, die Rolle der Endothelzellen (*endothelial cells*, EC) in dieser Schicht spielt jedoch eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der PH^{153; 160}. In der *Tunica intima*

Einleitung

kommt es zur Endothelschädigung, zur Proliferation der EC, zu subendothelialen Ödemen und zur intimaler Fibrose, verursacht durch Kollagen- und Elastin-Ablagerung^{155; 157–159; 161; 162}.

Scherstress kann die Integrität der Endothelschicht und somit die Barriere zur *Tunica media* und *Tunica adventitia* zerstören¹⁶³. Die Schädigung führt zur Durchlässigkeit der Barriere und begünstigt dadurch den Kontakt der Zellen beider Schichten mit pro-proliferativen Mediatoren, wie dem Fibroblasten Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*, FGF) und dem vaskulären Endothelwachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF)¹⁶⁴, was zu charakteristischen pathologischen Veränderungen in den anderen zwei Schichten führen kann^{165; 166}. Durch die zunehmende Durchlässigkeit der Endothelbarriere kommt es außerdem zu subendothelialen Ödemen³. Endothelzellschädigungen werden außerdem mit der Thrombosebildung assoziiert. Neben der Proliferation der EC kommt es zur Bildung von plexiforme Läsionen durch (Myo)Fibroblasten-ähnliche Zellen^{2; 119; 167; 168}.

Die physikalischen und biochemischen Eigenschaften der Gefäße werden außerdem durch endotheliale vasoaktive Mediatoren, freigesetzt durch Scherstress, Infektionen oder alveoläre Hypoxie, verändert¹⁶⁶. Dies führt zur Erhöhung des pulmonalen Blutdrucks¹⁶⁶ und letztendlich zur Einlagerung von Bindegewebe in die Gefäßwände¹⁶⁹.

1.4.2.2 Die *Tunica media*

Die Veränderungen der *Tunica media* im vaskulären Gefäßumbau spielen eine maßgebliche Rolle⁹³ und werden durch eine Imbalance zwischen Proliferation und Apoptose der PASMC verursacht¹⁷⁰. In der IPAH verdickt sich die *Tunica media* durch abnormale Proliferation der PASMC von 10 bis 15% auf 30 bis 60% und stellt ein wichtiges Merkmal der Erkrankung dar^{93; 171}. In Bereichen gesteigerter Muskularisierung sind neointimale Läsionen durch glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) und extrazelluläre Matrixproteine beschrieben worden^{123; 166}. In schweren Fällen besteht die Neointima aus Myo-Fibroblasten und extrazellulärer Matrix, die zwischen den EC und der *Tunica intima* lokalisiert ist¹²³. Es kommt außerdem zu Neubildung von SMC aus Vorläuferzellen¹⁵². Neben der abnormalen Muskularisierung der Gefäße kann eine Neomuskularisierung von nicht- oder partiell-muskularisierten, peripheren Gefäßabschnitten, induziert durch die PASMC Migration, beobachtet werden^{172–175}.

Die pathologischen Veränderungen in der *Tunica media* werden höchstwahrscheinlich durch Mediatoren, wie Endothelin-1 (ET-1), Serotonin und die $[Ca^{2+}]_i$ induziert^{176–179}. Zudem fördern Wachstumsfaktoren, wie VEGF, einfacher Fibroblasten Wachstumsfaktor (*basic fibroblast growth factor*, bFGF), transformierender Wachstumsfaktor- α (*transforming growth factor- α* ,

Einleitung

TGF- α), thombozyten-abstammender Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor*, PDGF) und blutbildender Wachstumsfaktor (*hematopoietic growth factor*, HGF), die Proliferation und das Zellwachstum der PASMC^{129; 180–185}. In dem Prozess sind die Wechselbeziehungen zwischen EC (*Tunica intima*) und SMC (*Tunica media*) nicht zu vernachlässigen^{123; 177; 186}.

1.4.2.3 Die *Tunica adventitia*

Auch in der *Tunica adventitia* kommt es zu einer abnormalen Proliferation des für diese Schicht typischen Zelltyps, den Fibroblasten (FB), wodurch es zur Fibrose kommt^{152; 187}. Außerdem können sich die proliferierenden FB in SMC dedifferenzieren, die *Tunica media* infiltrieren¹⁷¹ und die Proliferation der PASMC in der *Tunica media* begünstigen¹⁷¹.

1.4.3 Mechanismus des vaskulären Gefäßumbaus

Trotz intensiver Untersuchungen der Hypoxie-abhängigen Mechanismen in den letzten Jahrzehnten, konnte weder ein Sauerstoff-Sensor noch essentielle Signalwege vollständig identifiziert werden, die essentiell für den Gefäßumbau sind^{60; 66; 188–191}. An den pathologischen Veränderungen der Gefäße sind diverse biochemische Signalwege beteiligt¹⁵¹, die mit vasoaktiven Substanzen, Wachstumsfaktoren, inflammatorischen Mediatoren, der Ionenhomöostase, reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), Proteasen und Elastasen sowie mechanischen Faktoren assoziiert werden können (**Abbildung 8**).

Einleitung

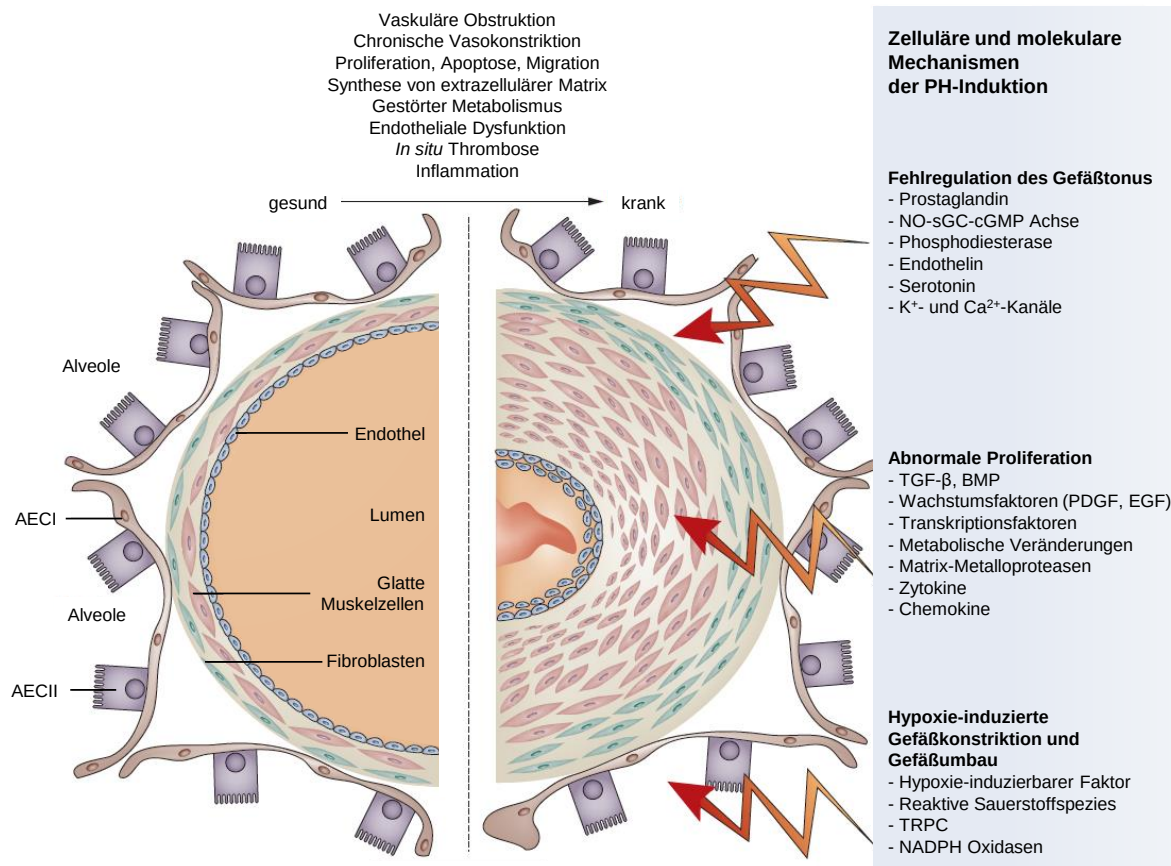


Abbildung 8: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Gefäßveränderung in der PH.

Auf der linken Seite ist das gesunde Gefäß umgeben von Alveolen abgebildet. Dargestellt sind die drei Gefäßschichten sowie die alveolaren Epithelzellen Typ I (*alveolar epithelial cells type I*, AEC I) und Typ II (*alveolar epithelial cells type II*, AEC II). Auf der rechten Seite sind mögliche pathologischen Veränderungen, wie sie während der PH auftreten können, abgebildet. Hierzu zählen eine erhöhte Proliferation der glatten Muskelzellen, der Fibroblasten und der Endothelzellen, wodurch es zur Verengung des Gefäßlumens und zur Erhöhung des Gefäßwiderstands kommt. In der rechten Spalte sind die möglichen Einflussfaktoren aufgelistet, die zur Fehlregulation des Gefäßtonus, zur abnormalen Proliferation, zur Hypoxie-induzierten Gefäßkonstriktion und zum Hypoxie-induzierten Gefäßumbau führen können. BMP: *bone morphogenetic protein* (knochenmorphogenetisches Protein); Ca²⁺: Kalziumionen; cGMP: *cyclic guanosinmonophosphate* (zyklisches Guanosinmonophosphat); EGF: *endothelial growth factor* (endothelialer Wachstumsfaktor); K⁺: Kaliumionen; NADPH: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat; NO: *nitric oxide* (Stickstoffmonoxid); sGC: *soluble guanylyl cyclase* (lösliche Guanylatcyclase); TGF- β : *transforming growth factor β* (transformierender Wachstumsfaktor β); PDGF: *platelet-derived growth factor* (thrombozyten-abstammender Wachstumsfaktor); TRPC: *classical transient receptor potential* (klassischer transient receptor potential). Verändert nach Schermuly et al.².

1.4.3.1 Hypoxie

Im Zusammenhang mit Hypoxie kommt dem HIF-Signalweg in der CHPH eine zentrale Rolle zu. Der Hypoxie-induzierten Faktors 1 (HIF-1)-Komplex setzt sich aus zwei Untereinheiten, der α - und der β -Untereinheit, zusammen. Während die β -Untereinheit (HIF1- β) konstitutiv exprimiert wird, wird die α -Untereinheit unter Normoxie an zwei Prolyl-Resten durch die Prolyl-Hydroxylase (PHD) hydroxyliert, durch das von-Hippel-Lindau-Protein polyubiquitiniert und dann durch Proteasomen abgebaut^{192; 193}. Unter Hypoxie ist die Aktivität

Einleitung

der PHD inhibiert, wodurch die α -Untereinheit, welche in drei Isoformen 1 α (HIF-1 α), 2 α (HIF-2 α) und 3 α (HIF-3 α) vorkommt¹⁹⁴, nicht abgebaut wird¹⁹⁵. Der so entstehende heteromere Komplex wird gebildet, transloziert in den Nukleus und reguliert die Expression vieler Gene (z. B. VEGF^{196; 197}) durch Binden an *hypoxia responsive elements*^{198; 199} (**Abbildung 9**). HIF-1 α kann durch TGF- β ²⁰⁰, Insulin^{201; 202}, epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF)²⁰³, PDGF und Angiotensin II (AngII)²⁰⁴, bFGF²⁰⁵ sowie ET-1²⁰⁶ aktiviert und/oder stabilisiert werden.

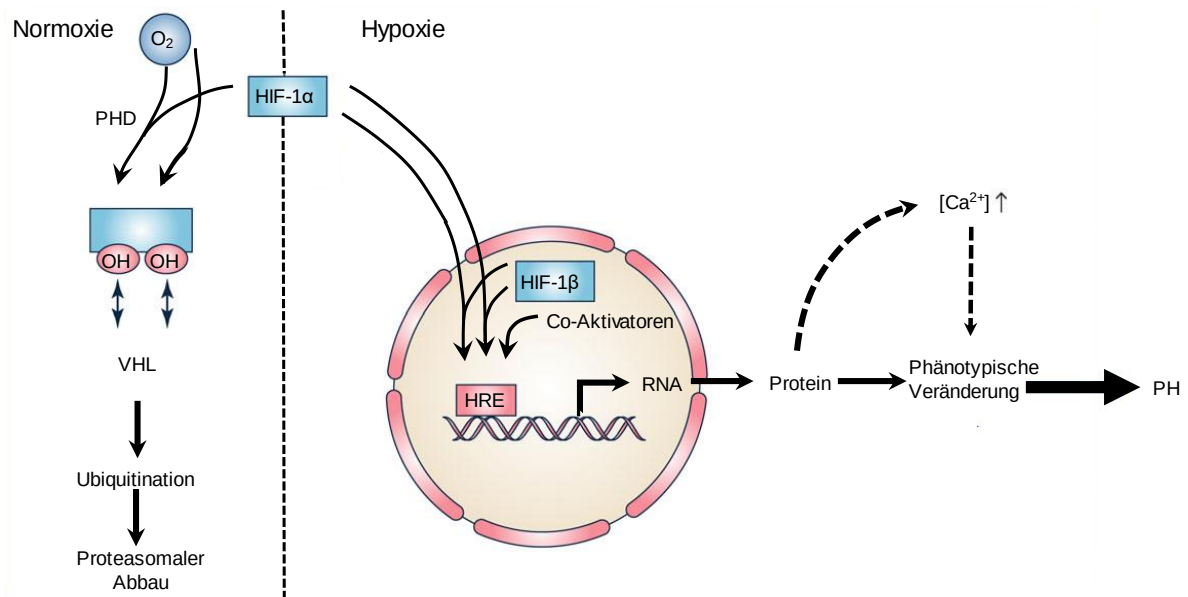


Abbildung 9: HIF-1 α im Zusammenhang mit CHPH.

Unter Normoxie wird der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF)-1 α durch die Prolyl-Hydroxylase (PHD) hydroxyliert, durch das von-Hippel-Lindau (VHL)-Protein polyubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Unter Hypoxie wird die PHD-Aktivität gehemmt und somit der HIF-1 α Abbau inhibiert. HIF-1 α kann dadurch in den Nukleus translozieren und mit HIF-1 β sowie anderen Co-Aktivatoren einen Transkriptionskomplex bilden, welcher an *hypoxia responsive elements* (HRE) bindet und die Expression von verschiedenen Genen initiiert. Die Expression bestimmter Gene führt zu phänotypischen Veränderungen und beeinflusst die Ca^{2+} -Homöostase. Dies führt zur Entstehung u. a. der pulmonalen Hypertonie (PH). Ca^{2+} : Kation-Ionen; O_2 : Sauerstoff; OH: Hydroxy-Gruppe; RNA: *ribonucleine acid* (Ribonukleinsäure). Verändert nach Veith et al.²⁰⁷

HIF-1 α spielt in Tiermodellen bei der Entstehung der CHPH eine wichtige Rolle^{139; 198; 208}. So zeigen HIF-1 $\alpha^{-/+}$ Mäusen ein vermindertes Proliferationsverhalten der PASMC¹⁹⁸ sowie einen reduzierten Gefäßumbau²⁰⁸. HIF-1 α beeinflusst den Gefäßumbau möglicherweise über die Regulation des Ca^{2+} -Signalweges²⁰⁹ sowie über die pH-Homöostase, die mit Na^+/H^+ Austauschern (Na^+/H^+ exchanger, NHE) assoziiert ist^{208; 210}.

Hypoxie hat außerdem einen inhibierenden Einfluss auf die Freisetzung von anti-mitogenen Faktoren (z. B. Prostaglandin) und induziert die Freisetzung von pro-mitogenen Faktoren (z. B. VEGF, bFGF, ET-1 und PDGF)^{92; 193; 211}, wodurch es zu einem Ungleichgewicht zwischen anti- und pro-mitogenen Faktoren kommt.

Einleitung

1.4.3.2 Vasoaktive Substanzen

Im Zusammenhang mit der Pathogenese der PH ist ein Ungleichgewicht von vasoaktiven Substanzen beschrieben worden^{127; 172}. Das Gleichgewicht verschiebt sich von den vasodilatativen und anti-proliferativen Substanzen hin zu den vasokonstriktiven und pro-proliferativen Substanzen. Vasokonstriktoren, wie ET-1, Thromboxan, Serotonin und AngII, werden in der PH verstärkt ausgeschüttet^{2; 176; 177; 212–214}. ET-1²¹⁴ und Serotonin^{176; 177; 215} sind zudem am Proliferationsprozess beteiligt. Einige vasoaktive Mediatoren wie z. B. Serotonin, scheinen außerdem die Wirkung von Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF, FGF) durch synergetische Effekte zu verstärken²¹⁶. Eine besondere Stellung nimmt der vasoaktive Mediator ET-1 ein. ET-1 kann neben der Proliferation auch die Migration von PASMC induzieren²¹⁴ und über diverse Signalwege die K^+ -Kanal Expression inhibieren, die $[Ca^{2+}]_i$ erhöhen und die Aktivität von Rho-Kinasen²¹⁷ und NHE regulieren^{218–220}.

Vasodilatoren, wie Prostaglandin I_2 ^{212; 213; 221}, Stickstoffmonoxid (NO) und zyklisches Guanosinmonophosphat^{222; 223}, werden hingegen in der PH vermindert freigesetzt. Sowohl die NO-Produktion durch PAEC in PAH Lungen^{224–226} als auch die Prostaglandin I_2 -Freisetzung in PAH Patienten^{221; 227} sind vermindert. Im Gegensatz zu ET-1 und Serotonin inhibieren NO und Prostaglandin I_2 die DNA-Synthese und sind mit einer reduzierter Proliferation assoziiert^{228–230}. Außerdem besitzen NO und Prostaglandin I_2 inhibierenden Effekte auf Wachstumsfaktoren wie PDGF und ET-1^{231–233}.

1.4.3.3 Wachstumsfaktoren

Neben der Dysregulation von vasoaktiven Substanzen werden auch Wachstumsfaktoren mit der Pathogenese der PH assoziiert.

Die PDGF-Bildung ist in IPAH Patienten erhöht¹⁸⁰ und spielt in verschiedenen Tiermodellen eine Rolle. So ist die PDGF α - und die PDGF β -Expression in Mauslungen nach chronischer Hypoxie-Exposition²³⁴ sowie die PDGF-Rezeptor Expression bei Lämmern mit PH erhöht². Das Inhibieren des PDGF-Rezeptors in Monocrotalin (MCT)-behandelten Ratten führt zu einer verminderten Sterblichkeit der Versuchstiere². Darüber hinaus induziert PDGF den TGF- β Signalweg²³⁵, der im Zusammenhang mit der PH steht^{2; 123; 236–239}. Es wurde eine vermehrte Expression von TGF- β in PASMC aus IPAH Patienten sowie in Mauslungen nach chronischer Hypoxie-Exposition nachgewiesen²³⁴.

Neben PDGF und TGF- β spielt der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (*insulin-like growth factor 1*, IGF-1) Signalweg in der neonatalen Hypoxie-induzierter PH in der Maus im Prozess

Einleitung

des Gefäßumbaus eine Rolle²⁴⁰. IGF-1 wird nach Hypoxie-Exposition in PAEC und PASMC aktiviert, reguliert die ET-1-Expression²⁴⁰ und induziert die Expression von HIF-1 α auf mRNA Ebene²⁴¹.

Es wurden außerdem Veränderungen in der Expression und der Freisetzung von VEGF in der PH beschrieben. VEGF und der VEGF-Rezeptor wurden in plexiformen Läsionen in IPAH Patienten beobachtet^{181; 242}. Das Inhibieren des VEGF im hypoxischen Rattenmodell führt zur Entwicklung einer schweren Form der PH unter Ausbildung von Läsionen^{243–246}. VEGF erfüllt vermutlich eine protektive Funktion, indem der Wachstumsfaktor das Überleben und die Differenzierung der EC fördert¹⁶⁶. VEGF begünstigt aber auch die Bildung von neointimalen Läsionen in lädierten systemischen Gefäßen²⁴⁷.

Weitere Wachstumsfaktoren, denen eine Bedeutung in der PH oder in Tiermodellen der PH zugeschrieben wird, sind AngII und EGF. AngII führt zur Proliferation der Zellen in den kleinen pulmonalen Arterien und wird über den AngII-Rezeptor des Subtyps 1 vermittelt. In hypoxischen Ratten erhöhten sich die Rezeptorinteraktion und Rezeptoranzahl^{248; 249}. Vaskuläre Veränderungen in der Maus sind zusätzlich mit EGF-induzierter Proliferation von SMC assoziiert, die Inhibition von EGF-Rezeptoren zeigt jedoch keinen Effekt auf CHPH in der Maus^{250; 251}. Es kommt jedoch zu Veränderungen in MCT-behandelten Ratten^{252; 253}.

1.4.3.4 Inflammatorische Mediatoren

Patienten mit IPAH zeigen eine chronische Inflammation, in der die Spiegel verschiedener humoraler Mediatoren, wie CP1 (*chemoattractant protein 1*), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin (IL)-1 β und IL-6 erhöht sind^{2; 254–256}. Zudem wurde beschrieben, dass andere Cytokine, wie IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 und IL-12p70, hochreguliert sind²⁵⁶. Cytokine, wie IL-6 und IL-8, können die Funktion der SMC und der EC regulieren und fördern den Gefäßumbau^{107; 194; 257–259}. Außerdem haben sie Einfluss auf die Expression von Wachstumsfaktoren²⁶⁰. Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen und dendritische Zellen, spielen in plexiformen Läsionen in IPAH vermutlich eine Rolle²⁶¹. Eine Akkumulation von Immunzellen wurde in diesen Strukturen beobachtet^{2; 262}, ihre Rolle ist aber unbekannt². Andere Immunzellen, wie Mastzellen, sind im CHPH, IPAH und anderen Formen von Bedeutung^{263–267}. Die Rolle von Makrophagen ist bislang unbekannt³. Die Inflammation kann in allen Tiermodellen der PH beobachtet werden, der Grad der Inflammation ist jedoch Spezies-abhängig. In der Maus ist die Inflammation am schwächsten ausgeprägt und bereits in einer frühen Phase der PH vollständig reversibel^{155; 268; 269}.

Einleitung

1.4.3.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Eine Dysregulation der Generierung von ROS wird ebenfalls mit der Entwicklung der PH assoziiert^{270; 271}. Die genaue Rolle von ROS ist weitgehend unklar. Ob die CHPH mit einer Erhöhung^{271–274} oder einer Senkung^{187; 275–277} des ROS-Levels zusammenhängt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. ROS ist ein wichtiges Signalmolekül in Hypoxie-induzierten zellulären Mechanismen^{60; 66; 278}. So werden durch ROS verschiedene Wachstumsfaktoren²⁷⁹, Cytokine und Chemokine²⁸⁰ induziert und verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie HIF-1 α ^{281; 282}, aktiviert. ROS spielt in einer Vielzahl von Prozessen, wie Differenzierung²⁸³, Proliferation²⁷¹, Apoptose²⁸⁴, Migration²⁸⁵ und Sekretion von Insulin²⁸⁶, eine Rolle. ROS werden von diversen Zelltypen (z. B. EC, SMC, Neutrophilen, Makrophagen, Epithelzellen) unter anderem durch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Oxidasen (NOX), Cytochrom p450 und Xanthin-Oxidasen und durch die Elektronentransportkette freigesetzt^{287; 288}.

1.4.3.6 Mechanische Veränderungen

Während der PH kommt es zu mannigfaltigen mechanischen Veränderungen, die Einfluss auf den Gefäßumbau haben können. Zu diesen mechanischen Faktoren zählen erhöhter Druck, Streckung/Ausdehnung und Scherstress^{152; 289}. Diese mechanischen Reize beeinflussen die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen, wie Kollagen und Elastin¹⁶⁹, die SMC Hypertrophie, die SMC/FB Proliferation²⁹⁰ und die EC Aktivität^{291; 292} sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 und PDGF^{293; 294}. Mechanischer Stress (*flow shear stress*/Scherstress) hat außerdem Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase in den SMC und führt zum [Ca²⁺]_i Anstieg in PASMC. In diesem Zusammenhang werden mechanosensitive Ionenkanäle der Familie TRP diskutiert²⁸⁹.

1.4.3.7 Ionen-Homöostase

Dem Ionenhaushalt wird im Gefäßumbau, welcher die PH charakterisiert, eine essentielle Bedeutung zugesprochen²⁹⁵. Im Normalzustand führen dynamische Änderung der [K⁺]_i und [Ca²⁺]_i zur Modulation des vaskulären Tonus in kleinen Arterien und Arteriolen²⁹⁶.

In PASMC aus IPAH Patienten^{11; 297} sowie in Tiermodellen der PH^{179; 298; 299} wird eine verminderte Expression von spannungsabhängigen K⁺-Kanälen (K_v-Kanäle) beschrieben^{123; 172}. Im Zusammenhang mit erblicher PAH und IPAH wurde außerdem die Mutation des K⁺-Kanals der Subfamilie K Mitglied 3 beschrieben¹³⁴. Die erhöhte [K⁺]_i ist zum einen mit einer verminderten Apoptose assoziiert¹⁷⁹ und führt zum anderen zur Depolarisation der Zelle und

Einleitung

damit zum Ca^{2+} -Einstrom^{300–303}. Der Ca^{2+} -Haushalt spielt im Zusammenhang mit den Veränderungen im Gefäßbett in der PH eine Schlüsselrolle. Der mit dem Gefäßumbau assoziierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ initiiert die Kontraktion, die Migration, die Proliferation und die Hypertrophie der PASMC^{173; 289; 304–306}. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z. B. dem Nukleusfaktor der aktivierten T-Zellen (*nuclear factor of activated T-cells*, NFAT) und AP-1, die die Expression von Ca^{2+} -Kanäle³⁰⁷, proliferativen Proteinen³⁰⁸ und anderen Genen³⁰⁹ induzieren. Außerdem werden die pathologischen Veränderung im Ca^{2+} -Haushalt mit veränderten Expression und/oder Funktion von Ca^{2+} -Kanälen, Ca^{2+} -bindenden Proteinen und Transportmechanismen assoziiert^{60; 307}. Sowohl VDCC als auch NSCC, insbesondere klassischen *transient receptor potential* (TRPC), sind im Zusammenhang mit der Dysregulation der Ca^{2+} -Homöostase in der PH beschrieben^{8–13}. Eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in PASMC konnte sowohl in chronischer Hypoxie²⁹⁹ als auch in MCT-behandelten Ratten³¹⁰ und Patienten mit PAH^{29; 311} beobachtet werden.

Eine noch wenig untersuchte Bedeutung in der Pathogenese der PH kommt dem Na^+ und H^+ Haushalt zu. Die NHE-Aktivität ist mit einer Wachstumsfaktor-induzierter Proliferation assoziiert³¹². NHE regulieren hauptsächlich den intrazellulären pH-Wert in PASMC³¹³. In chronisch hypoxischen Versuchstieren ist die Expression der Isoform 1 (NHE1) erhöht^{139; 210}. Die Reduktion der NHE1-Aktivität durch chemische Substanzen³¹⁴ und genetische Modifikation^{315; 316} führt zum reduzierten Hypoxie-induzierten Gefäßumbau sowie zur reduzierten Proliferation und Migration von PASMC³¹⁶.

1.5 *Transient Receptor Potential* (TRP)-Ionenkanäle

TRP-Proteine wurden erstmalig 1969 in der Taufliege *Drosophila melanogaster*³¹⁷ beschrieben. In Säugetieren sind sie in allen Geweben exprimiert und durch eine Vielzahl von Stimuli, wie Pheromone, Geruchstoffe, Temperatur, pH-Wert, Osmolarität, Ca^{2+} und oxidativen Stress, aktivierbar^{64; 318}. Vor allem in der Ca^{2+} -Homöostase spielen TRP-Kanäle eine bedeutende Rolle³¹⁹. Im kardiovaskulären System werden TRP-Proteine mit unterschiedlichen Erkrankungen, wie Fibrose^{320; 321}, Bluthochdruck (Hypertension)³²², Arrhythmien³²³ und Lungenödemen³²⁴, assoziiert.

1.5.1 Die TRP-Superfamilie

Die TRP-Superfamilie umfasst insgesamt 28 TRP-Proteinen, die sich in sechs Subfamilien unterteilen lassen³²⁵. Diese Subfamilien werden nach ihrer Aminosäurehomologie in die

Einleitung

klassischen TRP (TRPC), die vanilloid TRP (TRPV), die melastatin TRP (TRPM), die ankyrin TRP (TRPA), die polycystein TRP (TRPP) und die mucolipin TRP (TRPM) Subfamilie gegliedert^{326; 325}. Eine weitere Untergruppe, die *no-mechanoreceptor potential C transient receptor potential* (TRPN)-Proteine, wurde nur bei *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und Zebrafischen nachgewiesen³²⁷ (**Abbildung 10**).

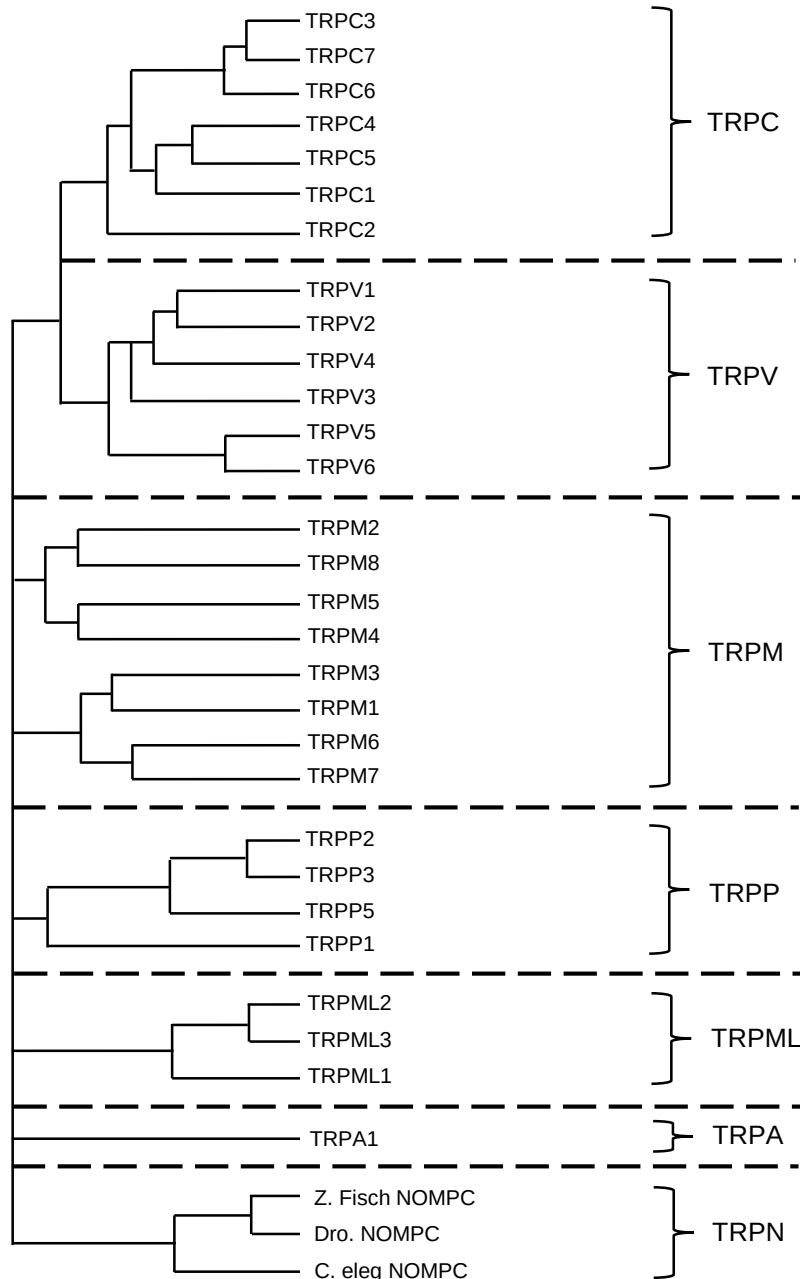


Abbildung 10: Phylogenetischer Baum der TRP-Superfamilie.

Die Subfamilien der TRP-Proteine werden nach ihrer Aminosäurehomologie in die folgenden Subfamilien eingeteilt: klassischer *transient receptor potential* (TRPC), vanilloid *transient receptor potential* (TRPV), melastatin *transient receptor potential* (TRPM), polycystein *transient receptor potential* (TRPP), mucolipin *transient receptor potential* (TRPML) und *no-mechanoreceptor potential C transient receptor potential* (TRPN). C. eleg.: *Caenorhabditis elegans*; Dro.: *Drosophila melanogaster*; Z. Fisch: Zebrafisch. Verändert nach Guibert et al.²⁹⁵.

Einleitung

TRP-Kanäle zählen zu den NSCC, können aber in Abhängigkeit des entsprechenden TRP-Proteins auch selektiv für K^+ , Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} oder selektiv für mono- und/oder divalente Kationen sein³²⁸. Die Ca^{2+} -Permeabilität ist nahezu allen Mitgliedern der TRP-Superfamilie gemeinsam. Sie haben daher fast alle einen wichtigen Einfluss auf Ca^{2+} -abhängige Signalwege¹⁰⁴.

Allen TRP-Proteinen sind sechs Transmembrandomänen (S1-S6) gemeinsam^{105; 318; 328; 329}. Distal der S6 Transmembrandomäne befindet sich bei den Subfamilien TRPC, TRPM und TRPV eine 25 Aminosäuren lange konservierte TRP-Domäne^{105; 329}. Die TRP-Domäne besteht aus zwei stark konservierten TRP-Boxen, welche eine zentrale Sequenz größerer Variabilität flanken. Die Funktion der TRP-Domäne ist unklar, könnte aber der Bindung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2)³³⁰ oder der Interaktion zwischen TRP-Proteinen dienen³³¹. Im intrazellulären Terminus befinden sich einige regulatorische Elemente, Interaktionsstellen und enzymatische Domänen³³². Am N-terminalen Ende sind Alkyrin-Domänen lokalisiert, die spezifisch für TRPC-, TRPV- und TRPA-Subfamilien sind^{328; 333–335}. Weiterhin wurden weitere spezifische Domänen innerhalb der Subfamilien³²⁸ sowie verschiedene *Splice*-Varianten für viele TRP-Proteine beschrieben³³⁶. Ein funktionsfähiger Ionenkanal wird aus vier Proteineinheiten gebildet, der aus gleichen Proteinen (homomere Kanal) oder unterschiedlichen Proteinen innerhalb einer Subfamilie (heteromere Kanal) bestehen kann^{328; 327}. Heteromere Kanäle können aber auch aus Proteinen unterschiedlicher Subfamilien (z. B. TRPV1/TRPA1) zusammengesetzt sein^{337; 338}.

1.5.2 Die Subfamilie der klassischen TRP (TRPC) Proteine

Die TRPC-Subfamilie umfassen sieben Mitglieder, TRPC1 bis TRPC7³³². TRPC2 existiert beim Menschen nur als Pseudogen, während es in der Maus und der Ratte exprimiert wird und in der Pheromondetektion eine Rolle spielt^{339; 340}. Die TRP-Proteine der Unterfamilie TRPC besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit. So besitzen TRPC-Proteine einen Poren-bildenden putativ-selektiven Filter (SYGEE) zwischen der S5 und S6 Transmembrandomäne³³². Am N-terminalen Ende finden sich eine positiv-geladene Region³²⁹, vier Ankyrin-Wiederholungen^{105; 329} sowie eine cc-Domäne (*coiled-coil domain*)³²⁹, die für die tetramere Assoziation verantwortlich ist³⁴¹. Neben der Prolin-reichen TRP-Domäne besitzen TRPC-Proteine am C-Terminus eine Calmodulin/Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) Rezeptor Bindestelle (CIRB)³⁴¹, eine stromale Interaktionsmolekül (*stromal interaction molecule*)-Bindestelle (SBS) sowie eine PDZ-Domäne³³² (**Abbildung 11**).

Einleitung

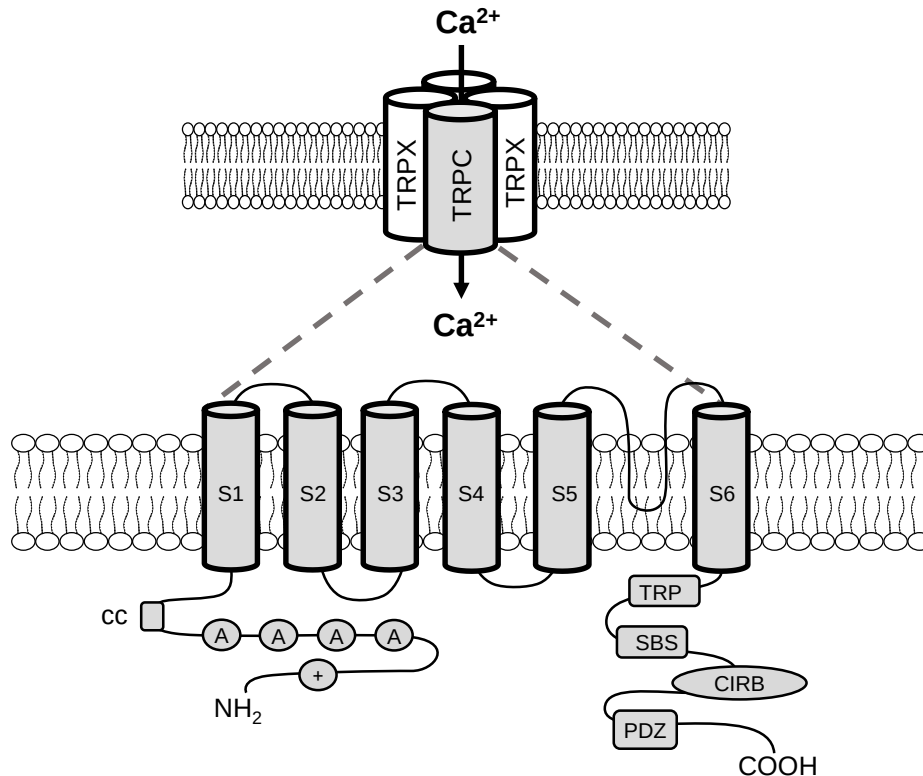


Abbildung 11: Aufbau von TRPC- und TRPC-haltigen Kanälen.

Klassische *transient receptor potential* (TRPC)-Proteine bilden funktionelle heteromere Kanäle mit anderen TRP-Proteinen, die Ca^{2+} -Ionen leiten. Ein TRPC-Protein besteht aus sechs Transmembrandomänen, S1-S6. Der Aminoterminus und der Carboxylterminus liegen intrazellulär und besitzen regulatorische Elemente, Interaktionsseiten und enzymatische Domänen. A: Alkyrin-Domäne; cc: *coiled-coil* Domäne; COOH: Carboxylgruppe; CIRB: *calmodulin/IP₃ receptor binding* (Calmodulin/ IP_3 Bindestelle); IP_3 : Inositol-1,4,5-triphosphat; NH_2 : Aminogruppe; PDZ: PDZ-Domäne; SBS: *stromal interaction molecule* (Stim) Bindestelle; TRP: TRP-Domäne; TRPX: *transient receptor potential* diverser Subfamilien; +: positiv geladene Region. Verändert nach Malczyk et al.⁷⁰.

Funktionsfähige heteromere Ionenkanäle können gewöhnlich von TRPC3, TRPC6 und/oder TRPC7 sowie TRPC1, TRPC4 und/oder TRPC5 gebildet werden³⁴². TRPC1 nimmt eine besondere Stellung ein, da es im Gegensatz zu allen anderen TRP-Proteinen keine funktionellen homomeren Kanäle bilden kann^{332; 341; 343; 344}. Außerdem kann TRPC1 mit allen TRPC-Proteinen^{332; 341; 344–350} sowie mit TRP-Proteinen aus anderen TRP-Subfamilien, wie TRPP2, TRPV1, TRPV4 und TRPV6, assoziieren^{351–355}. Eine Interaktion von TRPC1 mit anderen Proteinen, wie dem stromalen Interaktionsmolekül 1 (*stromal interaction molecule 1*, Stim1)^{57; 356} und Caveolin-1, wurde ebenfalls beschrieben^{357–359}.

TRPC-Kanäle werden in ROC^{341; 345; 346; 360; 361} und SOC^{341; 345; 346; 360–363} gegliedert. Über das Binden von Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G-protein-coupled receptor*, GPCR) kommt es zur Phospholipase C (PLC)-vermittelten Hydrolyse von membrangebundenen PIP_2 ³⁶⁴. Dabei werden aus PIP_2 Diacylglycerol (DAG) und IP_3 generiert³⁶⁴. DAG reguliert die Aktivität von ROC, wodurch es zum ROC-vermittelten Ca^{2+} -

Einleitung

Einstrom (*receptor-operated Ca²⁺ entry*, ROCE) aus dem extrazellulären Raum kommt^{98; 99}. DAG führt zur Aktivierung von TRPC3, TRPC6 und TRPC7 homomeren Kanälen³⁶⁴ oder heteromeren Kanälen, die diese Proteine enthalten³⁶⁵. Der SOC-vermittelte Ca²⁺-Einstrom (*store-operated Ca²⁺ entry*, SOCE) wird durch die IP₃-vermittelte Entleerung von intrazellulären Kalziumspeichern induziert^{98; 99}. Im SOCE sind wahrscheinlich unterschiedliche Mechanismen involviert^{366; 367}. Die IP₃-vermittelte Entleerung von intrazellulären Kalziumspeichern führt vermutlich zur Aktivierung von TRPC1, TRPC4 und TRPC5 Kanälen^{98; 99}, die genaue Rolle von TRPC-Proteinen als SOC ist umstritten^{328; 368–372}. Es gibt Hinweise, dass TRPC1 als SOC in Mechanismus der HPV involviert ist^{373; 374}.

1.5.3 TRP-Kanäle in PH

CHPH ist mit Veränderungen in der Ca²⁺-Homöostase und verändertem Proliferationsverhalten diverser Zellen verbunden. Über den Zusammenhang zwischen TRPC-Proteinen und PH ist jedoch nur wenig bekannt. In der Hypoxie-induzierten PH³⁰³ sowie in Patienten mit IPAH⁸ wurden erhöhte Expressionen von TRPC6 und TRPC3 beobachtet. In der CHPH der Ratte und der Maus wurden erhöhte Expressionen von TRPC1 und TRPC6 auf mRNA- und Protein-Ebene beobachtet³⁷⁵. Die gleichen Beobachtungen konnten in hypoxischen PASMOC aus der Ratte gemacht werden³⁰³. Während TRPC6 für die akute Phase der HPV in Mauslungen essenziell ist³⁷⁶, spielt das Protein im chronisch Hypoxie-induzierten Gefäßumbau der Maus vermutlich keine Rolle. Die TRPC6^{-/-} Mäuse sind in *in vivo* Versuchen nicht vor Hypoxie-induziertem Gefäßumbau geschützt, noch zeigt der *knockout* von TRPC6 einen Effekt auf den rechtsventrikulären systolischen Druck (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) oder die Entstehung der Rechtsherzhypertrophie¹². In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass die TRPC1 und TRPC6 mRNA hauptsächlich in den präkapillaren PASMOC exprimiert ist, die hauptverantwortlich für den Anstieg des PAP sind¹². Außerdem wurde eine höhere Expression von TRPC1, TRPC4 und TRPC6 in proximalen als in distalen pulmonalen Arterien beobachtet³⁷⁴. Ein direkter Hinweis auf die physiologische Rolle von TRPC-Proteinen in der PH fehlt jedoch. Es gibt lediglich Hinweise, dass TRPC Einfluss auf die Proliferation von PASMOC *in vitro* und Einfluss auf den Gefäßumbau haben²⁵¹.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von TRPC-Proteinen im Mechanismus der CHPH und dem mit der Erkrankung assoziierten Gefäßumbau im

Einleitung

Mausmodell. Potentielle Schlüsselgene aus der TRPC-Subfamilie sollten in den Lungen, den mikrodissektierten Gefäßen und in isolierten PASMC aus C57BL/6J Mäusen nach chronisch hypoxischer Exposition mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (*real time quantitative polymerase chain reaction*, RTqPCR) und cDNA-Microarray-Analyse identifiziert werden. Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollte der Einfluss der potentiell relevanten TRPC-Proteine in TRPC *knockout* Mäusen untersucht werden. Hierfür standen mehrere *knockout* Mauslinien zur Verfügung, welche 21 Tage Hypoxie-exponiert werden sollten, um eine CHPH auszulösen. Die Rolle der potentiell relevanten TRPC-Proteine sollte zudem in isolierten murinen PASMC (mPASMC) im Zusammenhang mit chronischer Hypoxie untersucht werden. PASMC spielen im Mechanismus der CHPH eine zentrale Rolle, da sie in der Erkrankung durch gesteigerte Proliferation und Migration sowie gesenkter Apoptose charakterisiert sind. Diese pathologischen Veränderungen tragen bedeutend zur Gefäßumbau bei.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Aspekte näher untersucht (**Abbildung 12**):

- 1) Die Identifizierung von potentiellen Schlüsselgenen aus der TRPC-Subfamilie in Lungen und Gefäßen (Mikrodissektion) aus chronisch hypoxischen C57BL/6J Mäusen und isolierten PASMC nach chronischer Hypoxie-Exposition.
- 2) Die Hypoxie-abhängige Genexpression der identifizierten TRPC-Proteine in Ratten und humanen PASMC.
- 3) Die Untersuchung des Einflusses der identifizierten TRPC-Proteine in der CHPH im Mausmodell unter Verwendung von *knockout* Mauslinien (Hämodynamische Messungen, Muskularisierung, Rechtsherzhypertrophie).
- 4) Die Untersuchung der Rolle der identifizierten TRPC-Proteine an der isolierten, ventilerten und blutfrei-perfundierten Lunge (ILU) während akuter und anhaltender Hypoxie unter Verwendung von *knockout* Mauslinien.
- 5) Den Einfluss des *knockouts* auf die Hypoxie-abhängige Proliferation, Migration und Apoptose von isolierten mPASMC.
- 6) Die Analyse des Ca^{2+} -Haushaltes in Wildtyp (WT) und *knockout* mPASMC unter chronischer Hypoxie.
- 7) Die Untersuchung des molekularen Mechanismus, der den Beobachtungen zu Grunde liegt.

Einleitung

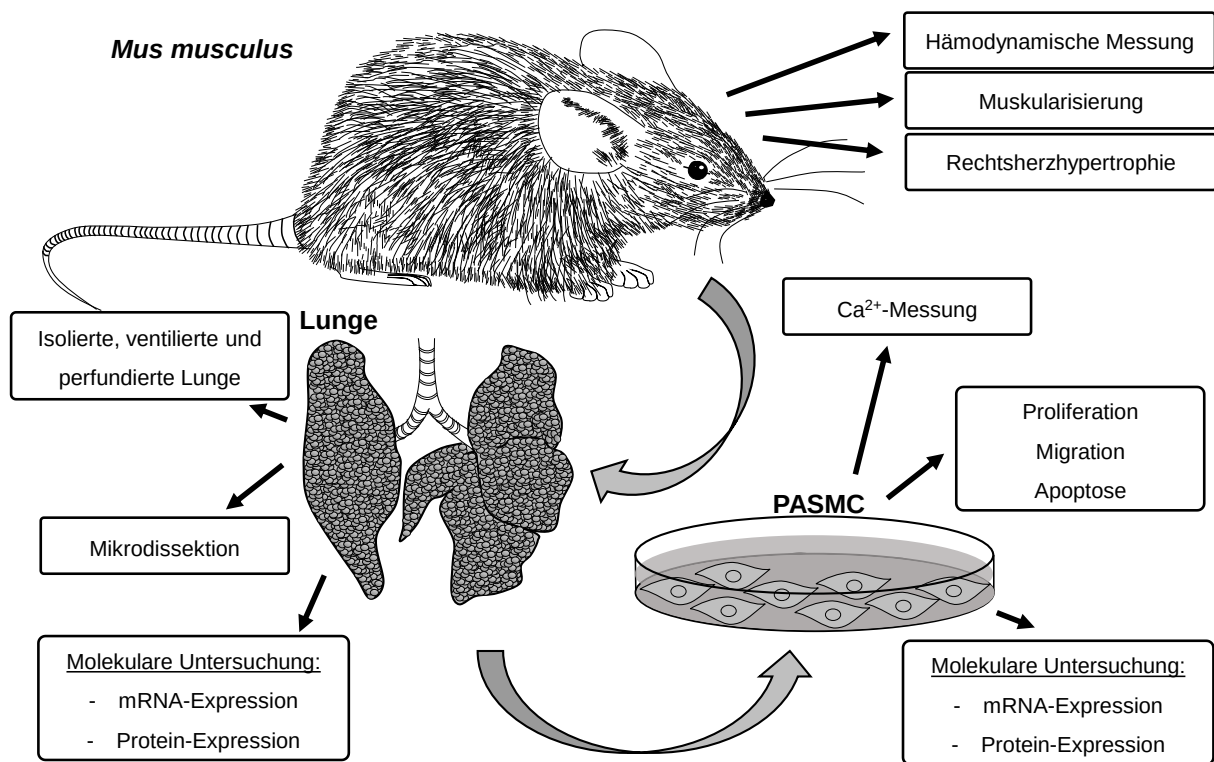


Abbildung 12: Schematische Übersicht über die geplanten Versuche.

In der vorliegenden Arbeit sollten hämodynamische Messungen an Mäusen (*Mus musculus*) nach chronischer Hypoxie sowie Normoxie durchgeführt werden. Außerdem sollten Lungen aus Mäusen entnommen und verschiedene Versuche an diesen durchgeführt werden. Zusätzlich sollten pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cell*, PASMC) aus der Lunge isoliert werden, um Ca^{2+} -Messungen durchzuführen und Proliferation, Migration und Apoptose zu untersuchen. Anschließend sollten die isolierten PASMC auf molekularer Ebene untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Absaugsystem Vacusafe Comfort	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Adapter für Ibidi	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
Beatmungspumpe Minivent Typ 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Binokular SM 5	Leica, Wetzlar, Deutschland
BioSpherix Atmosphären-Kammer	BioSpherix, New York, USA
Blutdruckanalysegerät Rapidlab 348	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland
CASY [®] Cell Counter + Analyser Model ITT	Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland
CFX Connect [™] Real-Time System	Bio-Rad, Hercules, USA
CO ₂ Controller Model AC100	Coy Laboratory Inc., Michigan, USA
Cooling/Heating Incubation Insert P-Set 2000	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
Druckaufnehmer, Combitrans [®] 1-fach Set Mod. II Universität Gießen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Film-Entwicklungsmaschine Curix 60	AGFA, Leverkusen, Deutschland
Fluoreszenzgerät, Kubier Codex	Leica, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50 WI	Olympus, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmodul, Kubier Codex	Leica, Wetzlar, Deutschland
GenePix 4100A Scanner	Axon Instruments, Downingtown, USA
Greifarm für Katheter in Zellisolation	Eigene Herstellung Universität Gießen, Gießen, Deutschland
Heizblock	VWA, Radnor, USA
Homogenizer PRECELLYSR24	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Hypoxie-Kammer (Hypoxy Glove Box)	Coy Laboratory Inc., Michigan, USA

Material und Methoden

Inkubator HERAcell 150	Thermo Scientific, Waltham, USA
Isofluranverdampfer Vet Equip.	Kf Technology, Rom, Italien
Kamera IMAGO CMOS für	Till Photonics, Martinsried, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50 WI	
Kryostat CM 1850 UV	Leica, Wetzlar, Deutschland
<i>Laser-Capture Microscope, Laser</i>	Leica, Wetzlar, Deutschland
<i>Microdissection</i> 6000, System- Version	
6.5.0.3104	
Lichtmikroskop (für Mikrodissektion)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DMLA	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lichtquelle (Zellisolation)	Schott, Mainz, Deutschland
Magnet für Tubes (<i>DynaMagTM-Spin</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham,
<i>Magnet</i>)	USA
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph-Instruments, Schwalbach,
	Deutschland
<i>Microplate Reader</i> Infinte M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop Kamera, DFC420 C	Leica, Wetzlar, Deutschland
(Zellkultur)	
Mikroskop, DMIL (Zellkultur)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifuge Micro 200R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen,
	Deutschland
Millar Katheter, Model SPR 671 62cm	AdInstruments Ltd., Oxford, UK
Länge, 1,4 F	
<i>Mini Plate Spinner</i> MPS 1000	Labnet International, Inc., Edison, USA
Mini-Gelelektrophoreseeinrichtung	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Molecular Imager[®]</i> ChemiDoc TM XRS	Bio-Rad, Hercules, USA
Mörser (Porzellan Reibeschale, 300 mL)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Multistep</i> -Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mx3000RQPCR Systems	StrataGen, Kirkland, USA
Ofen Heraeus	Hilder & Kretschmer, Gießen, Deutschland
<i>Optically Clear Heat Seal</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Oxygen Controller</i> Series 16A	Coy Laboratory Inc., Michigan, USA
Paraffinausgussstation, Leica EG 1140H	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffinkühlstation, Leica EG 1150C	Leica, Wetzlar, Deutschland

Material und Methoden

PCR/UV <i>Working Station</i>	Coy Laboratory Inc, Michigan, USA
Peristaltische Infusionspumpe ISM 597	Ismatec, Wertheim, Deutschland
<i>Pipetboy</i>	Gilson Inc., Middleton, USA
Polychrom V Quarzlichtleiter mit Monochromator und 150 W Xenon-Lampe	Till Photonics, Martinsried, Deutschland
Pipetten (1mL, 100µL, 10µL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pumpe	Novodirect, Kehl/Rhein, Deutschland
Px1TM PCR <i>Plate Sealer</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
Reinstwasseranlage Milli Q®	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Rektalsonde	AdInstruments, Oxford, UK
Schleuse Series 999	Coy Laboratory Inc., Michigan, USA
Semi-Dry Apparatur	Kreutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Spannungsgerät EPS 600 für Elektrophorese	Pharmacia Biotech AG, Dübendorf, Deutschland
Spannungsgerät <i>Electrophoresis Power Supply Consort E835</i> für Western Blot	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilbank <i>Cellgard Class II Biological Safety Cabinet</i>	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Strömungsmesser für Beatmungsgase	Aalborg Instruments, Oranburg, USA
Systemkühlung Frigomix® U-1	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Thermoregulierte Unterlage Physitemp	AdInstruments Ltd., Oxford, UK
Temperaturregler (Hypoxie-Kammer)	Coy Laboratory Inc., Michigan, USA
<i>Thermocycler Tpersonal</i>	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Tierwaage CS Series 200 g	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Tischheizung (Ca ²⁺ -Imaging)	Labo-Tech J. Stofer LTS, Biel-Benken, Schweiz
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
<i>Transducer Amplifier Module</i>	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Über-Kopf-Schwenker	VWR, Radnor, USA

Material und Methoden

UV-Lampe	Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA
Vakuumgewebe-Infiltrationsautomaten TP1050	Leica, Wetzlar, Deutschland
Vergrößerungslupe	Glamox Luxo, Hildesheim, Deutschland
Vortexer MS1 Minishaker IKA	IKA GmbH, Staufen, Deutschland
Waage AB 104-S	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Wägezelle <i>Isomatic Transducer</i>	Havard Apperatur, Massachusettes, USA
Wärmeaustauscher	Eigene Herstellung Universität Gießen, Deutschland
Wärmeregulator Thermomix®	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wärmeschrank mit Rüttler	VWR, Radnor, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserbad mit Schüttler	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zähler IVO T120	Baumer, Frauenfeld, Schweiz
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Hämatokrit 210	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge, klein, 8-Wells	VWR, Radnor, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

0,2 mL Gefäß, Natur ohne Deckel, 8 Gefäße	Nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
0,5 mL Gefäß, DNase/Rnase frei	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1,5 mL Gefäß, DNase/Rnase frei	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
100er Petrischale	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
12-Well, Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

Material und Methoden

24-Well, Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
35er Zellkulturschale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
40 µm Sieb (<i>Cell Strainer</i>)	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
6-Well, Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
60er Zellkulturschale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
70 µm Sieb (<i>Cell Strainer</i>)	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
96-Well Platte, weiß	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
96-Well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
96-Well PCR Platte, <i>Multiplate</i> TM PCR Plates, klar	Bio-Rad, Hercules, USA
96-Well PCR-Platte, <i>Hard-Shell</i> [®] PCR Plates 96-Well Thin-Wall	Bio-Rad, Hercules, USA
Äußere Glasplatten (Western Blot)	Bio-Rad, Hercules, USA
Baumwollfaden (100% Baumwolle)	John Lewis, London, UK
Beatmungstubus Vasofix [®] Safety, Neoflon	B. Braun, Melsungen, Deutschland
20 G x 11“, 1,1 33mm Länge	
Chirurgischer Faden, Polyester Garn 5/0	FSSB, Jestetten, Deutschland
Combi-Stopper	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<i>Cryo Freezing Tubes</i>	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Dreiwegehahn Discofix [®] (ILU)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Dynabeads, <i>Sheep Anti-Rat IgG</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
Einbettkassette	Sakura, Staufen, Deutschland
Einbettkassetten Beschriftungsgerät	Sakura, Staufen, Deutschland
Einmalnitrilhandschuhe, Peha soft [®] nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Einmalspitze 50 mL, Original Perfusor [®] Spritzen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Entwässerungsautomat	Leica, Wetzlar, Deutschland
<i>Falcon Tube</i> (15 mL, 50 mL)	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland

Material und Methoden

<i>Falcon Tube</i> (15 mL, 50 mL) dunkel	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Filmkassette, X-Ray-Kassette, 18 x 24cm	Rego X-ray GmbH, Augsburg, Deutschland
Gel- und Dummy-Platte	Bio-Rad, Hercules, USA
Geschliffene Deckgläschen für Neubauer Zählkammer, 20 x 26 x 0,4mm	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Handschuhe	Ansell, Richmond, Australien
Hausbindefaden Nr. 12	Amann, Böhningheim, Deutschland
Ibidi-Schalen für Ca^{2+} -Messung, 60 μ -Dish, 35 mm <i>High Glass Bottom</i>	Ibidi, Planegg/Martinsried, Deutschland
Ibidi-Schalen mit Silikon-Kammer, 35 μ -Dish	Ibidi, Planegg/Martinsried, Deutschland
Innere Glasplatte	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Individual Ventilated Cages</i> (IVC)	Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland
Kanüle Neoject [®] , 15 G x 1 1/2“, 1,8 x 40 mm	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
Kanüle (18 G x 1,2“ x 40 mm)	BD Microlane, Franklin Lakes, USA
Kanüle (24 G, 0,55 mm x 25 mm; 26 G, 0,9 mm x 25 mm; 30 G, 0,3 mm x 25 mm)	BD Microbalance [®] 3, Heidelberg, Deutschland
Katheter/Tubus Adapter, Combifix-Adapter	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Katheter linker Ventrikel (ILU), gebogenes hohles Metallröhrchen	Eigene Herstellung Universität Gießen, Gießen, Deutschland
Katheter für Pulmonalarterie (ILU), vaskuläre Kanüle mit Korb	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Keramikkügelchen, 2 mL PRECELLYS <i>Ceramic</i> , Zirkonium(IV)-oxid, <i>Beads</i>	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Magnetischer Konzentrierer für Zellisolation, <i>Dynal MPC</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
Medizinisches Klebeband Durapore [®]	3M, St. Paul, USA
<i>MembranSlides</i> , Pen Membran, 2,0 μ m	Leica, Wetzlar, Deutschland
Microarray Objektträger <i>Mouse Whole Genome 4x44K</i>	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Material und Methoden

Mikrotom	Leica, Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, Bad Homburg, Deutschland
Parafilm	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pasteur-Pipetten 230 mm	VWR, Radnor, USA
Pinzette Delicate Forceps – 0,4 mm Tips angled	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette Greafe Forceps – 0,8 mm Tips curved	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette Greafe Forceps – 0,8 mm Tips straight	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette Tissue Forceps – 1x2 Teeth 14,5 cm	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	VWR, Radnor, USA
Pipettenspitzen gestopft (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
Polyvinylidenfluorid-Membran, BioTrace™ PVDF Polyvinylidene Fluoride Transfer Membrane 0,45 µm	Millipore Corporation, Bedford, USA
Pumpschläuche verschiedene Innendurchmesser (0,89 mm bis 2,54 mm), Tygon®	Kalensee, Gießen, Deutschland
Röntgenfilm Cronex 5 Medical X-Ray Film	AGFA, Leverkusen, Deutschland
Schere <i>Extra Fine Bonn Scissors – Straight</i> 8,5 cm	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schere Metzenbaum <i>Baby Scissors – Straight</i> 14,5 cm	F.S.T Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schere <i>Delicate Scissors Curved</i> 120 mm	AUSTOS, Irvine, USA
Schraubdeckeltubes Cyo.s™	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Silikonspray	Centramed Medizintechnik, Koblenz, Deutschland

Material und Methoden

Skalpell	Feather® Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan
Spritze 1 mL, 10 mL	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Spritze 2 mL	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Trachealtubus (ILU, Eigenherstellung aus 1,2 mm x 4 mm Einmalkanüle)	BD Microbalance® 3, Heidelberg, Deutschland
Tubes (Zellisolation)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Type II Long Käfige	Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland
Zellkulturflaschen (T75)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellulosehandtücher	Tork, Mannheim, Deutschland
Zellulosestopfen (4 x 5 cm), Pur-Zellin®	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)	Calbiochem, Millipore, Darmstadt, Deutschland
6x Loading Dye	Thermo Scientific, Waltham, USA
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid, Rotiphorese® Gel 30, 30%ig	Serva, Heidelberg, Deutschland
Agarose	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA Lösung (<i>Albumin Bovine Fraction</i> , Protease frei)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Zelllyse-Puffer (<i>Cell Lysis Buffer</i>)	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Cyklopiazonsäure (<i>Cyclopiaconic Acid</i> , CPA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deionisiertes Wasser (dH ₂ O)	Milliporanlage im Labor
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dnase/RNase freies Wasser	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
dNTP-Mix (0,2 mM)	Promega, Fitchburg, USA

Material und Methoden

Doppeldestilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS; ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Eisen (II, III)-oxide, Eisenpartikel	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Elektrolytlösung Elektrolyt N II	Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (70%ig, 96%ig und 100%ig) mit Ethylmethylketon vergällt	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol (reinst) für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fibronektin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Fluorescence Mounting Medium</i>	Dako, Glostrup, Dänemark
Flüssigstickstoff	Linde, München, Deutschland
Fura2-AM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glukose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hemalaun nach Mayer (2E-068 1L)	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Heparin, Heparin-Natrium-25000- ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Heparin, Heparin-Natrium-5000- ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1- piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst (33342)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Hypoxisches Gas (1,0% O ₂ , 5,3% CO ₂ , Rest N ₂)	Linde, München, Deutschland
Immersionöl Typ F	Leica, Wetzlar, Deutschland
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isofluran	Baxter, München, Deutschland
Isotonische Natriumchlorid-Lösung, 0,9%ig	B. Braun, Melsungen, Deutschland
iTag SyBr <i>Green Supermix Plus</i> ROX	Bio-Rad, Hercules, USA

Material und Methoden

Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ketaminhydrochlorid 100 mg/mL, Ketamin [®] , 10%ig	Bela-Pharm GmbH & Co.KG, Vechta, Deutschland
Kollagenlösung Typ I, 0,01%ig	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lipofectamine [®] 2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Lipopolisaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Low Melting Point</i> Agarose (Typ VII)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ *6H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol (Molekularbiologie)	SAV <i>Liquid Production</i> , Flintbach, Deutschland
Methanol (Zellkultur)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methylgrün	Vector/Linaris, Wertheim, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MM HRP Polymer	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Nagellack (bei Färbung)	Maybelline New York, Düsseldorf, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) für Ca ²⁺ -Messung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) für Narkose	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , SDS), 10%ig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat, 8,4%ig (NaHCO ₃) (ILU)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Normocin [™]	Invivo-Gen, Toulouse, Frankreich
Normoxisches Gas (21% O ₂ , 5,3% CO ₂ , eingestellt mit N ₂)	Linde, München, Deutschland
NP-40 (Tergitol [®])	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NuPage [®] LDS <i>Sample Buffer</i> (4x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ampicilin (Ampicilin Sodium Salz A 8351-5G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen Strep, P/S)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA

Material und Methoden

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polysorbat 20, Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteinlöser PAL 50	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, Niederlande
<i>Rodent Block M</i>	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Salzsäure (HCL), 37%ig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol (β-MeEtOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Staurosporin	Cayman Chemical, Tallinn, Estland
Steriles destilliertes Wasser	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<i>SYBR[®]Safe</i> , DNA Gel Stain 10000x	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tertiäres aliphatisches Amin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	
<i>Tissue Tec</i> OCT Medium	Sakura, Tokyo, Japan
TRIS BASE	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA (10x)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Trypsin (Immunofärbung), 1:3	Invitrogen, Carlsbad, USA
Vanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂ , 30%ig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylazinhydrochlorid, Xylazin [®] 2%ig	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Kits und Assays

<i>Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagents</i>	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Caspase Glo 3/7 Assay	Promega, Madison, USA
<i>Cell Proliferation ELISA</i> , BrdU	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
<i>Click-iT EdU Imaging Kit</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
DAB Peroxidase (HRP) Substrat <i>Kit</i>	Vector/Linaris, Wertheim, Deutschland
DC Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Direct PCR Tail</i>	PeqLab, Erlangen, Deutschland

Material und Methoden

<i>Dual-Color LIRAK-Kit</i>	Agilent, Böblingen, Deutschland
<i>EndoFree Plasmid Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden, Niederlande
Hämatokritversiegelungskit	Brand, Wertheim, Deutschland
<i>ImmPress Anti-Rabbit Ig Polymer</i>	Vector/Linaris, Wertheim, Deutschland
<i>Detektion-Kit</i>	
<i>iScriptTMcDNA Synthesis Kit</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Mouse TGF-β1 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>Mouse TNF-α Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>peqGOLD total RNA Kit</i>	PeqLab, Erlangen, Deutschland
<i>RNaseyR Micro Kit</i>	Qiagen, Hilden, Niederlande
<i>RNaseyR Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, Niederlande
<i>Avidin-Biotin-Peroxidase-basierendem Kit, Vector VIP Peroxidase (HRP)</i>	Vector/Linaris, Wertheim, Deutschland
<i>Substrate Kit</i>	

2.1.5 Wachstumsfaktoren

<i>Recombinant Mouse VEGF 120 (494-VE)</i>	R&D System. Inc., Minneapolis, USA
<i>Recombinant Mouse VEGF 164 (493-MV)</i>	R&D System. Inc., Minneapolis, USA
<i>Recombinant Mouse VEGF 188 Protein (7916-MV)</i>	R&D System. Inc., Minneapolis, USA
<i>Recombinant Mouse PDGF-CC Protein, CF (1447-PC/CF)</i>	R&D System. Inc., Minneapolis, USA
<i>Recombinant Mouse EGF Protein, CF (2028-EG)</i>	R&D System. Inc., Minneapolis, USA
<i>Recombinant Mouse IGF-1 Protein, CF (791-MG)</i>	R&D System. Inc., Minneapolis, USA
<i>Recombinant Mouse TGF-β1 Protein (7666-MB)</i>	R&D System. Inc., Minneapolis, USA
<i>Recombinant Mouse TNF-α Protein (410-MT)</i>	R&D System. Inc., Minneapolis, USA

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Antikörper für Western Blots

Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Rabbit IgG (H+L) Antikörper (W40B2)	Promega, Madison, USA
Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Goat IgG (H+L) Antikörper (sc-2020)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Mouse IgG (H+L) Antikörper (W40B2)	Promega, Madison, USA
Anti-Cyclin D1 (2978)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti- α -SMA (SAB2500963)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (197G2)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Erk1/2 (1979G)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182) (45115)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-p38 (9212S)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-HIF-1 α (10006421)	Cayman Chemical, Michigan, USA
Anti-HA (ab3110)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-phospho-Smad2(Ser465/467)/3(Ser423/425) (8828S)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Smad2/3 (3102S)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti- β -Aktin (A228)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-TRPC1 (ab25322)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-TRPC1 (ab74819)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-TRPC1 (ACC-010)	Alomone, Jerusalem, Israel
Anti-TRPC1 (T8276)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-TRPC1 (sc20110)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-TRPC1 (9F2-E4)	Arbeitsgruppe Flockerzi, Universität des Saarlands, Homburg, Deutschland

Material und Methoden

2.1.6.2 Antikörper für Isolation von PAEC

VE-Cadherin, *Rat Anti-Mouse* CD 144 BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland (555289)

2.1.6.3 Antikörper für Immunofärbungen

Anti- α -SMA, Clone 1A4 (A2547)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-vWF (A0082)	Dako, Glostrup, Dänemark
2,5%iges Pferdeserum (2,5% <i>Normal Horse Serum</i>)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>Anti-Rabbit Ig</i> , ImmPRESSTM Reagent	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.7 Enzyme, Marker, Standards

Dispase	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
Dnase I	Serva, Heidelberg, Deutschland
DNA-Standard (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder)	Promega, Madison, USA
Go Tag-Polymerase (1U)	Promega, Madison, USA
Kollagenase H f. <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad, Hercules, USA

2.1.8 Plasmide, siRNA

2.1.8.1 siRNA

siRandom	Eurogentec, Köln, Deutschland
siTRPC1, smart pool	Dharmacon, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
siHIF-1 α , smart pool	Dharmacon, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland

Material und Methoden

2.1.8.2 Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>Tag</u>	<u>Herkunft</u>
Empty Vektor	-	AG Dietrich, München, Deutschland
HA ₂ TRPC1 Plasmid	Hämagglutinin, C- und N-terminal	AG Dietrich, München, Deutschland

2.1.9 Primer

Primer für Gen-Expressionsanalysen wurden mit Hilfe von PubMed sowie dem kostenlosen Internet-Programm „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) entworfen. Die Schmelztemperatur aller Primer lag zwischen 61°C und 63°C. Alle Primer sind Intron-umspannend. Die Primer wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) bezogen. Die Qualität der Primer wurden mittels RTqPCR (siehe Kapitel 2.5.4) anhand der Ct (*cycle threshold*)-Werte und Schmelzkurven bewertet. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe einer Gelelektrophorese bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2). Primersequenzen für Genotypisierungen wurden von der Arbeitsgruppe Dietrich übermittelt.

2.1.9.1 Primer für RTqPCR

<u>Gen</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Primersequenz</u>
TRPC1	<i>Mus</i>	F:5'-TGGGCCCCACTGCAGATTTCAG-3'
	<i>musculus</i>	R:5'-AAGATGGCCACGTGCGCTAAGGAG-3'
TRPC1.1	<i>Mus</i>	F:5'-CGTAACCAGCTCAGCTTTGTTATGAATTCC-3'
	<i>musculus</i>	R:5'-GCATCCCAGTCCTTCCGGTC-3'
TRPC3	<i>Mus</i>	F:5'-AGTCGCTCTTCTGGTCTGTCTTT-3'
	<i>musculus</i>	R:5'-TTTGCGGCTGGGAATAATG-3'
TRPC4	<i>Mus</i>	F:5'-GGGCGGCGTGCTGAT-3'
	<i>musculus</i>	R:5'-CCGCGTTGGCTGACTGTATTGTAG-3'
TRPC5	<i>Mus</i>	F:5'-AGCCGAGCCCCTGGAAAGACA-3'
	<i>musculus</i>	R:5'-CCGATGGCGAGGAATGGAAGA-3'
TRPC6	<i>Mus</i>	F:5'-GACCGTTCATGAAGTTTGTAGCAC-3'
	<i>musculus</i>	R:5'-AGTATTCTTTGGGGCCTTGAGTC C-3'
TRPC7	<i>Mus</i>	F:5'-GTGGGCGTGCTGGACCTG-3'
	<i>musculus</i>	R:5'-AGACTGTTGCCGTAAGCCTGAGAG-3'
B2M		F:5'-AAGCCAAGACCGTCTACTGG-3'

Material und Methoden

	<i>Mus musculus</i>	R:5'-TTCTTTCTGCGTGCATAAATTG-3'
β-Aktin	<i>Mus musculus</i>	F:5'-GGCTACAGCTTCACCACCAC-3' R:5'-GAGTACTTGCGCTCAGGAGG-3'
α-SMA	<i>Mus musculus</i>	F:5'-TGGAGAAGAGCTACGAAGTCC-3' R:5'-TTTCGTGGATGCCCCGCTGA-3'
Ki67	<i>Mus musculus</i>	F:5'-GTCGCTTTGGACAGTGAACCT-3' R:5'-TTCTTGTTCTTAACCTTCTTGGTGCAT-3'
HIF-1α	<i>Mus musculus</i>	F:5'-CCTCACCAGACAGAGCAGGA-3' R:5'-GGGAGCCATCATGTTCCATT-3'
TRPC1	<i>Rattus norvegicus</i>	F:5'-TTTTCTTGCTGGCGTGCGAC-3' R:5'-TTGCGTAGATGTGCTTGGGAGA-3'
B2M	<i>Rattus norvegicus</i>	F:5'-CGCTCGGTGACCGTGATCT-3' R:5'-ATTCTCCGGTGGATGGCGAG-3'
TRPC1.1	<i>Homo sapiens</i>	F:5'-TGCGTAGATGTGCTTGGGAGAA-3' R:5'-ACTTCAGAGTCGATTGCCACCA-3'
TRPC1.2	<i>Homo sapiens</i>	F:5'-CTTTTCTTGCTGGCGTGCGA-3' R:5'-TTCTCCCAAGCACATCTACGCA-3'
B2M	<i>Homo sapiens</i>	F:5'-ACACTGAATTCACCCCCACTGA-3' R:5'-TGCTTACATGTCTCGATCCCACT-3'

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

2.1.9.2 Primer für Genotypisierung

<u>Gen</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Primersequenz</u>
TRPC1.1	<i>Mus musculus</i>	F:5'-GGCAACCTTTGCCCTCAAAGTGGTGGC-3' R:5'-AGTGAATATATATATATCAGACATAGATTTGGG-3'
TRPC1.2	<i>Mus musculus</i>	F:5'-TCTATGGCTTCTGAGGCGGA-3' R:5'-GCATTATTAATATCTGAGTCATTTTCTTATTGGC AAAAGGAGG-3'

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

Material und Methoden

2.1.10 Standards

Für die Durchführung der von Konzentrationsbestimmungen wurden BSA-Standards verwendet. Verschiedene Mengen BSA wurde in 1 mL Zelllyse-Puffer aufgelöst.

<u>Standard</u>	<u>Menge</u>	<u>Konzentration</u>
BSA-Standard	2,056 mg	2,056 mg/mL
	1,028 mg	1,028 mg/mL
	0,514 mg	0,514 mg/mL
	0,257 mg	0,257 mg/mL
	0,128 mg	0,128 mg/mL
	0,064 mg	0,064 mg/mL

2.1.11 Gele

2.1.11.1 Polyacrylamid-Trenngel

<u>Konzentration</u>	<u>dH₂O</u>	<u>Acrylamid</u>	<u>Tris-Puffer (1,5M)</u>	<u>SDS</u>	<u>TEMED</u>	<u>APS</u>
8%	4,7 mL	2,7 mL	2,5 mL	0,1 mL	0,5 µL	5 µL
12%	3,4 mL	4,0 mL	2,5 mL	0,1 mL	0,5 µL	5 µL

2.1.11.2 Polyacrylamid-Sammelgel

<u>Konzentration</u>	<u>dH₂O</u>	<u>Acrylamid</u>	<u>Tris-Puffer (0,5M)</u>	<u>SDS</u>	<u>TEMED</u>	<u>APS</u>
5%	5,7 mL	1,7 mL	2,5 mL	0,1 mL	1 µL	5 µL

2.1.11.3 Agarose-Gel

<u>Agarose-Gel</u>	<u>Substanz</u>	<u>Menge</u>
1,5%	Agarose	1,5 g
	TAE Puffer (1X)	100 mL
	Sybr Safe DNA Gel Stain	10 µL

2.1.12 Puffer und Lösungen

<u>Puffer</u>	<u>Substanz</u>	<u>Menge</u>
0,1%ige BSA Lösung	DPBS	100 mL

Material und Methoden

	BSA	0,1 g
0,5%ige BSA Lösung	HBSS ^{-/-}	100 mL
	BSA	0,5 g
3%ige Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung	30%iger Wasserstoffperoxidlösung	20 mL
	Methanol	180 mL
3%ige BSA Lösung	DPBS	100 mL
	BSA	3 g
10%ige BSA Lösung	DPBS	100 mL
	BSA	10 g
Zelllyse-Puffer, 1X	dH ₂ O	900 µL
	10X Zelllyse-Puffer	100 µL
	PMSF	0,1%
Aceton-Methanol	Aceton	250 µL
	Methanol	250 µL
Agarose-Eisenpartikel-Suspension	<i>Low melting point</i> Agarose (Typ VII)	5 mg
	Eisen (II,III)-oxidem, Eisenpartikel	5 mg
	Medium 199	1 mL
Agarose-Lösung (Zellkultur)	<i>Low melting point</i> Agarose (Typ VII)	10 mg
	Medium 199	1 mL
Blocking-Lösung	Magermilchpulver	6 g
	TBST-Puffer, 1X	100 mL
Hepes Ringer Lösung (10 mM) mit 10 mM Kalzium (HR ⁺)	KCl	418 mg
	CaCl ₂	14,7 g
	Glukose	2,18 g
	Hepes	2,38 g
	NaCl	7,97 g
	MgCL ₂	203,3 mg
	dH ₂ O, pH 7,4, 37°C	1000 mL

Material und Methoden

Hepes Ringer Lösung (10mM) ohne Ca ²⁺ (HR ⁻)	KCl	418 mg
	Glukose	2,18 g
	Hepes	2,38 g
	NaCl	7,97 g
	MgCL ₂	203,3 mg
	dH ₂ O, pH 7,4, 37°C	1000 mL
Hepes Ringer Lösung (0,2 M)	KCl	8,36 g
	CaCl ₂	6,468 g
	Glukose	43,6 g
	Hepes	47,6 g
	NaCl	159,4 g
	MgCL ₂	4,066 g
	dH ₂ O, pH 7,4, 37°C	1000 mL
Hepes Ringer Lösung (10 mM)	KCl	418 mg
	CaCl ₂	323,4 mg
	Glukose	2,18 g
	Hepes	2,38 g
	NaCl	7,97 g
	MgCL ₂	203,3 mg
	dH ₂ O, pH 7,4, 37°C	1000 mL
Laufpuffer (Laemmli), 10X	Tris-BASE	60,56 g
	Glycin	288 g
	SDS	20 g
	dH ₂ O	2000 mL
Laufpuffer, 1X	10X Laufpuffer	100 mL
	dH ₂ O	900 mL
TAE-Puffer, 50X	Tris-BASE	121 g
	Essigsäure	28,6 mL
	0,5 M EDTA-Lösung	50 Ml
	dH ₂ O, pH 8,0	500 mL
TBS-Puffer, 10X, pH 7,5	Tris-BASE, 0,2 M	24,23 g
	NaCl; 1,5 M	87,66 g
	dH ₂ O	1000 mL

Material und Methoden

TBST, 1X, pH 7,5	TBS-Puffer, 10X	100 mL
	dH ₂ O	900 mL
	Tween [®] 20	1 mL
Transfer-Puffer	0,05 M Tris	11,6 g
	0,04 M Glycin	5,8 g
	SDS, 0,37%ig	3,7 mL
	Methanol	400 mL
	dH ₂ O	1596,3 mL
Trypsin (Immunohistochemie)	Trypsin (2A)	1 mL
	Diluent (2B)	2 mL
Radioimmunoprecipitationspuffer (RIPA)	DPBS	99 mL
	NP-40, 1%ig	1 mL
	C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄	0,5 g
	SDS, 10%ig	0,1 mL
RLT-Puffer	RLT-Puffer	1 mL
	β-MeEtOH	10 µL
Stripping-Lösung	Aqua dest.	90 mL
	Glycin	0,75 g
	37%ige HCL	1 mL
Tris-Puffer (0,5 M)	Tris-BASE	12,11 g
	dH ₂ O	200 mL
Tris-Puffer (1,5 M)	Tris-BASE	36,35 g
	dH ₂ O	200 mL

2.1.13 Medien

2.1.13.1 Medien

Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle</i> Medium mit Nährstoffmix F12 und Glutamin (DMEM/F12 + Glutamin)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>Dulbecco's Phosphate - Buffered Saline</i> , DPBS)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Material und Methoden

<i>Endothelial Cell Growth Supplement With Heparin (ECGS-H)</i>	PromoCell, Madison, USA
<i>Endothelial Cell Growth Medium MV</i>	PromoCell, Madison, USA
<i>Endothelial Cell Growth Medium Supplement Mix</i>	PromoCell, Madison, USA
Fetales bovines Serum (<i>Fetal Bovine Serum, FBS</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum, FCS</i>)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Hank's gepufferte Salzlösung (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB Broth Base (<i>Lennox L Growth Medium</i>)	Invitrogen, Carlsbad, USA
LB Medium (<i>Lennox L Agar</i>)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Medium 199 (M199)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Opti-MEM® Medium	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
S.O.C. Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Smooth Muscle Cell Basal Medium</i>	PromoCell, Madison, USA
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i>	PromoCell, Madison, USA
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 Supplement Mix</i>	PromoCell, Madison, USA
Trypsin (10X)	Omega Scientific, Tarzana, Kanada

2.1.13.2 Medienzusammensetzung

<u>Puffer</u>	<u>Substanz</u>	<u>Menge</u>
Dispase-Lösung	Dispase	8 U/mL
	Dnase I	10 mg
	HBSS ^{+/+}	20 mL
EC-Medium I	DMEM/F-12	500 mL
	P/S	1%
	FBS/FCS	20%
	ECGS-H	6,5%

Material und Methoden

EC-Medium II	<i>Endothelial Cell Growth</i>	500 mL
	<i>Medium MV</i>	
	P/S	5 mL
	<i>Endothelial Cell Growth</i>	1 Mix
	<i>Medium Supplement Mix</i>	
	FBS/FCS	50 mL
EC-Medium III	<i>Endothelial Cell Growth</i>	500 mL
	<i>Medium MV</i>	
	P/S	5 mL
	<i>Endothelial Cell Growth</i>	1 Mix
	<i>Medium Supplement Mix</i>	
HBSS ^{+/+}	HBSS ^{-/-}	500 mL
	CaCl ₂	2,2 mL
	MgCl ₂	1 mM
Kollagenase-Lösung	M199	10 mL
	P/S	0,1 mL
	Kollagenase	80 U/mL
Medium I	M199	500 mL
	P/S	5 mL
Medium II	M199	500 mL
	P/S	5 mL
	FBS/FCS	50 mL
Medium III	DMEM/F-12	500 mL
	P/S	5 mL
	FBS/FCS	50 mL
SMC-Medium I	<i>Smooth Muscle Growth</i>	500 mL
	<i>Medium 2</i>	
	<i>Smooth Muscle Growth</i>	1 Mix
	<i>Medium 2 Supplement Mix</i>	
	Normocin	1 mL
	FBS/FCS	75 mL

Material und Methoden

SMC-Medium II	<i>Smooth Muscle Growth Medium 2</i> <i>Smooth Muscle Growth Medium 2 Supplement Mix</i> Normocin	500 mL 1 mL
SMC-Medium III	<i>Smooth Muscle Basal Medium</i> Normocin	500 mL 1 mL
SMC-Medium IV	<i>Smooth Muscle Basal Medium</i> P/S FBS/FCS	500 mL 5 mL 50 mL
Trypsin (1X)	Trypsin (10X) Hepes Ringer Lösung (0,2 M) 0,9% NaCl	12 mL 12 mL 96 mL

2.1.14 Zellen und Mauslinien

Zellen

Humane PASM (hPASM)
Escherichia coli (*E. coli*)
JM109[®] Bakterien

Hersteller/Ort

PromoCell, Madison, USA
Promega, Fitchburg, USA

Mäuse

B6.129S-TRPC1^{tm1.Lbi}
C57BL/6J

Hersteller/Ort

AG Dietrich, München, Deutschland
Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland

2.1.15 Software

Datenerfassungssoftware Labtech
Notebook Pro ©
GenePix Pro 5.1
Gene-tools Software
GraphPad Prims 6, Version 6.07
i-Control Version 1.10
Image LabTM Software Version 4.1

Laboratory technologies Corp., Wilmington, USA
Axon Instruments, Downingtown, USA
Syngene
GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Tecan, Männedorf, Schweiz
Bio-Rad, Hercules, USA

Material und Methoden

ImageJ	Wayne Rasband, <i>National Institutes of Health</i> (NIH), USA
LabChart, Version 4 (ILU)	AdInstruments Ltd., Oxford, UK
LabChart, Version 7 (Hämodynamik)	AdInstruments Ltd., Oxford, UK
Leica Application Suit, LAS, Version 4.5.0	Leica, Wetzlar, Deutschland
Limma package	Axon Instruments, Downingtown, PA, USA
MxPro qPCR	Software Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
NanoDrop Software, Version 3.7.1	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mauslinien

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Versuche mit Mäusen (*Mus musculus*) durchgeführt. Es wurden die Mauslinien C57BL/6J und B6.129S-TRPC1^{tm1.Lbi} (TRPC1 *knockout* Mauslinie) verwendet.

Bei dem Mausstamm C57BL/6J (Wildtyp, WT) handelte es sich um phänotypisch unbelastete Inzuchtmäuse. Männliche C57BL/6J Mäuse wurden zur Gewinnung von verschiedenen Zelltypen für Vorversuche, Kontrollversuche mit *small interfering* RNA (siRNA), Überexpressionen und Stimulationen mit Wachstumsfaktoren verwendet.

Die TRPC1 *knockout* Mäuse (TRPC1^{-/-}) weisen einen globalen *knockout* des TRPC1-Gens³⁷⁰ auf. Sie wurden durch den Transfer einer genetisch manipulierten embryonalen 129S/SvEv Maus-Stammzelle in eine C57BL/6J-Blastozyste hergestellt und über zehn Generationen auf den Hintergrund C57BL/6J zurückgezüchtet³⁷⁰. Die genetische Veränderung führt zu einem leichten Phänotyp. Die TRPC1^{-/-} Mäuse weisen ein minimal erhöhtes Körpergewicht (KG) im Vergleich zu Wildtyp Mäuse auf. Für *in vivo* und *in vitro* Versuche wurden männliche und weibliche Mäuse der TRPC1 *knockout* Mauslinie verwendet. Als Kontrolltiere wurden Wildtyp Mäuse (Wildtyp, WT) der gleichen Mauslinie aus der gleichen Kolonie verwendet.

2.2.2 Genotypisierung

Die Mäuse der verwendeten TRPC1 *knockout* Mauslinie wurden nach einem standardisierten Protokoll genotypisiert. Die DNA wurde mit Hilfe vom *Direct PCR Tail* aus Schwanzbiopsien

Material und Methoden

nach Herstellerangaben extrahiert und mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Das folgende Temperaturprofil wurde verwendet (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Reaktionsprotokoll der PCR zur Genotypisierung von TRPC1 Mäusen.

<u>Segment</u>	<u>Zyklusphase</u>	<u>Zyklen</u>	<u>Prozess</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
1	Initiale Denaturierung	1	Denaturierung	94°C	900 Sek.
2	Amplifikation	32	Denaturierung	94°C	60 Sek.
			Hybridisierung	55°C	60 Sek.
			Polymerisation	72°C	60 Sek.
3	Finale Polymerisation	1	Polymerisation	72°C	420 Sek.
				10°C	∞

Nach der Amplifikation der DNA wurde eine Gelelektrophorese (20 Minuten, 11,8 V/cm², EPS 600) durchgeführt. Hierzu wurden 5 µL DNA-Probe mit 1-fach *Loading Dye* auf 1,5%ige Agarosegele aufgetragen. Ein DNA-Standard diente der Größenbestimmung. Die aufgetrennten Proben wurden mit einem *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS* unter UV-Licht bei 320 nm visualisiert und fotografiert. Die Genotypisierung der verwendeten Mäuse wurde durch Sabine Hurka unterstützt.

2.2.3 Versuchstierhaltung

2.2.3.1 Allgemeine Versuchstierhaltung

Alle verwendeten Mäuse waren zu Versuchsbeginn nicht jünger als 12 Wochen und wogen mindestens 20 g. Die C57BL/6J Mäuse wurden unter konventionellen Haltungsbedingungen in Gruppen von bis zu 15 Tieren pro Käfig gehalten. Die Mäuse der TRPC1 *knockout* Mauslinie wurden in einzelbelüfteten IVC (*individually ventilated cages*) Käfigsystemen in kleinen Gruppen von bis zu fünf Tieren pro Käfig gehalten. Die Tiere wurden in Raumluft mit einer O₂-Konzentration von 21% (Normoxie, bezogen auf Meeresniveau) gehalten. Die Photoperiodik in der Tierhaltung war auf 12 Stunden Hell- und Dunkelphase eingestellt. Die Umgebungstemperatur betrug 22°C, die Luftfeuchtigkeit 40 bis 70%. Die Tiere wurden unter *ad libitum* Verhältnissen gehalten und mit einer Standarddiät (Altromin 1324) sowie Wasser (Leitungswasser) versorgt. Die Käfige waren mit Einstreu, Nistmaterial und Versteckmöglichkeiten ausgestattet.

Material und Methoden

2.2.3.2 Experimentelle Versuchstierhaltung in Hypoxie-Exposition

Im Mausmodell der CHPH wurden adulte Mäuse der TRPC1 *knockout* Mauslinie für einen Zeitraum von 21 Tagen normobarer Hypoxie (inspiratorische Sauerstoffkonzentration von 10%) ausgesetzt. Dies entspricht der Sauerstoffkonzentration der Luft in einer Höhe von 5000 m über dem Meeresspiegel³⁷⁷. Unter dieser Kondition entwickeln Mäuse eine milde Form der PH^{155; 378}, die durch eine verstärkte Muskularisierung der distalen Gefäße, eine Versteifung der proximalen Arterien sowie einem Anstieg des RVSP gekennzeichnet ist¹⁵⁵. Die Kontrollgruppe wurde unter normobarer Normoxie (inspiratorische Sauerstoffkonzentration von 21%) gehalten. Alle Versuchstiere wurden während des Versuches in ventilierten Kammersystemen (*TypII long* Käfige, Kleingruppen gemäß GV Solas Empfehlung) untergebracht. Die O₂- und CO₂-Konzentration wurde im gesamten Versuchsablauf gemessen und kontrolliert.

Die Versorgung der Tiere mit Futter und Wasser sowie der Gesundheitszustand wurden täglich kontrolliert. Die gesundheitliche Verfassung wurde anhand eines vorgegebenen Punkteplanes (*Scoresheet*) bewertet, welcher zum Wohle der Versuchstiere Abbruchkriterien definierte. Die Photoperiodik, die Umgebungstemperatur, die Luftfeuchtigkeit, die Fütterung und die Käfigausstattung unterschieden sich nicht von der allgemeinen Versuchstierhaltung (siehe Kapitel 2.2.3.1). Die Überwachung der Mäuse während der chronischen Hypoxie-Exposition wurde unter Hilfestellung von Dr. vet. med. Simone Kraut durchgeführt.

2.2.4 Versuchsgenehmigungen

Alle Tierexperimente und Eingriffe wurden entsprechend der EU Richtlinie 86/609/EWG zum Schutz von Versuchstieren durchgeführt und wurden zuvor durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Die dazugehörigen Tierversuchsanträge und Anzeigen können unter den folgenden Aktenzeichen (**Tabelle 3**) eingesehen werden.

Tabelle 3: Aktenzeichen und Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen.

Aktenzeichen	Versuch
A34_2011	Zellisolation und Isoliert-perfundierte Lunge
A115_2014	Zellisolation
A07_2016	Chronische Hypoxie-Exposition

2.3 Chronische Hypoxie-Exposition der Mäuse

2.3.1 Versuchstiergruppen

Nach der Hypoxie-Exposition wurden hämodynamische Messungen zur Ermittlung des RVSP in tiefer Narkose mit einer finalen Organentnahme durchgeführt. Der RVSP ist ein Maß für die Druckbelastung der Lunge bzw. des rechten Ventrikels und spiegelt den Schweregrad der PH wieder³⁷⁷. Das Herz wurde zur Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie aufbereitet. Die Lungen wurden für immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen präpariert (**Abbildung 13**).

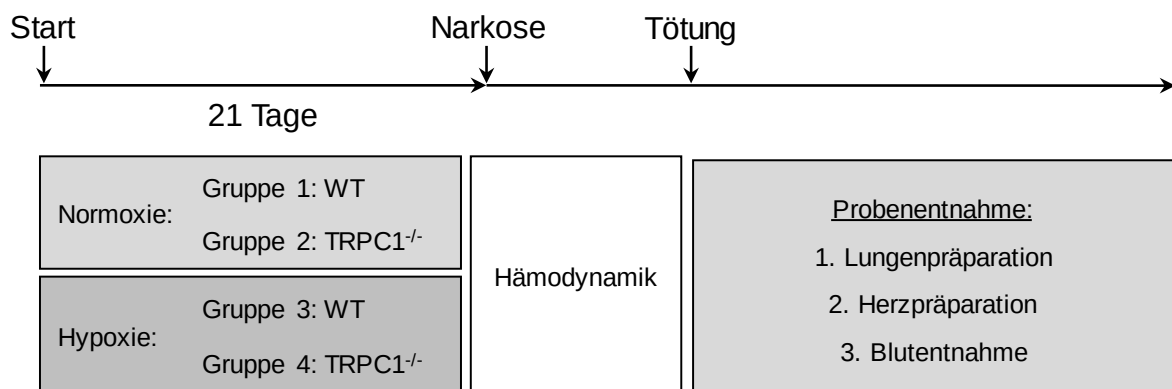


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Versuchstiergruppen und der Ablauf des Versuchs.

2.3.2 Hämodynamische Messung

Die Versuchsmäuse wurden durch Anfluten der Narkosekammer mit einer Inhalationsnarkose (3 bis 5% Isofluran) betäubt. Die Tiefe der Narkose wurde durch das Ausbleiben der nozizeptiven und viszerale Reflexen (Zusammensucken der Maus nach Reizung der Fußsohlen, keine Augenreflexe) sichergestellt. Die Mäuse wurden auf einer thermoregulierten Unterlage positioniert. Die Körpertemperatur der Tiere wurde mittels einer Rektalsonde überwacht. Die Zunge wurde vorgelagert, um die Atmung nicht zu behindern. Anschließend wurde die Haut im Bereich der Trachea desinfiziert und lateral eröffnet. Nach dem Entfernen des die Trachea umgebenden Muskelstrangs wurde die Trachea mit einem kleinen Schnitt unterhalb des Kehlkopfes zwischen den Knorpelspangen eröffnet. Ein Beatmungstubus wurde eingeführt, eingebunden und an ein Beatmungssystem angeschlossen. Die Narkosetiefe wurde durch die Intubation (1,5 bis 2,5% Isofluran) erhalten. Die *Vena jugularis* und *Arteria carotis* wurden chirurgisch freigelegt und der Druck in beiden Gefäßen mit Hilfe eines Millar Katheters erfasst [RVSP in der *Vena jugularis*; systemisch arteriellen Blutdrucks (*systemic arterial pressure*, SAP) in der *Arteria carotis*]. Der RVSP und der SAP wurden digital registriert und

Material und Methoden

mit der Software LabChart aufgezeichnet.

Anschließend erfolgte die Tötung der Mäuse durch Blutentzug mit Hilfe einer Herzpunktion. Nach Eintritt des Todes wurde der Hämatokritwert bestimmt und die Lungen sowie das Herz für weitere Untersuchungen präpariert. Die hämodynamischen Messungen wurden unter Hilfestellung durch Karin Quanz durchgeführt.

2.3.3 Hämatokrit-Messung

Um den Hämatokritwert zu bestimmen, wurde Blut mit einer Kapillare vor dem Entbluten aus der *Vena jugularis* entnommen. Die Kapillare wurde mit Knete aus dem Hämatokrit-Versiegelungskit verschlossen und anschließend mit 16060 g (13000 rpm) für vier Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Hämatokritwert wurde anhand einer Hämatokrit-Skala abgelesen.

2.3.4 Präparation der Lunge

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lungen der Versuchstiere für immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen präpariert.

Nach Eintritt des Todes wurde der Thorax eröffnet. Hierfür wurden die Rippen lateral eingeschnitten und das Sternum medial aufgeschnitten. Anschließend wurden die Rippen beidseitig zu den Seiten hin aufgeklappt und fixiert. Der auf dem Herzen aufliegende Thymus und das Perikard wurden entfernt. Anschließend wurde eine Ligatur (chirurgischer Faden) um die Aorta und die PA gelegt. Der rechte Ventrikel wurde lateral angeschnitten und eine Spülkanüle über das entstandene Loch in die PA eingeführt und fixiert. Der linke Ventrikel wurde ebenfalls angeschnitten, um die Lunge anschließend über die Spülkanüle mit isotonischer Kochsalzlösung mit einem Druck von 22 cm Wassersäule zu perfundieren. Die Beatmung wurde eingestellt. Die weitere Lungenpräparation richtete sich nach der Art der Untersuchung. Bei der Präparation der Lungen für die immunhistochemische Untersuchung oder die *Laser-Capture* Mikrodisektion wurde zunächst die linke Lunge von der rechten Lunge mit einem Faden abgebunden. Die rechte Lunge wurde für die molekularbiologischen Untersuchungen abgetrennt, in ein Gefäß überführt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde die linke Lunge in Formalin fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet. Hierzu wurde isotonische Kochsalzlösung mit einem Druck von 12 cm Wassersäule über die Trachea in die Lunge geleitet und die Lunge abgebunden. Sowohl

Material und Methoden

der Spülkatheter als auch der Tubus wurden entfernt und die linke Lunge vorsichtig aus dem Thorax präpariert. Die Lunge wurde in Einbettkassetten gelegt und über Nacht bei Raumtemperatur in 3,5% Formalin gelagert. Die Lungen wurden am nächsten Tag in 4°C kalter Dulbecco's Phosphat-gepufferter Lösung (*dulbecco's phosphat-buffered saline*, DPBS) gelagert, am Folgetag in 50% EtOH sowie am vierten Tag in 70% EtOH entwässert. Anschließend wurden die Lungen in einem geschlossenen Vakuumgewebe-Infiltrationsautomaten über Nacht dehydriert und mit Hilfe einer Paraffinausgussstation in Paraffin eingebettet.

Für die *Laser-Capture* Mikrodissektion wurde der linke Lungenflügel über die Trachea mit erwärmten *tissue tec* befüllt. Die befüllte linke Lunge wurde vorsichtig aus dem Thorax präpariert und in *tissue tec* in eine Kassette eingebettet. Die eingebetteten Lungen wurden über flüssigem Stickstoff langsam eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.5 Rechtsherzhypertrophie

Für die Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie wurden die Herzen entnommen und von dem Fettgewebe, den Herzohren (Vorhofohren, *Auriculae atrii*) und dem Aortenbogen befreit. Anschließend wurde der rechte Ventrikel, der linke Ventrikel und das Septum separiert und gewogen. Das Gewicht des rechten Ventrikels wurde in Relation zum linken Ventrikel mit Septum gesetzt (Fulton-Index) und als Maß für die Rechtsherzhypertrophie verwendet (**Formel 1**). Die Präparation des Herzens wurden von Karin Quanz durchgeführt.

Formel 1: Formel zur Berechnung des Fulton-Index als Maß für Rechtsherzhypertrophie.

RV: rechter Ventrikel; LV: linker Ventrikel; S: Septum

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

2.3.6 Akute und anhaltende Hypoxie in isolierter, ventilierter und blutfrei-perfundierter Lunge (ILU)

Um die Rolle von TRPC1 auf die HPV zu untersuchen, wurde das Model der ILU verwendet⁵². Die WT und TRPC1^{-/-} Mäuse wurden durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von Ketamin (40 bis 160 mg/kg KG) und Xylazin (8 bis 32 mg/kg KG) narkotisiert. Durch zeitgleiche Gabe von Heparin (i.p., 1000 I.E./kg KG) wurde die Koagulation des Blutes verhindert. Mit dem Ausbleiben von nozizeptiven und viszerale Reflexen wurden die Tiere auf einer Gummimatte fixiert und senkrecht positioniert. Das Fell wurde von kaudal nach kranial medial eröffnet und die Trachea vom Muskelschlauch und den Speicheldrüsen befreit. Eine Ligatur wurde um die

Material und Methoden

Trachea gelegt und der Tubus über einen Schnitt in der Trachea eingeführt und eingebunden. Während der Präparation wurde darauf geachtet, dass kein Atemstillstand eintrat. Zu diesem Zweck wurde die Lunge nach dem Einführen eines Tubus über diesen mit normoxischen Gasmisch (21% O₂, 5,3% CO₂, mit N₂ kalibriert) ventiliert. Um den Kollaps der Lunge zu verhindern, wurde mit einem künstlichen Überdruck (*positive end-expiratory pressure*) von 3 mL Wassersäule ventiliert. Anschließend wurde die Bauchdecke eröffnet, ein kleines Loch medial am Sternum in das Diaphragma geschnitten und der Thorax lateral eröffnet. Um den Brustkorb beidseitig umzuklappen, wurde dieser durch einen medialen Schnitt am Sternum eröffnet und die Rippen lateral eingeschnitten. Der auf dem Herzen aufliegende Thymus und das Perikard wurden entfernt. Eine Ligatur wurde um die PA gelegt und ein kleines Loch in den linken Ventrikel geschnitten. Anschließend wurde ein Katheter über den linken Ventrikel eingeführt und mit einem chirurgischen Faden fixiert. Um die Entstehung von Ödemen zu verhindern, wurde die Lunge vorsichtig ohne Berührung aus dem Thorax präpariert. Die Lunge wurde mit geringer Durchflussrate mit 4°C kalter Elektrolytlösung gespült, während ein weiterer Katheter über ein kleines Loch über den rechten Ventrikel in die PA eingeführt wurde. Um das Austrocknen und das Auskühlen der Lunge im Versuchsverlauf zu verhindern, wurde diese in ein nach oben geöffnetes doppelwandiges Gefäß gehängt, welches mit nassen Tüchern ausgekleidet und mit 40°C warmen Wasser beheizt wurde. Die Lunge wurde anschließend mit 37°C warmer Elektrolytlösung mit einem moderaten Durchfluss blutleer gespült. Es wurde ein rezirkulierendes Volumen von 15 mL verwendet und die Fließgeschwindigkeit des Perfusats kontinuierlich bis zum Erreichen einer Fließgeschwindigkeit von 2 mL pro Minute erhöht. Das Atemzugvolumen wurde an das KG adaptiert (10 µL/g KG). Nach Erreichen einer “*steady-state*“ Periode wurden der Beatmungsdruck, der linksventrikuläre Druck sowie der PAP, wie von Weissmann et al.¹² beschrieben, erhoben. Die Druckveränderungen wurden mit Drucksensoren aufgezeichnet, mit einem Wandler (*Transducer*) digitalisiert und durch die Software LabChart am Computer visualisiert. Die Lunge wurde zunächst normoxisch, dann für zehn Minuten hypoxisch (1% O₂, 5,3% CO₂, mit N₂ kalibriert) und anschließend erneut für 15 Minuten normoxisch ventiliert. Der normoxischen Phase folgte eine protrahierte zweite hypoxische Phase mit einer Dauer von 180 Minuten. Der Verlauf der zweiten hypoxischen Phase wurde ausgewertet. Die ILU-Versuche wurden von Karin Quanz durchgeführt.

2.4 In vitro Experimente

2.4.1 Zellkultur

In Rahmen dieser Arbeit wurden PASMCM, PAEC und alveoläre Makrophagen (M0) aus der Maus isoliert und kultiviert. Im Zuge der Arbeit wurden des Weiteren humane PASMCM (hPASMCM) und Ratten PASMCM (rPASMCM) kultiviert.

2.4.1.1 Narkose und Tiertötung

Zur Zellisolation wurden die Mäuse zunächst anästhesiert und antikoaguliert. Es wurde hierzu eine i.p. Injektion einer Mischung aus Ketamin (100 mg/kg KG), Xylazin (20 mg/kg KG) und Heparin (1000 I.E./kg KG) verwendet. Mit dem Ausbleiben der nozizeptiven und viszerale Reflexe wurde das Abdomen medial von kaudal nach kranial eröffnet und die Tiere durch die Trennung der *Vena cava inferior* und *Aorta abdominalis* entblutet, wodurch der Tod verursacht wurde (**Abbildung 14A**).

2.4.1.2 Isolierung und Kultivierung von murinen PASMCM (mPASMCM)

Murine PASMCM (mPASMCM) wurden aus präkapillaren pulmonalarteriellen Gefäßen der Maus isoliert und kultiviert. Bei der Isolation der mPASMCM wurden Eisenpartikel über die PA in die Lunge geleitet. Aufgrund ihrer Größe akkumulieren sie im präkapillaren Bereich, da sie den Kapillarbereich nicht passieren können. Dies ermöglicht die Isolation von präkapillaren Gefäßen und/oder Zellen aus diesem Bereich. Das angewandte Protokoll zur Isolierung der mPASMCM wurde in abgewandelter Form von Waypa et. al.³⁷⁹ übernommen.

Zur Isolation der mPASMCM wurde das Diaphragma im Abdominalbereich eingeschnitten und der Brustkorb durch einen medialen Schnitt am Sternum entlang eröffnet. Die Rippen wurden lateral eingeschnitten um den Brustkorb beidseitig umzuklappen. Nachdem der auf dem Herzen aufliegende Thymus und das Perikard entfernt wurden, wurde eine Ligatur um die Aorta und die PA gelegt. Um eine Ödembildung beim Spülen der Lunge zu verhindern, wurde der linke Ventrikel aufgeschnitten. Über einen Katheter, der über einen kleinen Schnitt im rechten Ventrikel in die PA eingeführt und eingebunden wurde, wurde die Lunge mit einer DPBS blutleer gespült und mit einer 37°C warmen flüssigen Agarose-Eisenpartikel-Suspension (2 mL Suspension/Lunge) befüllt (**Abbildung 14B-D**). Das Fell wurde anschließend nach kranial bis zum Unterkiefer aufgeschnitten, die Speicheldrüsen am Hals lateral weggeklappt und der die Trachea umgebende Muskelschlauch nach kranial aufgeschnitten. Anschließend wurde eine

Material und Methoden

Ligatur um die freiliegende Trachea gelegt und der Tubus über einen Schnitt in der Trachea eingeführt und eingebunden (**Abbildung 14E**). Die Lunge wurde über den Trachealtubus mit einer flüssigen Agarose-Lösung befüllt bis sie komplett aufgebläht war (**Abbildung 14F**).

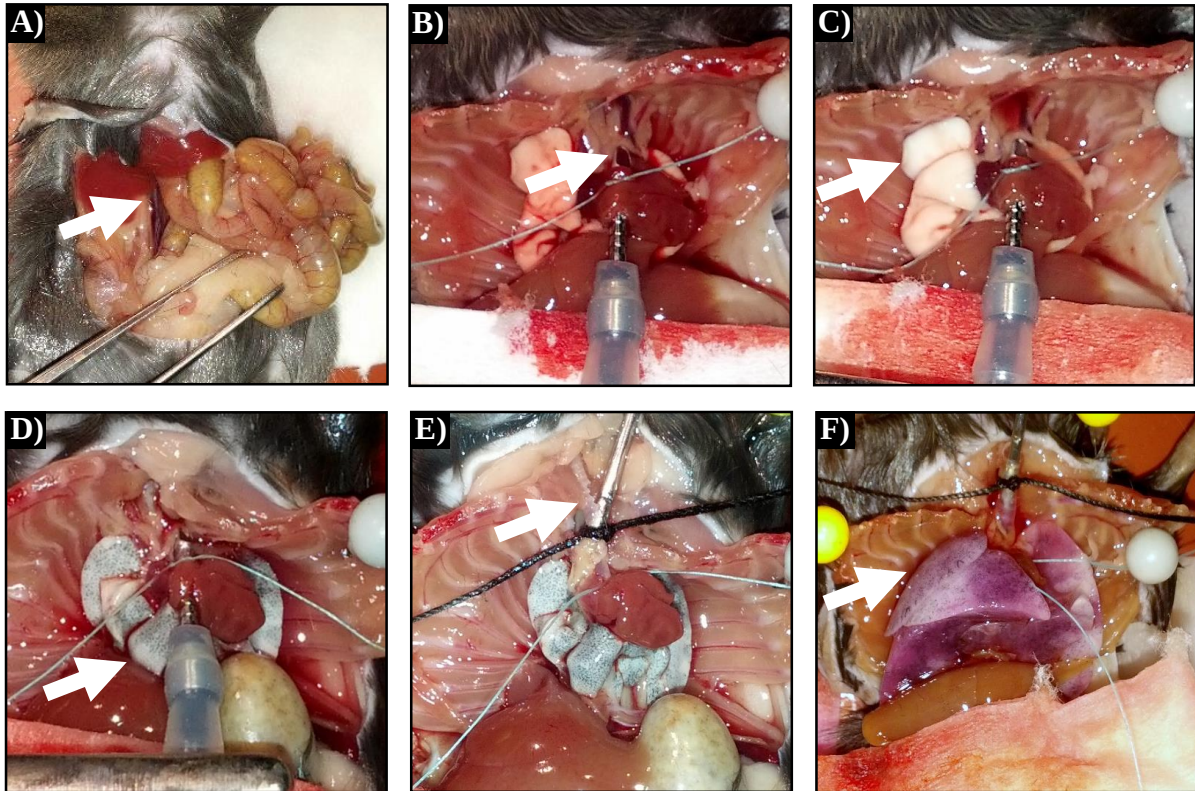


Abbildung 14: Isolierung von PASC aus der Mauslunge.

A) Entbluten der Lunge über die Eröffnung der *Aorta abdominalis* und *Vena cava inferior*. **B)** Einführen des Katheters in die Pulmonalarterie. **C)** Lunge nach Spülen mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter Lösung. **D)** Lunge nach Befüllen mit einer Agarose-Eisenpartikel-Suspension. **E)** Einführung des Tubus in die Trachea und **F)** befüllen der Lunge mit einer Agarose-Lösung. Die Pfeile markieren die beschriebenen Eingriffe.

Unter Herausziehen des Trachealtubus wurde die Ligatur zugezogen, die Lunge herauspräpariert und zum Verfestigen der Agarose-Lösung in 4°C kalte DPBS überführt. Das Herz, die Trachea und die groben Gewebereste wurden unter einer sterilen Werkbank entfernt und die fünf Lungenlappen mit Hilfe der Drei-Scherentechnik mechanisch zerkleinert. Die Eisen-befüllten Gewebestücke wurden mehrfach in DPBS mit Hilfe eines magnetischen Konzentrierers gewaschen. Anschließend wurden die Gewebestücke in 37°C warmer Kollagenase-Lösung für 50 bis 60 Minuten enzymatisch angedaut. Die Geweberesten wurden dann mechanisch mit Hilfe von Kanülen (zuerst 15 G, dann 18 G) durch Scherkräfte zerkleinert und mit dem magnetischen Konzentrierer von den Eisen-befüllten Gefäßstücken separiert. Um die Kollagenase-Aktivität zu stoppen, folgten weitere Waschschrte in vorgewärmten Medium II. Die isolierten Gefäßstücke wurden in SMC-Medium I aufgenommen und auf Zellkulturschalen ausgesät (Aussaat 1, Passage 0). Innerhalb von fünf bis zehn Tagen wuchsen

Material und Methoden

mPASMCM aus den isolierten Gefäßstücken (**Abbildung 15**). Für eine weitere Aussaat wurden die Gefäßstücke von der Kulturschale abgenommen, in DPBS gewaschen und auf eine neue Kulturschale in frisches SMC-Medium I übertragen (Aussaat 2, Passage 0). Die Aussaat 1 wurde ebenfalls gewaschen und mit frischem SMC-Medium I versorgt. Nach drei bis fünf Tagen wurde eine weitere Aussaat gemacht (Aussaat 3, Passage 0). Aussaaten 1 bis 3 wurden maximal 18 Tage nach der Isolation mit 1-fach Trypsin von den Platten gelöst, bei 338 g (1200 rpm) für fünf Minuten zentrifugiert und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Es wurden 5×10^3 bis 1×10^4 pro cm^2 auf die Kulturschalen ausgesät (Passage 1). Die anschließende Kultivierungsdauer der mPASMCM sowie die Wahl des Mediums (SMC-Medium I bis III) war vom jeweiligen Versuch abhängig.

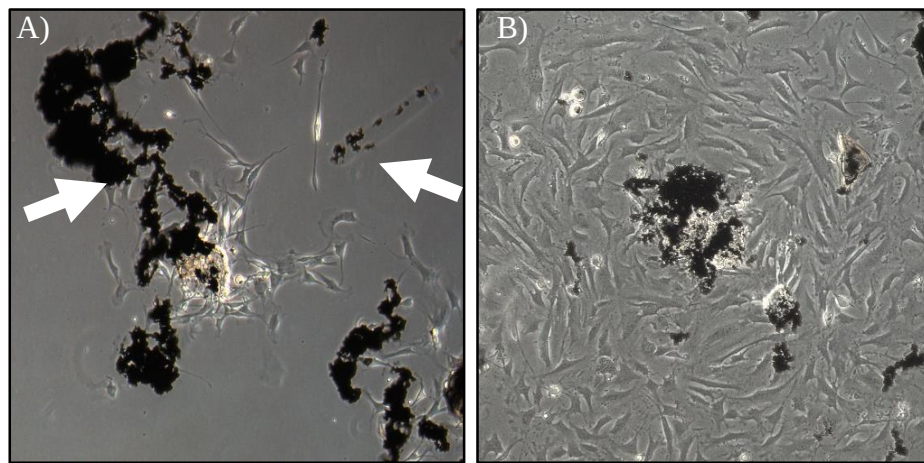


Abbildung 15: Murine PASMCM nach der Isolation.

A) Fünf Tagen nach der Isolation wuchsen mPASMCM in SMC-Medium. Der linke Pfeil markiert die Eisenpartikel. Der rechte Pfeil markiert ein Eisen-gefülltes Gefäßstück. **B)** Mehrere Tage nach Isolation waren die isolierten mPASMCM konfluent und wurden in Passage 1 überführt.

2.4.1.3 Isolierung und Kultivierung von murinen PAEC (mPAEC)

Die Isolation der murinen PAEC (mPAEC) wurde mit Hilfe von Endothel-spezifischen, an magnetische Beads gekoppelten Antikörpern durchgeführt und erfolgte in abgewandelter Form nach Weissmann et al.³⁸⁰.

Nach dem Töten der Mäuse wurde der Thorax, wie bereits beschrieben, eröffnet, die Lungen ohne vorherige Perfusion entnommen und in eine 4°C kalte steril-filtrierte Hank's gepufferte Salzlösung (*hank's balanced salt solution*, HBSS^{+/+}) überführt. Die Lungenflügel wurden von dem Herzen und den groben Geweberesten getrennt und auf einer Petrischale mit Hilfe von Skalpell in 1 bis 2 mm große Stücke zerkleinert. Die Stücke wurden in 20 mL 4°C kalte HBSS^{+/+} aufgenommen und in einem 40 µm Sieb unter Rühren gespült. Das Gewebe wurde in 20 mL einer 37°C warmen Dispase-Lösung überführt und in einem Wasserbad unter Schütteln

Material und Methoden

für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellkulturschalen mit Fibronectin für eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet und anschließend getrocknet. Der VE-Cadherin Antikörper wurde an magnetische *Beads* (Dynabeads) gekoppelt. Dazu wurden die *Beads* mit einer 0,5%igen BSA-Lösung drei Mal gewaschen, wobei die *Beads* mit einem Magneten vom Medium getrennt wurden. Die *Beads* wurden erneut in einer 0,5%igen BSA-Lösung aufgenommen und mit den VE-Cadherin Antikörpern auf einem Über-Kopf-Schüttler lichtgeschützt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die an den VE-Cadherin Antikörper-gekoppelten *Beads* wurden wiederholt in einer 0,5%igen BSA-Lösung gewaschen, in dieser aufgenommen und innerhalb einer Stunde verwendet. Das Gewebe wurde nach Ablauf der Inkubationszeit resuspendiert und durch ein 70 µm Sieb in das EC-Medium I aufgenommen. Das Filtrat wurde auf vier 15 mL Gefäße verteilt und bei 290g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in einer warmen 0,5%igen BSA-Lösung resuspendiert, erneut bei 290g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem Über-Kopf-Schüttler mit den VE-Cadherin Antikörper-gekoppelten *Beads* inkubiert. Das Gesamtvolumen wurde auf vier 15 mL Gefäße verteilt und mit einer 0,5%igen BSA-Lösung mehrfach gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Suspension mit einem Magneten getrennt und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nach der Aufreinigung in EC-Medium II aufgenommen und ausplattiert (Passage 0, **Abbildung 16**). In dieser Arbeit wurden die isolierten mPAEC in Passage 0 verwendet.

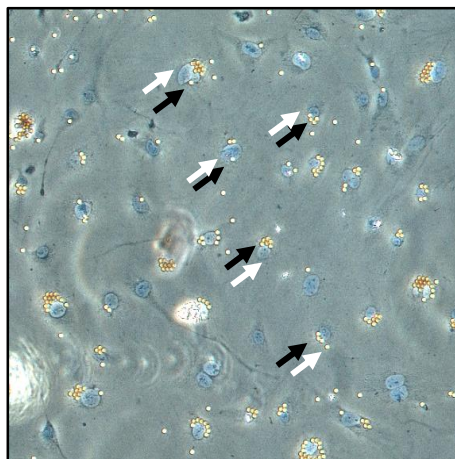


Abbildung 16: Murine PAEC nach Isolation.

Mit Hilfe von VE-Cadherin Antikörper-gekoppelten *Beads* (schwarze Pfeile) wurden murine PAEC (weiße Pfeile) isoliert.

Material und Methoden

2.4.1.4 Isolation von alveolaren Makrophagen (M0)

Alveoläre Makrophagen wurden in abgewandelter Form nach Zhang et al.³⁸¹ aus murinen Mäusen isoliert. Die Tiere wurden, wie bereits beschrieben, betäubt, getötet und die Trachea freigelegt. Der Trachealtubus wurde durch ein kleines Loch in die Trachea eingeführt. Anschließend wurde mit Hilfe einer bronchioalveolaren Lavage die M0 aus der Lunge gespült. Hierzu wurden die Lunge drei Mal mit einer 2 mL warmen DPBS befüllt. Die bronchioalveolare Lavage wurde zunächst auf Eis gekühlt, anschließend bei 400g bei 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Medium III resuspendiert und die gewonnenen Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden in Medium III aufgenommen und auf eine 12-Well Platte ausgesät. Die M0 waren nach einigen Stunden adhären und konnten am gleichen Tag für Versuche genutzt werden.

2.4.1.5 Isolierung und Kultivierung von Ratten PASM (rPASM)

PASM aus der Ratte wurden nach einem etablierten Protokoll³⁸² durch technische Assistenten der Arbeitsgruppe isoliert. Die rPASM wurden in Medium II kultiviert und in Passage drei bis vier benutzt.

2.4.1.6 Kultivierung von humane PASM (hPASM)

Humane PASM wurden in SMC-Medium IV kultiviert und in Passage vier bis sechs verwendet.

2.4.2 Normoxische und hypoxische Exposition von Zellen

Die Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten Zellen erfolgte bei einer O₂-Konzentration von 21% (Normoxie) und einer CO₂-Konzentration von 5%. Die Temperatur betrug 37°C. Zu Versuchszwecken wurden die Zellen bei einer O₂-Konzentration von 1% (Hypoxie), einer CO₂-Konzentration von 5% und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Je nach Versuchsziel wurden die Zellen für 24, 72 oder 120 Stunden Hypoxie ausgesetzt. Um eine Reoxygenierung während der Medienwechsel sowie der finalen Gewinnung von Proben für molekulare Untersuchungen zu verhindern, wurde in einer geschlossenen Hypoxie-Kammer gearbeitet. Alle Medien wurden zuvor hypoxisch begast.

2.4.3 Transfektion

Die Transfektion von in dieser Arbeit verwendeten mPASCs wurde mit Hilfe der Substanz Lipofectamin nach einem optimierten Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierzu wurde Lipofectamin ($2,5 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) in OptiMem ($50 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 100 nM siRNA oder $2,5 \text{ ng}/\text{cm}^2$ Plasmide³⁸³ hinzugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit dem Reaktionsgemisch im jeweiligen Kulturmedium über einen Zeitraum von 24 Stunden bis 120 Stunden behandelt. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels RTqPCR und/oder Western Blot Analyse überprüft. Bei einer Versuchsdauer von 120 Stunden wurden die Zellen nach 72 Stunden erneut transfiziert.

2.4.4 Migrationsassay

In dieser Arbeit wurde das Migrationsverhalten von mPASCs mit Hilfe der *Wound-Healing* Methode bestimmt. Hierzu wurden 9000 mPASCs pro cm^2 in Passage 1 in jeweils eine Silikon-Kammer ausgesät und für 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden anschließend für 72 Stunden Normoxie oder Hypoxie exponiert. In den letzten 12 Stunden wurden die Silikon-Kammern entfernt. Der entstandene nicht mit Zellen bewachsene $500 \mu\text{m}$ breite Spalt wurde durch die mPASCs invadiert. Die Migration wurde zum Zeitpunkt null, nach vier Stunden und dann alle zwei Stunden am Leica DMIL Mikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung fotografisch dokumentiert (DFC420 C Software LAS V. 4.5.0). Es wurden drei Fotos pro Ansatz aufgenommen (**Abbildung 17**) und das Migrationsverhalten ausgewertet.

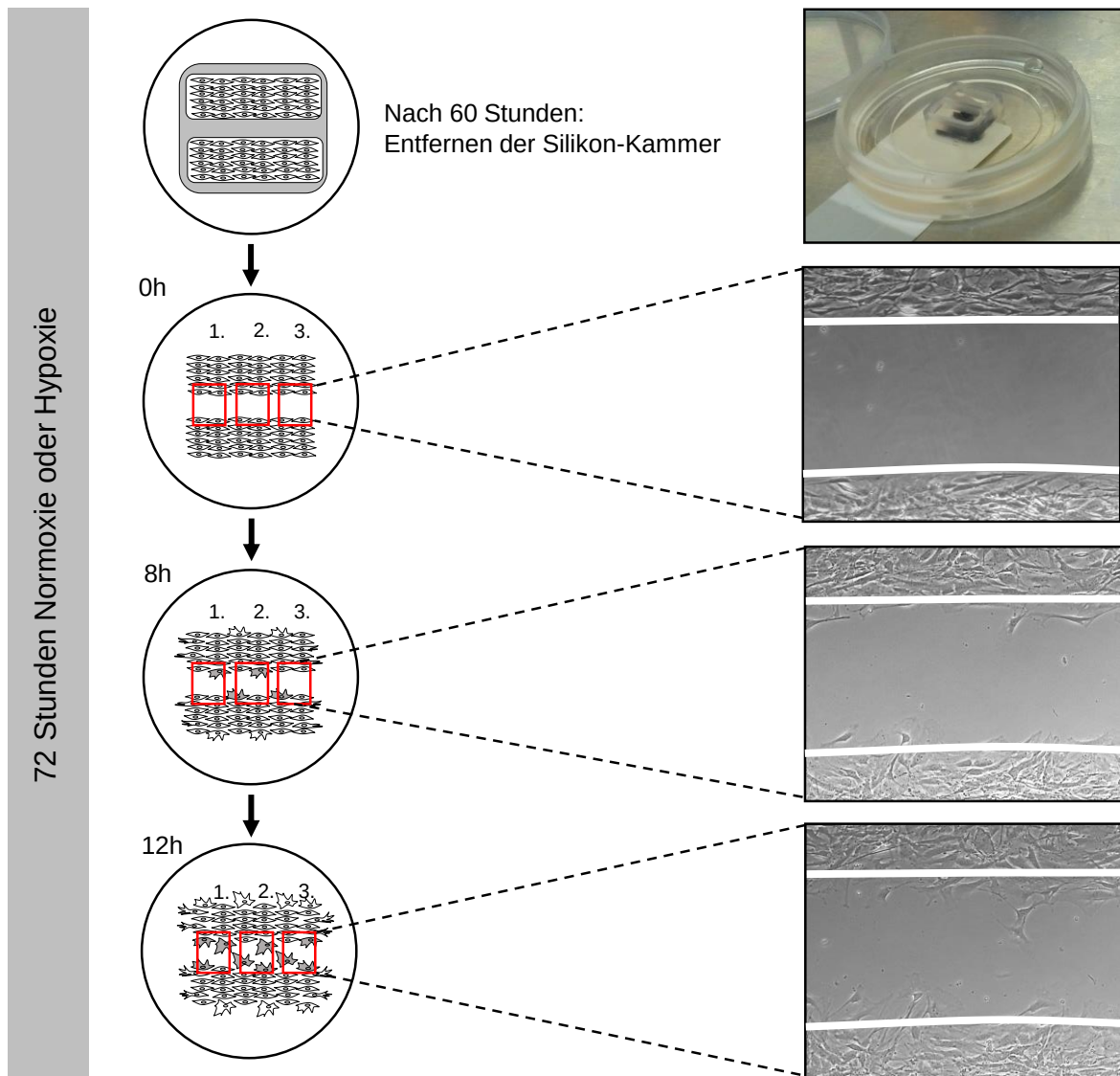


Abbildung 17: Experimenteller Aufbau des Migrationsassays.

Nach der Aussaat wurden die mPASC 60 Stunden lang unter Versuchsbedingungen kultiviert. Nach Ablauf der 60 Stunden wurden die Silikon-Kammern entfernt und die Migration gestartet. Es wurden drei Ausschnitte pro Ansatz für die nächsten 12 Stunden fotografisch dokumentiert. h: hours (Stunden).

Die Auswertung der Aufnahmen wurden mit Hilfe der Grafikprogramme Paint.net und ImageJ durchgeführt. Die Fotos einer Zeitreihe eines dokumentierten Bereiches wurden mit der Software Paint.net überlagert. Anhand von Markierungspunkten wurden die Fotos deckungsgleich ausgerichtet und die Größe des Bereichs innerhalb einer Zeitreihe definiert, um bei der anschließenden Analyse mit der Software ImageJ eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Während der Analyse wurden die zellfreien Bereiche im Spalt zu allen Zeitpunkten vermessen und die Veränderung der Flächen im Vergleich zur Anfangsfläche nach **Formel 2** in Prozent berechnet:

Material und Methoden

Formel 2: Formel zur Berechnung der Zellmigration.

A: Fläche; A_x: Fläche nach X Stunden; A₀: Fläche zum Zeitpunkt 0.

$$A [\%] = 100\% - \frac{A_x}{A_0} \times 100$$

Die statistische Auswertung der Migration von mPASCs unter Normoxie oder Hypoxie erfolgte zum Zeitpunkt 72 Stunden. Dies entsprach einer Migrationsdauer von 12 Stunden (**Abbildung 18**).

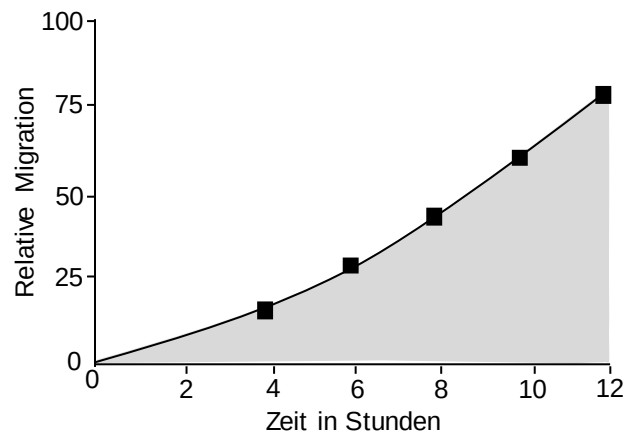


Abbildung 18: Verlauf der Migration innerhalb von 12 Stunden.

Zum Zeitpunkt 0 war 0% der Fläche von den mPASCs invadiert worden. Nach 8 Stunden waren ca. 50% der Fläche, nach 12 Stunden ca. 80% der Fläche von den mPASCs eingenommen worden.

2.4.5 Proliferationsassay

Um das Proliferationsverhalten der PASCs zu untersuchen, wurden das Click-iT EdU Alexa Fluor 488 *Imaging Kit* und das BrdU *Kit* verwendet. Beide Methoden beruhen auf dem Prinzip der Detektion eines in die DNA integrierten chemisch-modifizierten Uridins als Thymidin-Analogon. Anhand des Einbaugrades können Rückschlüsse auf die DNA-Syntheserate, welche ein indirektes Maß für die Proliferation ist, gemacht werden.

Bei 5'-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) handelt es sich um ein durch ein Alkine modifiziertes Uridin. Das EdU reagiert im sauren Milieu mit einem Fluoreszenz-Molekül (Alexa Fluor 488), wodurch ein stabiler, an ein Alexa Fluor 488-gekoppelter Triazol-Ring entsteht (**Abbildung 19**). Bei der Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert EdU Licht der Wellenlänge 519 nm (grün). Diese Fluoreszenz kann unter dem Mikroskop detektiert und analysiert werden. Die Methode ermöglicht die Untersuchung der DNA-Syntheserate von Zellen, dessen Zellzahl zu Beginn des Versuches nicht bekannt ist.

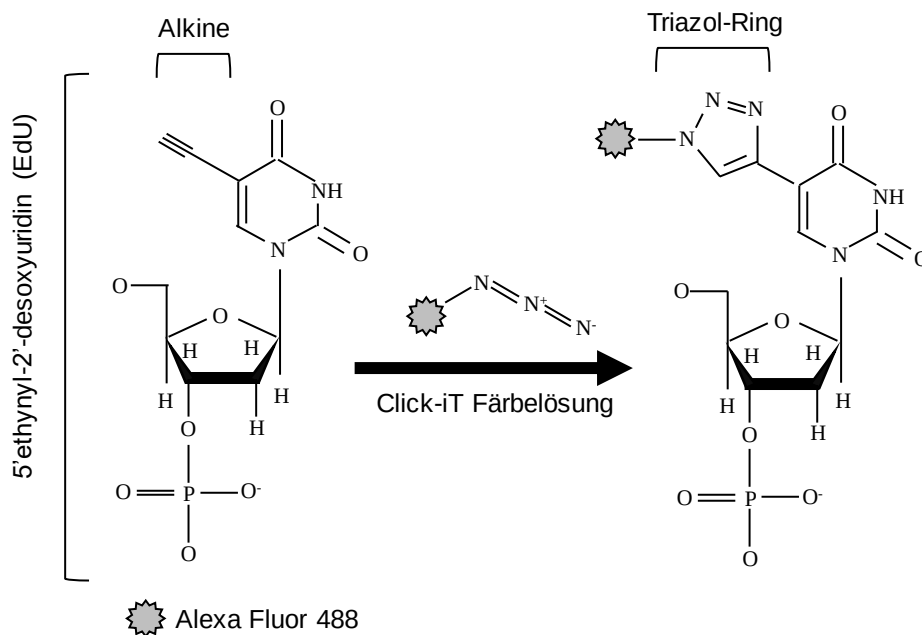


Abbildung 19: Schematische Darstellung der chemischen Reaktion bei Verwendung von 5'Ethynyl-2'-Desoxyuridin.

Uridin-Monophosphat modifiziert mit einem Alkyne reagiert im sauren Milieu mit einem Fluoreszenz-Molekül (Click-iT Färbelösung). Es entsteht ein stabiler, an Alexa Fluor-488 gekoppelter Tiazol-Ring, welcher fluoresziert. Verändert nach Diermeier-Daucher et al.³⁸⁴.

Bei 5'Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) handelt es sich um ein durch Brom chemisch modifiziertes Uridin. Das BrdU kann immunhistochemisch mit Hilfe von dem Enzym-gekoppelten Anti-BrdU Antikörper detektiert werden. Durch enzymatische Umsetzung eines zugefügten Substrates kommt es zur Blaufärbung, die mit Hilfe eines *Microplate Readers* quantifiziert werden kann. Voraussetzung für die Vergleichbarkeit mehrerer Proben ist das Aussäen einer definierten Zellzahl und die Normalisierung zu einer Kontrolle. Diese erschwert die Verwendung des BrdU Kits für die Analyse der Proliferation der Primärkulturen und unterschiedlicher Genotypen.

Die Proliferation wurde nach Optimierung der jeweiligen Herstellerprotokolle durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden die primären mPASC der Passage 0 mit dem EdU Kit und passagierte mPASC der Passagen 1 bis 2 mit dem EdU oder dem BrdU Kit untersucht. Die verwendeten mPASC der Passage 0 aus WT und TRPC1^{-/-} Mäusen wurden nach der Isolierung auf 24-Well Platten ausgesät und für 120 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert (**Abbildung 20A, B**). Beim *knockdown* von TRPC1 wurden die mPASC in Passage 0 nach der Isolierung sowie am dritten Tag mit 100 nM anti-TRPC1 siRNA sowie 100 nM Kontroll-siRNA transfiziert und ebenfalls für 120 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert (**Abbildung 20B**). Bei Versuchen mit passagierten mPASC wurden 2500 Zellen pro cm² bei einer Versuchsdauer von 24 oder 72 Stunden und 1000 Zellen pro cm² bei einer

Material und Methoden

Versuchsdauert von 120 Stunden auf einer 24-Well Platte ausgesät und unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert.

In den Untersuchungen der Rolle von HIF-1 α und TGF- β 1 in der Proliferation von passagierte mPASC wurde die Zellen mit 100 nM anti-HIF-1 α oder Kontroll-siRNA transfiziert und mit 5 ng pro mL TGF- β 1 oder dem Lösungsmedium behandelt (**Abbildung 20C**).

Die Behandlung der PASC mit 10 μ M EdU-Lösung oder 10 μ M BrdU-Lösung erfolgte 24 Stunden vor dem Versuchsende (**Abbildung 20**).

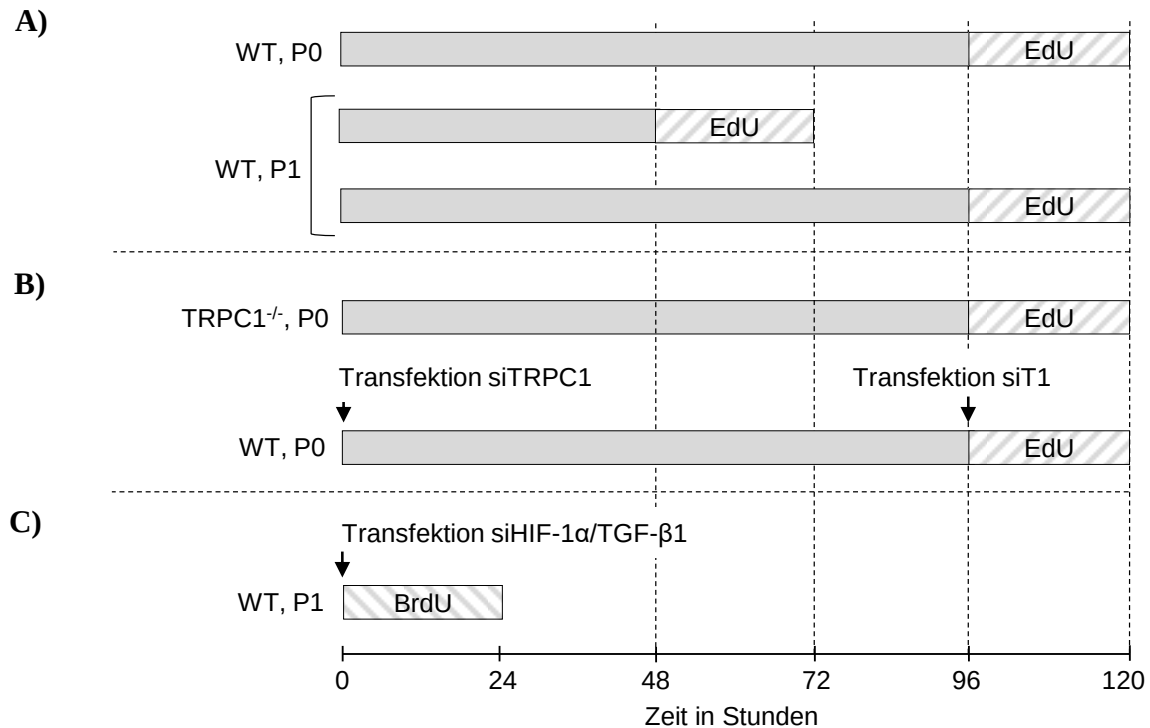


Abbildung 20: Schematische Darstellung der durchgeführten Proliferationsassays.

A) Untersuchung der basalen Proliferation von WT mPASC der Passage 0 (P0) nach 120 Stunden sowie der Passage 1 (P1) nach 72 Stunden Normoxie oder Hypoxie unter Verwendung von 5'Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU). **B)** Untersuchung der Rolle von TRPC1 in der Hypoxie-induzierten Proliferation unter Verwendung von TRPC1^{-/-} mPASC oder von WT mPASC nach *knockdown* von TRPC1 mit Hilfe von siRNA gegen TRPC1 (siTRPC1) unter Verwendung von EdU. **C)** Untersuchung der Rolle des Hypoxie-induzierten Faktor 1 α (HIF-1 α) mit Hilfe von siRNA gegen HIF-1 α (siHIF-1 α) und der Rolle des transformierenden Wachstumsfaktors β 1 (*transforming growth factor*- β 1, TGF- β 1) auf die Hypoxie-induzierten Proliferation in P1 in WT mPASC unter Verwendung von 5'Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU).

Nach der Inkubation mit EdU wurden die mPASC nach dem Protokoll in **Tabelle 4** gefärbt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Material und Methoden

Tabelle 4: Protokoll der EdU-Färbung.

<u>Schritt</u>	<u>Inkubationszeit</u>	<u>Reagenz</u>	<u>Anmerkung</u>
1.	>1 Min.	0,1%ige BSA-Lösung	Waschen
2.	5 Min.	Aceton-Methanol Lösung	Fixierung und Permeabilisierung
3.	20 Min.	3%ige BSA-Lösung	Blocken
4.	30 Min.	Click-iT Reaktionslösung	Färbung
5.	1 Min.	Hoechst (1:1000)	Zellkernfärbung

Mit Hilfe eines Leica DMIL Mikroskops mit einer Kamera (DFC420 C) und eines Fluoreszenzgerätes wurden die EdU-positiven und Hoechst-positiven mPASC (Absorptionsmaximum 340 nm, Emissionsmaximum 465 nm, blau) mit Hilfe der Software LAS fotografiert (**Abbildung 21**).

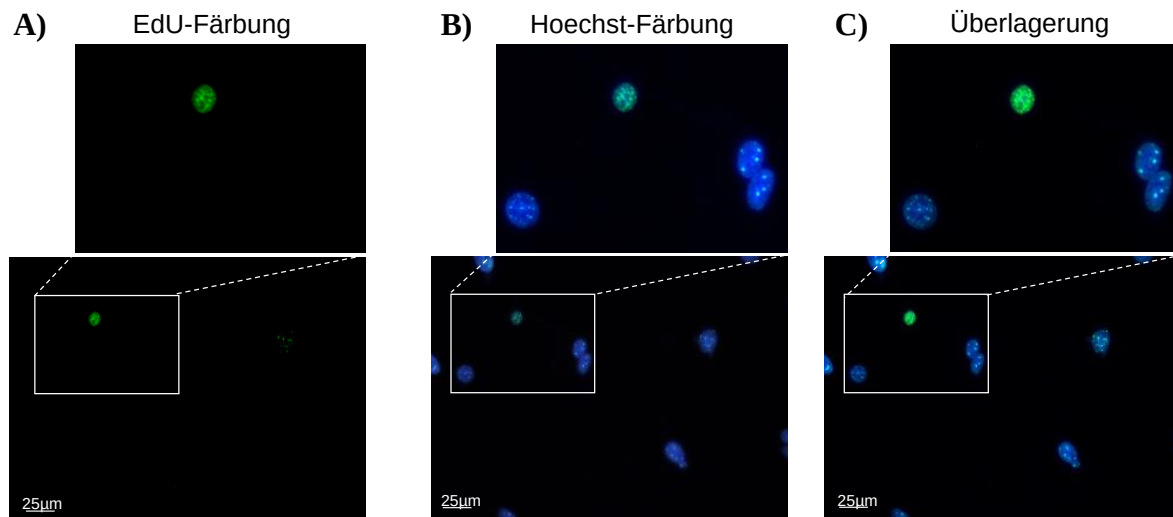


Abbildung 21: Hochauflösende Fotos zur Demonstration der Methode der Proliferationsuntersuchung.

Proliferierende mPASC kultiviert unter Normoxie bauen **A)** 5'Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) bei der DNA-Synthese ein, die grün fluoreszieren. **B)** Mit dem Farbstoff Hoechst wird DNA angefärbt, wobei es bei Anregung im UV-Bereich zu blauer Fluoreszenz kommt. Die Färbung dient der Ermittlung der Gesamtzahl aller Zellen im Bild. **C)** Überlagerung der Bilder aus **A)** und **B)** unter 400x Vergrößerung.

Die Proliferationsrate wurde durch das Auszählen der EdU-positiven und Hoechst-positiven mPASC unter Verwendung der Software Paint.net ermittelt. Durch die Relation von EdU-positiven zu Hoechst-positiven mPASC wurde die DNA-Syntheserate (Proliferationsrate) in Prozent (**Formel 3**) berechnet:

Material und Methoden

Formel 3: Berechnung der DNA-Syntheserate (Proliferationsrate).

EdU(+): EdU-positiv; Hoechst(+): Hoechst-positiv

$$\text{Proliferationsrate [\%]} = \frac{\text{EdU}^{(+)} \text{ Zellen}}{\text{Hoechst}^{(+)} \text{ Zellen}} \times 100$$

Nach 24 Stunden BrdU-Inkubation wurden die mPASCs nach dem folgenden Protokoll (Tabelle 5) gefärbt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 5: Protokoll der BrdU-Färbung.

<u>Schritt</u>	<u>Inkubationszeit</u>	<u>Reagenz</u>	<u>Anmerkung</u>
1.	30 Min.	FixDenat	Fixierung und Permeabilisierung
2.	90 Min.	Anti-BrdU Antikörper (1:100)	Antikörper-Bindung an BrdU
3.	>1 Min.	Waschpuffer	Waschen
4.	Messung nach 20 Min.	Substrat	Substratumsetzung

Die enzymatische Umsetzung des Substrates wurde mit einem *Multiplate Reader* bei 370 nm (Referenzwellenlänge: 492 nm) nach 20 Minuten gemessen.

2.4.6 Apoptoseassay

Das Apoptoseverhalten von mPASCs unter Normoxie und Hypoxie wurde mit dem Caspase-Glo[®]3/7 Assay untersucht. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden pro Maus 5000 mPASCs pro cm² (vierfach Ansatz pro Kondition) auf eine 96-Well Kulturplatte ausgesät.

Beim *knockdown* von TRPC1 wurden die mPASCs in Passage 1 mit 100 nM anti-TRPC1 oder Kontroll-siRNA transfiziert. Die mPASCs wurden für 72 Stunden Normoxie oder Hypoxie exponiert. Vier Stunden vor Versuchsende wurden einige mPASCs mit 1 µM Staurosporin behandelt, wodurch Apoptose induziert wurde. Mit Staurosporin-behandelte mPASCs wurden als Positivkontrollen verwendet. Nach Versuchsende wurden die mPASCs mit dem Caspase-Glo[®]3/7 Reagenz bei Raumtemperatur für drei Stunden inkubiert. Die Lumineszenz wurde anschließend am *Microplate Reader* mit der Software *i-Control* gemessen.

2.4.7 Stimulierung mit Wachstumsfaktoren

Für die Stimulierung mit Wachstumsfaktoren wurden mPASMC in Passage 2 für 24 Stunden in SMC-Medium III kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen für 2, 24 und 48 Stunden mit den Wachstumsfaktoren IGF-1 (100 ng/mL), EGF (50 ng/mL), PDGF-BB (10 ng/mL), TNF α (20 ng/mL), TGF- β 1 (5 ng/mL) oder VEGF 120 (20 ng/mL), 164 (20 ng/mL) oder 188 (20 ng/mL) stimuliert. Die Zellen wurden nach der Stimulation auf Eis in einer DPBS gewaschen und in RLT-Puffer oder 1-fach Zelllyse-Puffer lysiert.

2.4.8 Kalziummessungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ca²⁺-Homöostase der mPASMC mittels intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationsmessungen mit Fura2-AM untersucht. Die Methode wurde zuvor in rPASMC und mPASMC zur Untersuchung der HPV unter akuter Hypoxie etabliert³⁸⁵. Um Messungen in mPASMC unter chronischer Hypoxie durchzuführen, wurde diese Methode abgewandelt.

Die [Ca²⁺]_i wurde unter Verwendung von Fura2-AM analysiert. Fura2-AM ist ein Ca²⁺-Indikator, welcher durch seine lipophile Estergruppe Azetoxymethylester (AM) membrangängig ist. Fura2-AM wird in der Zelle durch Esterasen deesterifiziert, sodass es nicht mehr in den extrazellulären Raum diffundieren kann. Durch binden von freiem cytosolischen Ca²⁺ an das Fura2-AM kommt es bei der Fluoreszenzemission von 510 nm zu einer Signalzunahme bei der Anregungswellenlänge von 340 nm und zu einer Signalabnahme bei der Anregungswellenlänge von 380 nm. Die Fluoreszenzemission bei der Anregungswellenlänge von 360 nm ist konstant (isobestischer Punkt). Durch Relation der Emissionswerte zwischen den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm lassen sich Rückschlüsse auf die [Ca²⁺]_i machen. Je größer der Quotient ist, desto mehr [Ca²⁺]_i befindet sich in der Zelle. Der Quotient ist dabei unabhängig vom Fura2-Beladungszustand der Zelle (**Abbildung 22**).

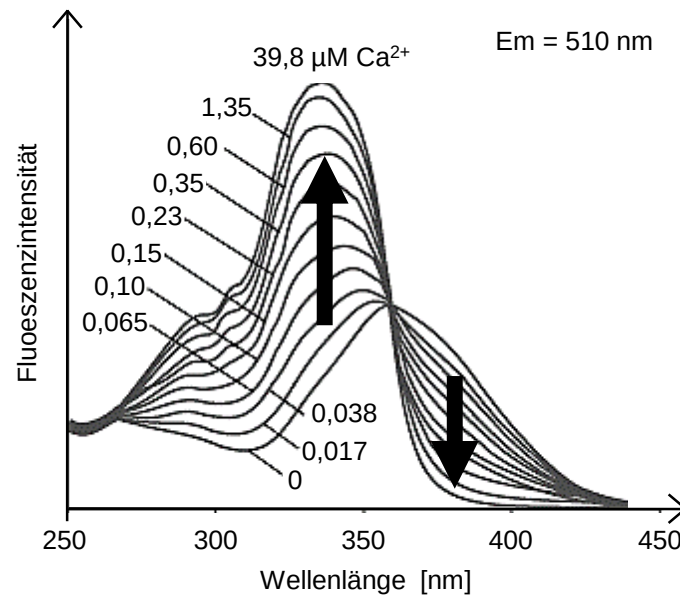


Abbildung 22: Fluoreszenzintensitäts-Spektrum in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration.

Die Fluoreszenzintensität verstärkt sich in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration bei der Anregungswellenlänge von 340 nm (linker Pfeil), während sie bei der Anregungswellenlänge von 380 nm abnimmt (rechter Pfeil). In Ca^{2+} -freiem Milieu erreicht die Fluoreszenzintensität bei 340 nm ihr Minimum und bei 380 nm ihr Maximum. Em: Emissionswellenlänge. Verändert nach Grynkiewicz et al.³⁸⁶.

2.4.8.1 Die Ca^{2+} -Messung

Die frisch isolierten mPASMCM wurden auf Kollagen-beschichtete 35 μ -Ibidi Kulturschalen mit Glasboden ausgesät und für 120 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert.

In den Experimenten wurden zwei unterschiedliche Substanzen verwendet: 1-Oleocyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) und Cyclopiazonsäure (*cyclopiazonic acid*, CPA). Bei Experimenten mit der Substanz OAG wurden die mPASMCM vor der Messung mit Ca^{2+} -haltiger Hepes-Ringer-Lösung (HR^+) gewaschen und anschließend mit 5 μM Fura2-AM 30 Minuten lang bei 37°C beladen. Murine PASMCM, die mit CPA stimuliert wurden, wurden vor der Beladung mit Fura2-AM in Ca^{2+} -freier Hepes-Ringer-Lösung (HR^-) eine Stunde bei 37°C im Inkubator oder in der Hypoxie-Kammer präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Fura2-AM in HR^- Lösung beladen. Nach dem Beladen wurden diese erneut mit Hepes-Ringer-Lösung (HR^- oder HR^+) gewaschen. Vor der Messung wurden die Kulturschalen mit 500 μL HR^- oder HR^+ befüllt und mit dreilagigem Parafilm abgedichtet, um eine Reoxygenierung während der Messung zu verhindern. Die Kulturschalen wurden in einen auf 37°C temperierten Tischeinsatz eingesetzt und mit einem Olympus BX50 WI Mikroskop untersucht.

Unter Nutzung eines 40-fachen Eintauchobjektives wurde ein geeigneter Messbereich bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm (Polychrom II) am Mikroskop ausgewählt. Die IMAGO CMOS-Kamera übertrug das Emissionsbild nach Passieren eines Emissionsfilters (510 nm bis 520 nm) auf den Computer. Die Zellen wurden mit Hilfe der Software TillVision bei den

Material und Methoden

Anregungswellenlängen von 340 nm, 360 nm und 380 nm markiert. Die Messung wurde unter den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm durchgeführt. Die Emissionswerte für beide Wellenlängen wurden aufgezeichnet (ein Bild pro Sekunde). Es wurden nur Zellen gemessen, dessen Fluoreszenzsignal bei 380 nm nicht das Fluoreszenzsignal bei 340 nm überstieg. Ein stärkeres Signal bei 380 nm Anregungswellenlänge würde auf eine unphysiologisch hohe basale $[Ca^{2+}]_i$ hindeuten.

In Experimenten mit OAG wurden die mPASMCM zwei Minuten nach Start der Messung mit 100 μ M OAG-Lösung stimuliert. Die Applikation wurde über ein Injektionsloch im Deckel durchgeführt, welches vor der Injektion luftdicht verschlossen wurde und nach der Injektion versiegelt wurde. Die Reaktion der Zellen wurde über die nächsten 13 Minuten aufgezeichnet (Abbildung 23).

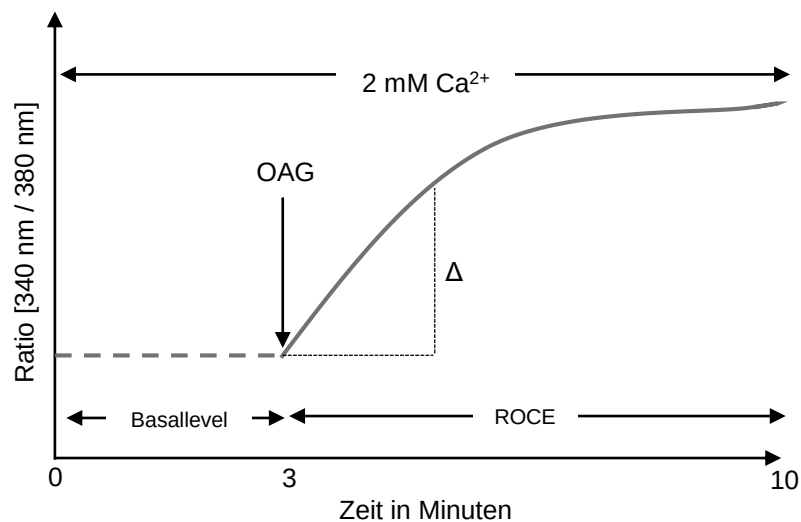


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf und erwartete Reaktion der mPASMCM auf 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol.

Nach dem Beladen mit Fura2-AM wurde die basale Fluoreszenzintensitätsveränderung (Ratio 340 nm und 380 nm) gemessen. Nach drei Minuten wurde 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) hinzugegeben und die Reaktion der mPASMCM auf die Substanz für weitere sieben Minuten gemessen. Der Versuch wurde in Ca^{2+} -haltigem Milieu durchgeführt. ROCE: *receptor-operated Ca^{2+} entry* (Rezeptor-vermittelter Ca^{2+} Einstrom); Δ : Steigung nach OAG Gabe.

In Experimenten mit der Substanz CPA wurden die mPASMCM eine Minute nach Messbeginn mit 100 μ M CPA stimuliert. Nach zehn Minuten wurde die extrazelluläre $[Ca^{2+}]$ durch eine einmalige Ca^{2+} -Gabe auf 8 mM angehoben. Die Reaktion der Zellen wurden weitere sechs Minuten aufgezeichnet (Abbildung 24).

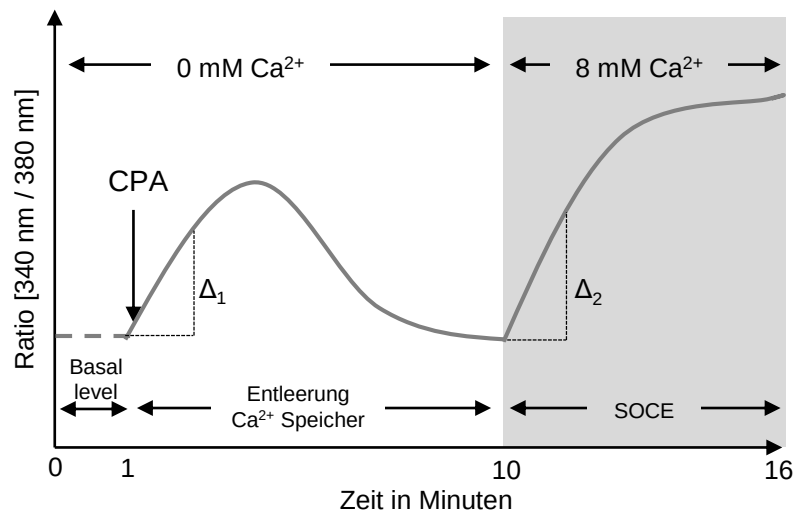


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf und erwartete Reaktion der mPASMIC auf Cyclopiazonsäure.

Nach dem Beladen mit Fura2-AM wurde die basale Fluoreszenzintensitätsveränderung (Ratio 340 nm und 380 nm) gemessen. Nach einer Minute wurde Cyclopiazonsäure (*cyclopiaconic acid*, CPA) hinzugegeben und die Reaktion der mPASMIC auf die Substanz für weitere neun Minuten in Ca^{2+} -freiem Milieu gemessen. Anschließend wurde das Milieu mit Ca^{2+} angereichert und die Reaktion der mPASMIC für weitere sechs Minuten gemessen. SOCE: store-operated Ca^{2+} entry (Speicher-vermittelter Ca^{2+} Einstrom); Δ_1 : Steigung nach CPA Gabe; Δ_2 : Steigung nach Ca^{2+} Gabe.

2.4.8.2 Auswertung

Die Auswertung der Messungen wurde mit Hilfe der Software TillVision durchgeführt. Pro Bild wurde, nach Abzug des Hintergrunds, der Quotient aus dem Fura2-Signal zwischen der Anregungswellenlänge 340 nm und 380 nm gebildet. Die Daten wurden exportiert und ausgewertet. Sowohl bei Versuchen mit der Substanz OAG als auch CPA wurde das basale Fluoreszenzsignal unter Normoxie und Hypoxie miteinander verglichen. Es wurde die Steigungen Δ , Δ_1 , Δ_2 bestimmt, die als Maß für den Anstieg des Signals pro Sekunde (Ca^{2+} -Einstromgeschwindigkeit) herangezogen wurden. Außerdem wurde die maximal erreichte $[\text{Ca}^{2+}]$ nach CPA-, OAG- und extrazellulärer Ca^{2+} -Gabe kalkuliert. Zusätzlich wurde der relative Vergleich der basalen und maximalen $[\text{Ca}^{2+}]$ nach OAG- oder Ca^{2+} -Gabe berechnet.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Immunohistochemie - Muskularisierung

Um den Muskularisierungsgrad der Gefäße in WT und TRPC1^{-/-} Mäusen nach 21-tägiger Hypoxie-Exposition zu untersuchen, wurden die in Paraffin fixierten Lungen in 3 μm dicke Schnitte geschnitten, die in einer Doppelfärbung mit Antikörpern gegen glattmuskuläres α -

Material und Methoden

Aktin (α -smooth muscle actin, α -SMA) und von-Willebrand Faktor (vWF) gefärbt wurden. Die Doppelfärbung wurde nach dem folgenden Protokoll (**Tabelle 6**) angefertigt:

Tabelle 6: Protokoll der Doppelfärbung.

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Reagenz</u>	<u>Anmerkung</u>
1.	Über Nacht	Ofen	Antauen des Paraffins bei 37°C
2.	60 Min.	Ofen	Deparaffinieren bei 58°C
3.	3x10 Min.	Xylol	Ablösen des Paraffins
4.	2x5 Min.	99,6%iger EtOH	Rehydrieren
5.	5 Min.	96%iger EtOH	Rehydrieren
6.	5 Min.	70%iger EtOH	Rehydrieren
7.	15 Min.	Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung	Inaktivierung endogener Peroxidasen
8.	2x5 Min.	dH ₂ O	Waschschritt
9.	2x5 Min.	DPBS	Waschschritt
10.	15 Min.	Trypsin	Freilegen der Protein-Epitopen bei 37°C
11.	3x5 Min.	DPBS	Waschschritt
12.	15 Min.	Streptavidin	Blocken der endogenen Streptavidins
13.	3x5 Min.	DPBS	Waschschritt
14.	15 Min.	Biotin	Blocken des endogenen Biotins
15.	5 Min.	DPBS	Waschschritt
16.	20 Min.	10%ige BSA-Lösung	Waschschritt
17.	60 Min.	<i>mouse IG blocking reagent</i> (1)	M.O.M.-Kit
18.	3x5 Min.	DPBS	Waschschritt
19.	5 Min.	<i>M.O.M. diluent/ protein blocking</i> (2)	M.O.M.-Kit
20.	30 Min.	Primärantikörper (Anti- α -SMA)	1:900 in 10%iger BSA-Lösung
21.	4x5 Min.	DPBS	Waschschritt
22.	30 Min.	R.T.U. <i>horseradish peroxidase streptavidin</i>	
23.	3x5 Min.	DPBS	Waschen

Material und Methoden

24.	3-4x	Vector VIP® Substrat <i>Kit</i>	Violette Färbung der glatten Muskulatur
25.	5 Min.	H ₂ O	Waschschritt
26.	2x5 Min.	DPBS	Waschschritt
27.	20 Min.	10%igen BSA-Lösung	Blockieren der unspezifischen Bindstellen bei Raumtemperatur
28.	3x5 Min.	DPBS	Waschschritt
29.	20 Min.	2,5%iges Pferdeserum	Raumtemperatur
30.	30 Min.	Primärantikörper (Anti-vWF)	1:900 in 10%iger BSA-Lösung bei 37°C
31.	4x5 Min.	DPBS	Waschschritt
32.	30 Min.	sekundärer Antikörper (Anti-rabbit IgG)	Raumtemperatur
33.	4x5 Min.	DPBS	Waschschritt
34.	20-40 Sek.	DAB-Substrat <i>Kit</i>	Braune Färbung des Endothels
35.	5 Min.	H ₂ O	Waschschritt
36.	3 Min.	Methylgrün	Inkubation bei 60°C
37.	1 Min.	H ₂ O	Waschschritt
38.	2x5 Min.	Isopropylalkohol	Dehydrierung
39.	5 Min.	70%iger EtOH	Dehydrierung
40.	5 Min.	96%iger EtOH	Dehydrierung
41.	5 Min.	99,6%iger EtOH	Dehydrierung
42.	Eindecken mit Pertex		

Unter dem Lichtmikroskop Leica DMLA wurden die Schnitte am Computer mit der Software QwinV3 untersucht. Der Grad der Muskularisierung wurde bei kleinen (äußerer Durchmesser 20 bis 70 µm), mittleren (äußerer Durchmesser 70 bis 150 µm) und großen (äußerer Durchmesser <150 µm) Gefäßen bestimmt. Es wurden 30 bis 40 Gefäße pro Maus ausgewertet. Dabei wurden nicht-muskularisierte (<5% Muskularisierung), partiell-muskularisierte (5 bis 70% Muskularisierung) und voll-muskularisierte (<70% Muskularisierung) Gefäße unterschieden. Die Anzahl pro Kategorie wurde mit Hilfe der Gesamtanzahl an Gefäßen bestimmt und in Prozent angegeben.

Die Färbungen wurden mit Unterstützung der technischen Assistentin Lisa Fröhlich durchgeführt.

Material und Methoden

2.5.2 *Laser-Capture* Mikrodissektion

Mit Hilfe der *Laser-Capture* Mikrodissektion wurden unterschiedliche Strukturen (Bronchien, Septen, Gefäße unterschiedlicher Größe) aus Gewebeschnitten ausgeschnitten und auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Hierzu wurden die in *Tissue Tec* eingebetten Lungen am Kryostat in 8 µm dicke Gewebeschnitte geschnitten. Die Schnitte wurden auf 0,2 µm *Membran Slides* übertragen und mit Hemalaun nach Mayer (2E-068 1L) gefärbt. Dann wurden die Gewebeschnitte in Leitungswasser gespült und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 99,6%) dehydriert und luftgetrocknet. Am *Laser-Capture* Mikroskop wurden unterschiedliche Gewebestrukturen der Lunge ausgeschnitten. Es wurden Bronchien, Septen, kleine (20 bis 70 µm), mittlere (70 bis 150 µm) und große (≤ 150 µm), pulmonale Gefäße gesammelt. Nach dem Sammeln wurden die Proben in 350 µL RLT-Puffer bei -80°C zur RNA-Isolation gelagert.

2.5.3 Genexpressionsanalysen

Die RNA wurde aus verschiedenen Proben isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression wurde mit Hilfe einer RTqPCR untersucht.

2.5.3.1 RNA Isolation

Zur Isolierung der mRNA aus homogenisierten Mauslungen, Laser-mikrodissektierten Mauslungengewebe und PASCs wurden unterschiedliche *Kits* verwendet. Die RNA aus homogenisierten Lungen wurde mit Hilfe des *RNeasy[®] Mini Kits* nach Herstellerprotokoll isoliert. Zunächst wurde das gefrorene Lungengewebe mit einem Mörser zerkleinert. 30 bis 40 mg der entstandenen Bruchstücke wurden in vorgekühlte mit Keramikkügelchen und RLT-Puffer gefüllte Mikroschraubröhrchen übertragen. Mit einem Homogenisierer (30 Sekunden, 4°C) wurden die Gewebestücke homogenisiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für zehn Minuten bei 9503 g (10000 rpm) zentrifugiert. Die mRNA wurde nach Herstellerprotokoll unter DNase-Verdau aus dem Permeat isoliert.

Die mRNA aus mikrodissezierten Gewebe wurde nach den Vorgaben des Herstellers mit Hilfe des *RNeasy[®] Micro Kits* isoliert. Die mRNA wurde mit Hilfe einer „Carrier RNA“-Inkubation (4 ng/µL, 30 Sekunden) und eines DNase-Verdaus isoliert.

Die mRNA aus den PASCs wurde mit Hilfe des *RNeasy[®] Mini Kits* oder des *peqGOLD total RNA Kits* nach Herstellerangaben isoliert. Proben aus mPASCs der Passage 0 wurden vor der

Material und Methoden

RNA-Isolation auf DNA-bindende Membranensäulen übertragen. Die mRNA aus passagierten PASM-C wurde ohne Verwendung von DNA-bindender Membransäulen gewonnen. Ein Dnase-Verdau wurde nicht durchgeführt.

Die mRNA-Proben wurden am Ende der Aufreinigung mit RNase freiem Wasser eluiert und die mRNA-Konzentration spektralphotometrisch bei 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) am NanoDrop gemessen. Der Quotient aus beiden Wellenlängen erlaubte Rückschlüsse auf die Reinheit der mRNA-Probe. Die mRNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.5.3.2 Reverse Transkriptions-PCR

Nach der Quantifizierung der mRNA-Proben wurde diese in cDNA (*complimentary DNA*) mit Hilfe von reverser Transkriptase (Raumtemperatur, *iScriptTM cDNA Synthesis Kit*) nach dem Herstellerprotokoll umgeschrieben. Es wurden 100 ng bis 1 μg RNA pro Probe umgeschrieben. Pro Ansatz wurde 1 μL *iScript RT* und 4 μL *iScript Reaction Mix* auf ein Endvolumen von 20 μL eingesetzt. Folgendes Reaktionsprotokoll wurde durchgeführt (**Tabelle 7**) und die cDNA bei -20°C oder -80°C gelagert.

Tabelle 7: Reaktionsprotokoll der Reverse Transkriptions-PCR.

<u>Zyklus</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
1	25°C	5 Min.
2	42°C	30 Min.
3	85°C	5 Min.
4	4°C	∞

2.5.4 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (RTqPCR)

Die mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR analysiert. Pro Ansatz wurde 100 bis 400 ng cDNA eingesetzt. Für die Amplifikation wurde die cDNA mit 10 μL *SyBr Green*, 7 μL DNase freiem Wasser, 0,5 μL *forward* und 0,5 μL *reverse* Primer vermischt und auf eine 96-Well PCR-Platte aufgetragen. Die RTqPCR wurde am Gerät Mx3000^RQPCR System, später am *CFX connectTM real-time system* durchgeführt.

Material und Methoden

Tabelle 8: Reaktionsprotokoll der RTqPCR.

<u>Schritt</u>	<u>Zyklusphase</u>	<u>Zyklen</u>	<u>Prozess</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>
1.	Initiale Denaturierung/ Enzymaktivierung	1	Denaturierung	600 Sek.	95°C
2.	Amplifikation	40	Denaturierung	10 Sek.	95°C
			Hybridisierung	20 Sek.	59°C
			Polymerisation	10 Sek.	72°C
3.	Schmelzkurve	1	Denaturierung	60 Sek.	95°C
			Hybridisierung	30 Sek.	55°C

Da *SyBR Green* die cDNA unspezifisch bindet, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der amplifizierten Fragmente zu bestimmen. Die Schmelztemperatur hängt von der Fragmentlängen ab, sodass die Schmelzkurve Auskunft über die amplifizierten Fragmentgrößen gibt. Die gemessenen Ct-Werte der zu untersuchenden Zielgene wurden gegen die entsprechenden Ct-Werte der Referenzgene (ΔCt) normalisiert (**Formel 4**). Als Referenzgene wurden β_2 Mikroglobulin (B2M) oder β -Aktin genutzt.

Formel 4: Formel zur Berechnung der Ct-Werte.

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

2.5.5 cDNA-Microarray-Analyse

Um die Rolle von TRPC1 in chronischer Hypoxie zu untersuchen und mögliche Signalwege zu identifizieren, wurde eine cDNA-Microarray-Analyse von WT und TRPC1^{-/-} mPASCs durchgeführt. Hierbei wurden 5×10^4 mPASCs in Passage 1 auf 35-Kulturschalen ausgesät und für 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen in SMC-Medium I kultiviert. Am Folgetag wurden die Kulturschalen für 72 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Die mPASCs wurden nach Versuchsende in RLT-Puffer lysiert und die mRNA isoliert. Proben mit einem Quotienten zwischen OD₂₆₀ und OD₂₈₀ von ca. 2,0 wurden für die cDNA-Microarray-Analyse verwendet. Die anschließende Hybridisierung der Proben und biostatistische Analyse wurde von Dr. Jochen Wilhelm durchgeführt. Dabei wurde die isolierte mRNA amplifiziert und nach *dual-color LIRAK Kit* Protokoll Cy3 und Cy5 markiert. Pro Reaktion wurde 1 µg RNA mit Cy3 oder Cy5 markiert, damit eine *dye-swap design* Balance erzielt werden konnte. Cy3 und Cy5 markierte amplifizierte mRNA (*amplified RNA*) wurde

Material und Methoden

über Nacht auf 4x44K 60mer *oligonucleotide spotted microarray slides* (*Mouse Whole Genome* 4x44K) laut Agilent Hybridisierungsprotokoll hybridisiert, gewaschen und getrocknet. Die getrockneten Slides wurden mit einem GenePix 4100A Scanner gescannt. Die entstandenen Bilder wurden anschließend mit der Software GenePix Pro 5.1. untersucht. Die dabei ermittelten Werte der Spots wurden als *GenePix result file* gespeichert. Mit Hilfe der Software R und *limma package*³⁸⁷ von BioConductor³⁸⁸ wurde der cDNA-Microarray ausgewertet. Doppelt- und Mehrfachansätze wurden zunächst gemittelt. Die M/A Werte wurden aus Messspots mit einer Intensität von größer 50 kalkuliert. Diese wurden nach LOESS normalisiert³⁸⁹ bevor Mittelwerte aus den unterschiedlichen cDNA-Microarrays gebildet werden konnten. Die einzelnen Gene wurden in ihrer Expression durch Verwendung eines moderater t-Tests miteinander verglichen und bewertet³⁹⁰. Die *Fals-discovery rate* (FDR) wurde auf 10% gesetzt und die so normierten Gene, welche möglicherweise reguliert waren, laut dieser Bewertung gelistet. Gene, die mindestens eine 2-fach regulierte Expression zeigten, wurden für weitere Bewertungen gelistet. Die Signalweganalyse wurde durch “Set”-Tests anhand der Bewertung der Regulation (t-Werte) durchgeführt³⁸⁷.

2.5.6 Proteinextraktion

Western Blots wurden mit Proteinen aus murinen homogenisierten Lungen sowie aus mPASMCM durchgeführt.

Zur Extraktion von Proteinen aus Mauslungen wurden 30 bis 40 mg Gewebe in gekühlte, Keramik-Kugeln gefüllten Schraubröhrchen in Radioimmunoprecipitations-Puffer (RIPA) (zwei mal 30 Sekunden, 30 Sekunden Pause) homogenisiert. Die Proben wurden für 15 Minuten gekühlt, bei 21910 g (14000 rpm) für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 mL Gefäß überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt und die Proteine bei -20°C gelagert.

Zur Proteinextraktion aus mPASMCM wurden die adhärennten Zellen in DPBS gewaschen und in 50 bis 150 µL 1-fach Zelllyse-Puffer lysiert. In Abhängigkeit vom Versuch wurden alternativ mPASMCM von der Zellkulturplatte gelöst (Trypsinierung), die Zellsuspension für fünf Minuten bei 338 g (1200 rpm) zentrifugiert, in DPBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 10 bis 50 µL 1-fach Zelllyse-Puffer gelöst. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des DC Protein Assays quantifiziert. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe verwendet. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm am *Microplate Reader* mit der Software *i-Control* gemessen. Anhand des Standards wurde die Proteinkonzentration der Proben

Material und Methoden

bestimmt. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte die Lagerung der Proteine bei -20°C.

2.5.7 Western Blot

Es wurden 2 bis 20 µg der Proteinproben bei 4°C mit 4-fach *NuPage Sample Buffer* versetzt, für zehn Minuten bei 99°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und kurz erneut zentrifugiert. Die Proteinproben sowie 5 µL Marker (*Precision Plus Protein Standards*) wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Es wurden unterschiedliche Trenngele (8% und 12%) und 5%ige Sammelgele verwendet. Nach Beladen der Gele wurde die Gelelektrophorese in 1-fach Laufpuffer (120 V, 400 mA, 150 W, 90 Minuten) gestartet. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine durch die *Semidry*-Technik mit Transferpuffer auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen (100 V, 115 mA, 150 W, 75 Minuten). Nach dem Proteintransfer wurden unspezifische Bindestellen auf der PVDF-Membran durch *Blocking*-Lösung bei Raumtemperatur für eine Stunde geblockt. Die Membran wurde dann mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert und am Folgetag mit 1-fach TBST-Puffer drei bis vier Mal für jeweils zehn Minuten gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem Rezeptorenzym (*Horseradish Peroxidase*, HRP) gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und in 1-fach TBST-Puffer fünf Mal für zehn Minuten gewaschen. Die Detektion erfolgte durch eine auf Luminol-basierenden Chemilumineszenzreaktion mit dem *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* nach Herstellerprotokoll. Nach zwei minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran auf einem Röntgenfilm in einer Filmkassette exponiert und entwickelt. Im späteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde auf die Exposition von Röntgenfilmen verzichtet und das Lumineszenzsignal im *Molecular Imager® ChemiDox™ XRS* direkt am Computer visualisiert.

Um die Membran mit einem weiteren Antikörper hybridisieren zu können, wurden diese zunächst in Stripping-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 1-fach TBST-Puffer zwei Mal für fünf Minuten gewaschen. Die PVDF-Membran wurde dann erneut in *Blocking*-Lösung geblockt und mit einem weiteren Antikörper hybridisiert. Zum Auswerten wurden die Röntgenbilder am *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS* eingescannt und mit der Software *Image Lab™* ausgewertet. PVDF-Membranen, die nicht mit einem Röntgenfilm entwickelt wurden, wurden am *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS* visualisiert und ebenfalls mit der Software *Image Lab™* ausgewertet.

Material und Methoden

2.5.8 ELISA

Die endogene Produktion von TNF α und TGF- β 1 wurde in Proteinextrakten aus homogenisierten Mäuslungen und in mPASMC nach Hypoxie-Exposition untersucht. Als Kontrolle wurden Lipopolisaccharid (LPS)-stimulierte M θ und hypoxische mPAEC verwendet. Um die Produktion von TNF α und TGF- β 1 in isolierten mPASMC zu untersuchen, wurden die Zellen in Passage 0 für 24 Stunden auf 6-Well Platten in SMC-Medium III (0,1mL/cm²) kultiviert und anschließend für 120 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie exponiert. Das Medium wurde nach Versuchsende abgenommen und untersucht. Die M θ und mPAEC dienten als Kontrolle. Die M θ wurden wie beschrieben isoliert. Nach Erreichen der Adhärenz wurden die Zellen mit LPS (5 μ g/mL) behandelt (mündliche Übermittlung der Konzentration von Anna Fiedler, PEI, Langen). Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und die TNF α Produktion untersucht. Die isolierten mPAEC wurden in Passage 0 für 120 Stunden in EC-Medium III Normoxie oder Hypoxie exponiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die TGF- β 1 Produktion untersucht.

Die endogene Produktion von TNF α wurde mit Hilfe des *Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kits* und von TGF- β 1 mit Hilfe des *Mouse TGF- β 1 Quantikine ELISA Kits* nach Herstellerprotokoll untersucht. Als Positivkontrolle wurde eine mitgelieferte *mouse* TNF α Kontrolle oder TGF- β 1 Kontrolle (in *E. coli* exprimiertes, rekombinantes *mouse* TNF α oder *mouse* TGF- β 1) verwendet. Die Proben und der Standard wurden auf eine ELISA-Platte aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurde die Platte mehrfach gewaschen und mit *mouse* TNF α oder *mouse* TGF- β 1 Konjugaten zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Substratgabe wurde die Reaktion nach 30 Minuten mit STOP-Lösung gestoppt und am *Microplate Reader* innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 540 nm) gemessen. Die TNF α und TGF- β 1 Produktion wurde anhand einer Standard-Kurve bestimmt.

2.5.9 Plasmidamplifikation und -isolation

In dieser Arbeit wurden Plasmide mit Hilfe von Hitzeschocktransformation in *E. coli* transformiert und amplifiziert. Zunächst wurden 50 μ L der Zellen für zehn Minuten mit 1 μ L des Plasmides auf Eis inkubiert, für 45 Sekunden auf 42°C erhitzt und wieder auf Eis zwei Minuten abgekühlt. Anschließend wurden die Plasmid-tragenden *E. coli* in 900 μ L Antibiotika-freiem S.O.C. Medium bei 37°C für eine Stunde und 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die *E. coli* für eine Minute bei 9503g (10000 rpm) zentrifugiert, sowohl das Pellet als

Material und Methoden

auch der Überstand auf Ampicilin-haltigen Agaplaten (5 mg/100 mL Ampicilin, LB Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach 24 Stunden wurde eine Kolonie in Antibiotika-haltiges Medium (LB Broth Base) überimpft und in einem Wärmeschrank mit Schüttler über Nacht kultiviert.

Am Tag darauf wurden 0,5 mL Zellsuspension (1:1, 50% Glycerol) bei -80°C eingefroren. Die Plasmide wurden aus den restlichen transformierten *E. coli* mit dem *EndoFree Plasmid Purification Kit* laut Herstellerprotokoll isoliert. Die isolierten Plasmide wurden in TE-Puffer gelöst und die Plasmid-Konzentration am NanoDrop gemessen.

2.5.10 Promoteranalyse

Für die Promoteranalyse wurde die Promotersequenz 5000 Basenpaare *upstream* des Transkriptionsstartpunktes (ATG) nach Bindestellen für HIF-1 α , den *hypoxia responsive elements* (HRE), untersucht. Dabei wurden die Bindesequenzen mit Hilfe von Pubmed.com in der Promotersequenz gesucht. Es wurde sowohl der kodierende als auch der komplementäre DNA-Strang des TRPC1-Gens der Maus untersucht.

2.6 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte (MW) mit Standardfehlern (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 6 durchgeführt. Es wurden unterschiedliche statistische Methoden zur Untersuchung der Ergebnisse durchgeführt. Bei Vergleichen von zwei Stichproben wurde der t-Test nach Student verwendet. Bei voneinander abhängigen Proben wurde im Gegensatz zu unabhängigen Proben ein gepaarter Student t-Test durchgeführt. Beim Vergleich mehrerer Stichproben einer Gruppe wurde eine *one-way* Anova durchgeführt. Wurden alle Stichproben miteinander verglichen, so wurde der Post-hoc-Test Tukey verwendet. Wurden alle Stichproben mit einer Referenz verglichen, so wurde der Post-hoc-Test Dunnett's verwendet. Bei Analysen zweier Stichproben innerhalb mehrerer Gruppen wurden eine *two-way* Anova durchgeführt. Die Stichproben wurden mit Hilfe der Bonferroni-Methode untersucht. Es wurde zwischen gepaarten und ungepaarten Stichproben unterschieden. Als signifikant wurden Ergebnisse festgelegt, die einen p-Wert von $\leq 0,05$ aufwiesen. Signifikante Unterschiede mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ wurden mit einem * gekennzeichnet. Bei einem p-Wert von $\leq 0,01$ wurden signifikante Unterschiede mit ** gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede mit einem p-Werte von $\leq 0,001$ wurden mit *** und signifikante Unterschiede mit einem p-Wert von $\leq 0,0001$ wurden mit ****

Material und Methoden

gekennzeichnet. Als nicht signifikant wurden Ergebnisse festgelegt, die einen p-Wert von $>0,05$ aufwiesen und mit „ns“ (nicht signifikant) gekennzeichnet. Bei nicht detektierbaren Messwerten wurde die Abkürzung „nd“ (nicht detektierbar) verwendet. Die Anzahl der Tiere und der einzelnen Messungen wurde mit „n“ gekennzeichnet. Die graphischen Darstellungen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 6 erstellt.

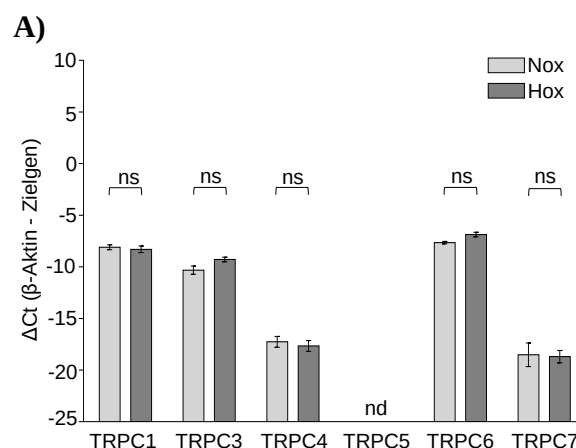
3 Ergebnisse

Weißmann *et al.*¹² konnte zeigen, dass TRPC6 eine Rolle in der Reaktion der Lunge auf akute Hypoxie spielt. In *in vivo* Experimenten hatte das Fehlen dieses Ionenkanals jedoch keinen Einfluss auf die Manifestation der PH im Mausmodell. Mäuse, die 21 Tage Hypoxie (10% O₂) exponiert waren, entwickelten trotz fehlendem TRPC6-Gens charakteristische Veränderungen der PH, die sich in einem erhöhten RVSP, der Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie und unverändert gesteigerter Muskularisierung von pulmonalen Gefäßen zeigte^{12; 385}. Ziel der vorliegenden Arbeit war es andere TRPC-Schlüsselgene in der CHPH zu identifizieren und deren Funktion sowie die zugrundeliegenden Signalwege zu charakterisieren.

3.1 Einfluss von chronischer Hypoxie auf die TRPC-Expression

3.1.1 Regulation in homogenisierten Mäuslungen

Um Gene der TRPC-Subfamilie zu identifizieren, die eine Rolle in der CHPH spielen könnten, wurde die Expression verschiedener TRPC-Gene in homogenisierten WT Mäuslungen nach 21-tägiger Normoxie- oder Hypoxie-Exposition auf mRNA-Ebene untersucht (**Abbildung 25A**). TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6 und TRPC7 waren in der Mäuslung exprimiert (**Abbildung 25A**). TRPC2 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da es im Menschen nur als Pseudogen vorkommt³³⁹. Unter Normoxie waren TRPC1, TRPC3 und TRPC6, verglichen mit der Expression von TRPC4 und TRPC7, signifikant stärker exprimiert, während TRPC5 in Mäuslungen nicht nachgewiesen werden konnte. TRPC3 war außerdem signifikant schwächer exprimiert als TRPC1 und TRPC6. Eine Hypoxie-abhängige Regulation der untersuchten Gene konnte in homogenisierten Mäuslungen nicht festgestellt werden.



Ergebnisse

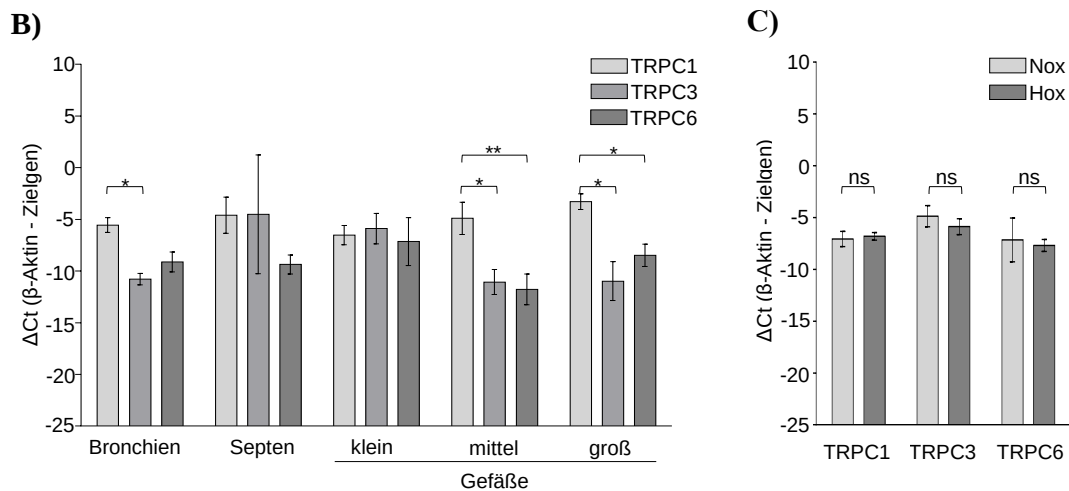


Abbildung 25: TRPC mRNA-Expression in Mauslungen und kleinen Lungengefäßen in chronischer Hypoxie.

Relative TRPC mRNA-Expression in WT Mauslungen nach 21 Tagen Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 21% O₂) quantifiziert mittels RTqPCR. **A)** TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 mRNA-Expression in homogenisierten Mauslungen nach Nox oder Hox (n=4-5). TRPC1, TRPC3 und TRPC6 mRNA-Expression in Laser-mikrodissezierten **B)** Bronchien, Septen, kleinen (externer Durchmesser von >70 μm), mittleren (externer Durchmesser von 70 bis 150 μm) und großen (externer Durchmesser von <150 μm) Gefäßen nach Nox (n=3-5) und **C)** in kleinen Gefäßen nach Nox oder Hox (n=3-5). Signifikanter Unterschied, wenn * (p≤0,05) und ** (p≤0,01); ns: nicht signifikant; nd: nicht detektierbar.

3.1.2 Regulation in mikrodissezierten murinen Gefäßen

Die Lunge besteht aus verschiedenen Zelltypen und Lungenstrukturen, die auf Hypoxie-Exposition mit veränderter Genexpression reagieren können. Weil die Expression einzelner Gene in verschiedenen Zelltypen auch unterschiedlich reguliert sein können, kann es zu falsch negativen Resultaten in Genexpressionsanalysen kommen, weshalb die Expression von einzelnen Genen in einzelnen Lungenstrukturen und Zelltypen untersucht wurde. Um beurteilen zu können, wie die in der Lunge prominent exprimierten Proteine der TRPC-Subfamilie (**Abbildung 25A**) in einzelnen Lungenstrukturen exprimiert werden, wurde eine Kompartiment-spezifische Expressionsanalyse in Bronchien, alveolären Septen, kleinen, mittleren und großen pulmonalen Gefäßen nach Mikropräparation von normoxischen Mauslungen durchgeführt (**Abbildung 25B**). Der Expressionsvergleich zwischen TRPC1, TRPC3 und TRPC6 zeigte, dass TRPC1 in den meisten Lungenstrukturen am stärksten exprimiert war. Lediglich in kleinen pulmonalen Gefäßen war die Expression aller untersuchten TRPC-Proteine vergleichbar. Wie bereits in homogenisierten WT Mauslungen beobachtet wurde, konnten auch in mikropräparierten kleinen pulmonalen Gefäßen keine Hypoxie-abhängigen Regulationen der TRPC-Proteine auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (**Abbildung 25C**).

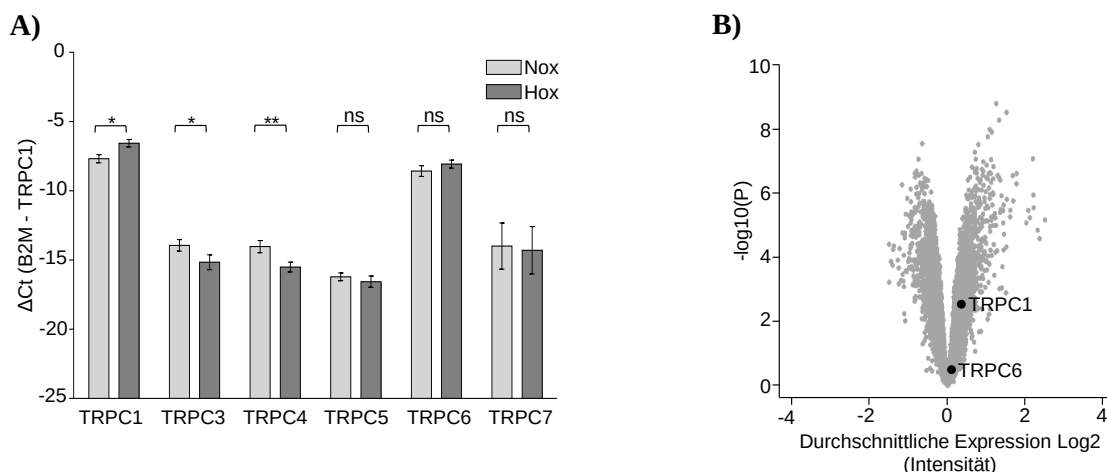
Ergebnisse

3.1.3 Regulation in isolierten murinen PASMCM

Da Hypoxie das Verhalten von PASMCM beeinflusst^{391; 392}, wurde die Genexpression in PASMCM aus WT Mäusen in Passage 2 nach 72 Stunden Normoxie oder Hypoxie auf mRNA-Ebene untersucht.

In **Abbildung 26A** ist zu erkennen, dass alle in der Maus exprimierte TRP-Genen der TRPC-Subfamilie, mit Ausnahme von TRPC2, detektiert wurden. TRPC1 und TRPC6 waren die am stärksten exprimierte TRPC-Proteine in mPASMCM. Die mRNA-Expressionen von TRPC3, TRPC4, TRPC5 und TRPC7 unterschieden sich nicht voneinander. TRPC1 war in Abhängigkeit von Hypoxie signifikant hochreguliert, während TRPC3 und TRPC4 vermindert exprimiert waren.

Die beobachtete Hochregulation von TRPC1 unter chronischer Hypoxie konnte in einer genomweiten cDNA-Microarray-Analyse bestätigt werden (**Abbildung 26B**). Im Gegensatz zur RTqPCR-Analyse wurden in der cDNA-Microarray-Analyse allerdings nur TRPC1 und TRPC6 detektiert. Signale anderer TRPC-Genen lagen unterhalb des Detektionslimits und ließen auf eine, verglichen mit TRPC1 und TRPC6, niedrigere mRNA-Expression schließen. Eine Hypoxie-abhängige Erhöhung der TRPC1-Expression konnte auch in anderen Passagen und unter zwei Zeitpunkten bestätigt werden. Die TRPC1-Expression wurde in Passage 0 nach 120 Stunden Hypoxie-Exposition induziert (**Abbildung 26C**). In Passage 1 wurde eine Hochregulation nach 72 Stunden sowie 120 Stunden beobachtet (**Abbildung 26D**). Mit zunehmender Passagierung trat eine generelle Abnahme der TRPC1-Expression auf (**Abbildung 26E**).



Ergebnisse

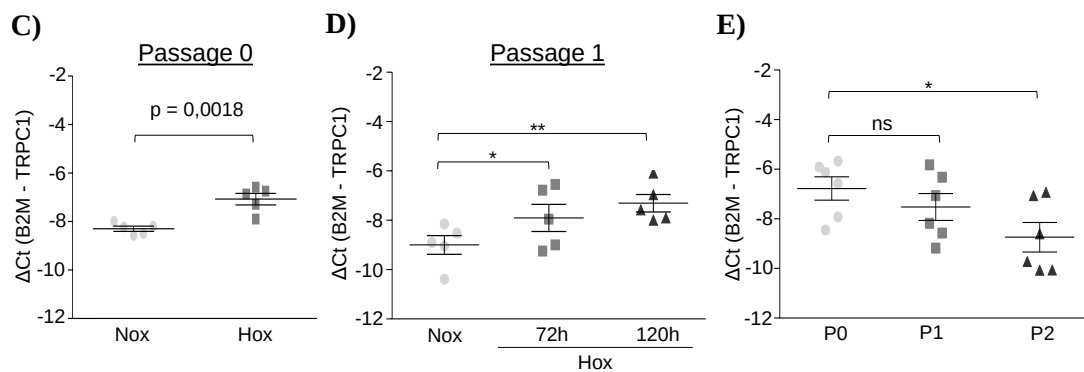


Abbildung 26: TRPC mRNA-Expression in mPASC in chronische Hypoxie.

TRPC mRNA-Expression in WT mPASC nach Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 1% O₂). **A)** Relative mRNA-Expression von TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 nach 72 Stunden Nox oder Hox in Passage 2 (n=13) untersucht mittels RTqPCR. **B)** TRPC1- und TRPC6-Expression nach 72 Stunden Nox oder Hox in Passage 2 (n=4) quantifiziert mittels cDNA-Microarray-Analyse. **C-E)** Relative TRPC1-Expression nach **C)** 120 Stunden Nox oder Hox in Passage 0 (n=5), **D)** nach 120 Stunden Nox oder 72 bzw. 120 Stunden Hox in Passage 1 (n=5) und **E)** unter Nox in Passage 0, 1 und 2 (n=5-6) quantifiziert mittels RTqPCR. Signifikanter Unterschied, wenn * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) oder $p \leq 0,05$; ns: nicht signifikant; h: hours (Stunden).

3.1.4 Regulation von TRPC1 auf Protein-Ebene

Um zu bestätigen, dass TRPC1 eine funktionelle Rolle unter chronischer Hypoxie spielt, wurde im nächsten Schritt die Regulation auf Protein-Ebene untersucht. Bei der Analyse von homogenisierten WT Mäuslungen (**Abbildung 27A**) sowie isolierten WT mPASC (**Abbildung 27B**) konnte, unter Verwendung der in der Literatur am häufigsten benutzten TRPC1-Antikörpern (z. B. Alomone ACC-010³⁹³⁻³⁹⁵), keine spezifische TRPC1-Bande bei ca. 90 kDa, der beschriebenen TRPC1-Größe³⁹⁶⁻³⁹⁸, detektiert werden. Durch die Überexpression eines durch Hämagglutinin (HA)-markierten TRPC1-Plasmids sowie die Kombination des Plasmids mit spezifischer siRNA gegen TRPC1, wurden die genutzten TRPC1-Antikörper auf ihre Spezifität und Eignung zum Nachweisen von TRPC1 untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten TRPC1-Antikörper konnten das überexprimierte HA-markierte TRPC1-Protein nicht detektieren (**Abbildung 27C**). Dieses gelang jedoch mit Hilfe eines HA-Antikörpers. Eine Bande wurde bei ca. 90 kDa detektiert. Mit Hilfe des überexprimierten HA-markierten TRPC1-Proteins konnte die Spezifität der im weiteren Verlauf verwendeten siRNA gegen TRPC1 auf Protein-Ebene bestätigt werden. So zeigten die gleichzeitig mit siRNA und HA-TRPC1 Plasmid transferierten mPASC eine verminderte TRPC1-Expression (**Abbildung 27C**). Aufgrund fehlender spezifischer Antikörper konnte die Regulation von TRPC1 auf Protein-Ebene daher in den folgenden Experimenten nicht bestätigt werden.

Ergebnisse

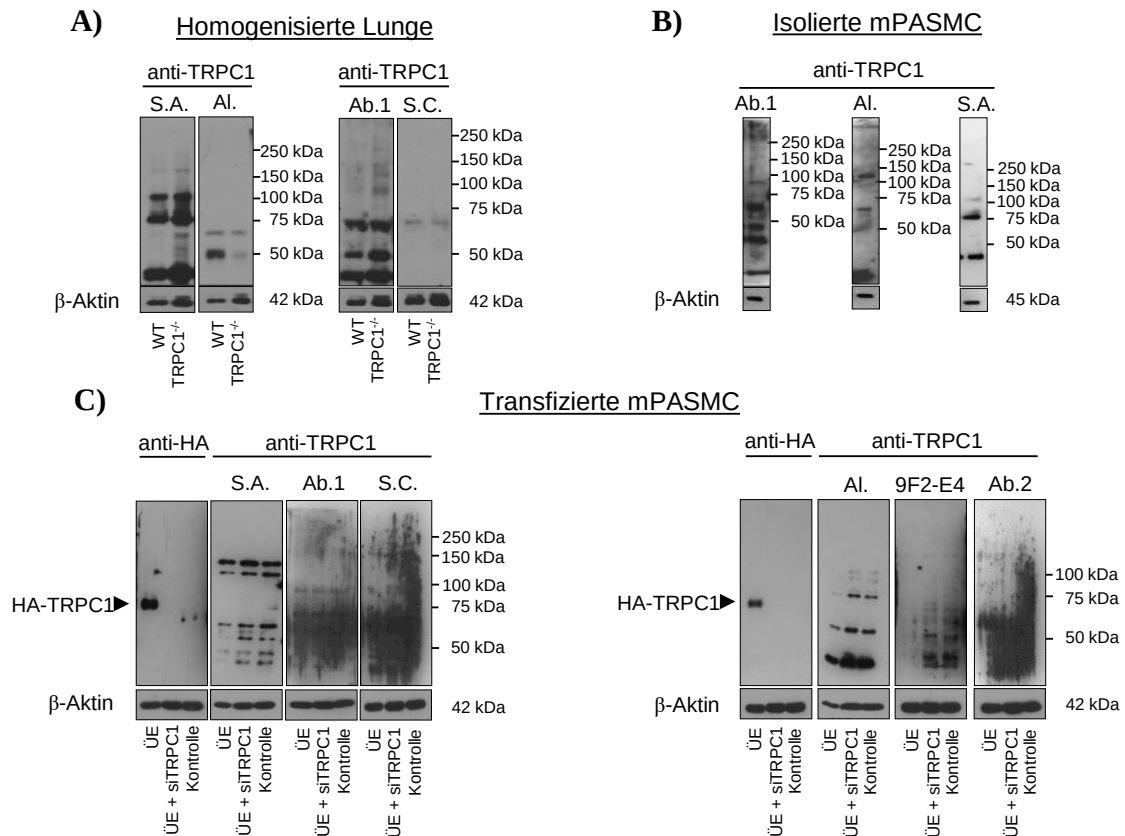


Abbildung 27: TRPC1-Antikörper Tests in murinen homogenisierten Lungen und isolierten mPASC.

TRPC1 Protein-Expression unter Normoxie (21% O₂) quantifiziert mittels Western Blot Analyse. **A)** Detektion von TRPC1 in homogenisierten WT und TRPC1^{-/-} Mauslungen (n=2) mit Hilfe der TRPC1-Antikörper (anti-TRPC1) T8276 von Sigma-Aldrich (S.A.), ACC-010 von Alomone (Al), ab74189 von Abcam (Ab. 1) und sc20110 von Santa Cruz (S.C.). **B)** Detektion von TRPC1 in WT mPASC (Passage 2; n=1.) mit Hilfe der TRPC1-Antikörper Ab. 1, Al und S.A.. **C)** Detektion von TRPC1 in WT mPASC nach Überexpression (ÜE) des Hämagglutinin (HA)-markierten TRPC1-Proteins (HA-TRPC1) mit Hilfe der Antikörper S.A., Ab 1, S.C., Al., 9F2-E4 und ab25322 von Abcam (Ab. 2) sowie des HA-Antikörpers (anti-HA). Überexpression von HA-TRPC1 und gleichzeitigen *knockdown* von TRPC1 mit einer siRNA (siTRPC1) und Überexpression eines leeren Kontrollplasmids (Kontrolle). Repräsentative Western Blots sind dargestellt. kDa: Kilodalton.

3.1.5 Regulation in Ratten und humanen PASC

Um zu überprüfen, ob die Hypoxie-abhängige TRPC1-Expression im Mausmodell auch in anderen Organismen vorliegt, wurde der Effekt von chronischer Hypoxie auf die Expression von TRPC1 in isolierten rPASC und hPASC untersucht.

Sowohl in rPASC als auch in hPASC konnte nach der Hypoxie-Exposition von 72 und 120 Stunden ein signifikanter Anstieg in der Expression von TRPC1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (**Abbildung 28**). Da im Menschen zwei TRPC1-Isoformen bekannt sind, wurden in hPASC beide TRPC1-Isoformen, TRPC1.1 und TRPC1.2, untersucht. Beide Isoformen waren Hypoxie-abhängig hochreguliert (**Abbildung 28C, D**).

Ergebnisse

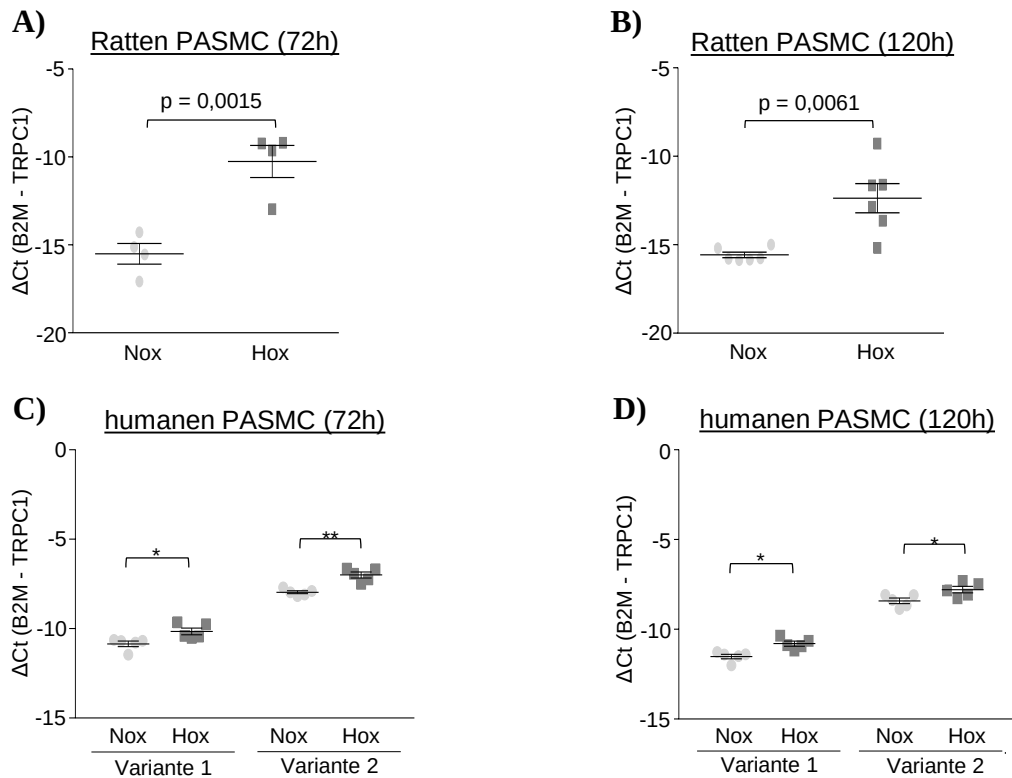


Abbildung 28: Einfluss von chronischer Hypoxie auf die TRPC1 mRNA-Expression in Ratten und in humanen PASMC.

Relative TRPC1 mRNA-Expression unter Normoxie (Nox; 21% O₂) oder Hypoxie (Hox; 1% O₂) quantifiziert mittels RTqPCR. **A)** TRPC1-Expression nach 72 (n=4) und **B)** 120 Stunden (n=6) Nox oder Hox in Ratten PASMC. **C, D)** Expression von TRPC1 der Variante 1 und Variante 2 in humanen PASMC nach **C)** 72 und **D)** 120 Stunden Nox oder Hox (n=5). Signifikanter Unterschied, wenn * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) oder $p \leq 0,05$; h: hours (Stunden).

3.2 Charakterisierung von WT und TRPC1^{-/-} Mäusen

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass chronische Hypoxie zu einer Erhöhung der TRPC1-Expression in isolierten mPASMC führt. Um die physiologische Relevanz von TRPC1 in akuter, anhaltender und chronischer Hypoxie im Mausmodell zu charakterisieren, wurden die vaskuläre Reaktion auf akute und anhaltende Hypoxie in der ILU sowie die Entwicklung von chronischer Hypoxie-induzierter PH in WT und TRPC1^{-/-} Mäusen untersucht. Hierfür wurden die Genotypen der Versuchstiere mittels PCR bestimmt (**Abbildung 29**).

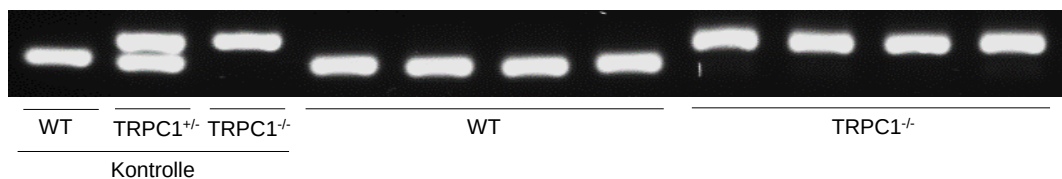


Abbildung 29: PCR Analyse der verwendeten transgenen TRPC1 Mäuse.

Ein repräsentatives PCR-Bild der Genotypisierung von WT und TRPC1^{-/-} Mausschwanz-Biopsien. Als Kontrolle wurden Proben von transgenen Mäusen mit den bekannten Genotypen WT, heterozygot (TRPC1^{+/-}) und homozygot (TRPC1^{-/-}) eingesetzt.

Ergebnisse

3.2.1 Einfluss von TRPC1 in akuter und anhaltender Hypoxie

Um die physiologische Rolle von TRPC1 in akuter und anhaltender Hypoxie zu untersuchen, wurde die HPV in isolierten, ventilierten und blutfrei-perfundierten WT und TRPC1^{-/-} Mäusen miteinander verglichen (**Abbildung 30**). Die Lungen von WT Mäusen reagierten mit einer Vasokonstriktion der Gefäße auf hypoxische Ventilation, wodurch ein Druckanstieg gemessen werden konnte (Normoxie: $0,0125 \pm 0,02266$ mmHg; akute Hypoxie: $1,24 \pm 0,075$ mmHg), welcher nach Erreichen eines Maximums wieder sank. Anschließend stieg der Druck wieder kontinuierlich an (180 Minuten Normoxie: $0,075 \pm 0,04532$ mmHg; 180 Minuten Hypoxie: $1,9 \pm 0,04208$ mmHg). Beide Phasen, akut und anhaltend, unterschieden sich zwischen WT und TRPC1^{-/-} Mäusen nicht (TRPC1^{-/-} akute Hypoxie: $1,111 \pm 0,1195$ mmHg; TRPC1^{-/-} 180 Minuten Hypoxie: $1,578 \pm 0,1762$ mmHg).

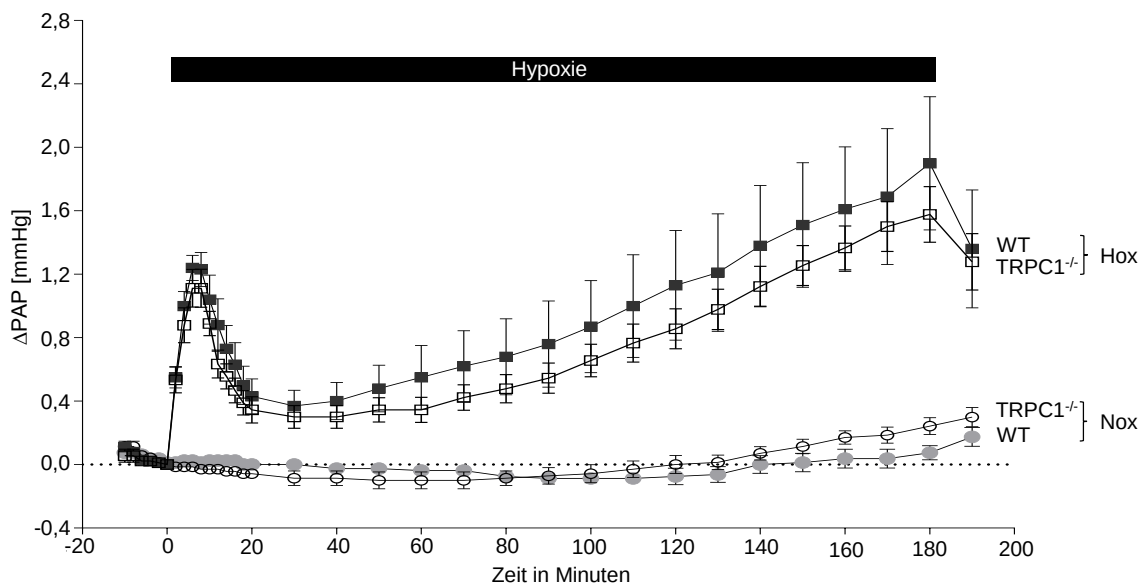


Abbildung 30: Akute und anhaltende Phase der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion in isolierten, ventilierten und blutfrei-perfundierten Mäusen.

Zeitverlauf der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion in isolierten Lungen aus WT und TRPC1^{-/-} Mäusen. Die isolierten Lungen wurden mit normoxischem (Nox, 21% O₂) oder hypoxischem (Hox, 1% O₂) Gas für 180 Minuten ventiliert (n=7-10). Relative Veränderungen im pulmonalarteriellen Druck (*delta pulmonary arterial pressure*; ΔPAP) wurden aufgezeichnet. WT Nox: graue Kreise (n=7); WT Hox: schwarze Quadrate (n=10); TRPC1^{-/-} Nox: weiße Kreise (n=8); TRPC1^{-/-} Hox: weiße Quadrate (n=9).

3.2.2 Einfluss von TRPC1 auf die CHPH

Um eine Auswirkung von TRPC1 auf die CHPH zu untersuchen, wurden WT und TRPC1^{-/-} Mäuse nach chronischer Hypoxie-Exposition auf pathophysiologische Veränderungen untersucht. Hierzu wurden hämodynamische Untersuchungen mit Messung des RVSP durchgeführt sowie Veränderungen am Herzen mit Hilfe des Fulton-Index bestimmt und der Muskularisierungsgrad der pulmonalen Gefäße analysiert.

Ergebnisse

Die WT Mäuse zeigten nach chronischer Hypoxie einen deutlichen Anstieg im RVSP (Normoxie: $25,98 \pm 0,51$ mmHg; chronische Hypoxie: $37,34 \pm 1,547$ mmHg) im Vergleich zu normoxischen Kontroll-Mäusen (**Abbildung 31A**). Bei TRPC1^{-/-} Mäusen wurde ein geringerer Anstieg im RVSP nach chronischer Hypoxie-Exposition (chronische Hypoxie: $30,9 \pm 2,81$ mmHg) verglichen mit WT Mäusen beobachtet (**Abbildung 31A**). Der Vergleich zwischen dem nach Hypoxie erreichten RVSP in WT und TRPC1^{-/-} Mäusen zeigte, dass das Fehlen von TRPC1 ein signifikant niedrigeres Druck-Niveau zur Folge hat.

Zusätzlich wurde die Rechtsherzhypertrophie untersucht. Chronische Hypoxie führte in WT Mäusen zu einer signifikanten Vergrößerung ($0,386 \pm 0,01$) des rechten Herzens im Vergleich zu normoxischen Kontroll-Mäusen ($0,294 \pm 0,009$) (**Abbildung 31**). Sowohl in WT als auch TRPC1^{-/-} Mäusen war eine signifikante Größenzunahme des rechten Herzens nach chronischer Hypoxie zu beobachten, die sich zwischen den beiden Genotypen jedoch nicht unterschied (TRPC1^{-/-} chronische Hypoxie: $0,392 \pm 0,023$).

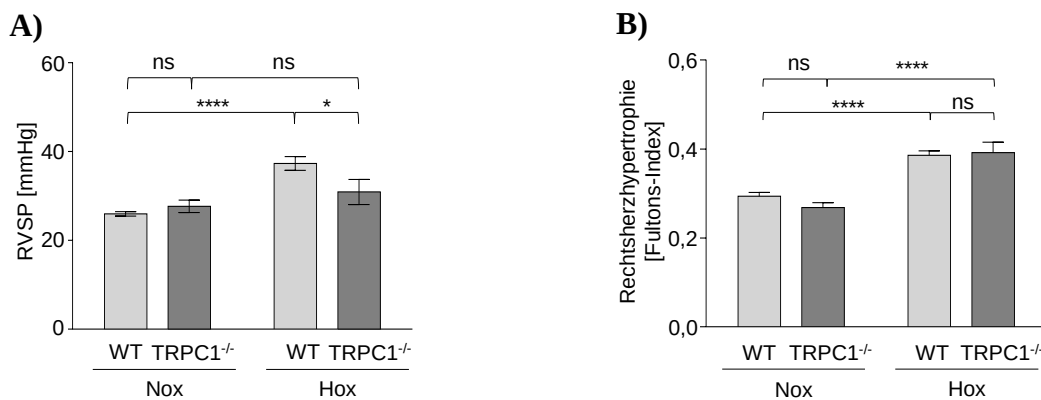


Abbildung 31: Auswirkung von chronischer Hypoxie auf den RVSP und Rechtsherzhypertrophie.

A) Rechtsventrikulärer systolischer Druck (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) (n=6-7) und **B)** Fulton-Index als Maß für Rechtsherzhypertrophie in WT und TRPC1^{-/-} Mäusen (n=7) nach 21 Tagen Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 21 Tage, 21%O₂). Signifikanter Unterschied, wenn * (p ≤ 0,05) und **** (p ≤ 0,0001); ns: nicht signifikant.

Der Grad der Muskularisierung wurde in kleinen (**Abbildung 32A**), mittleren (**Abbildung 32B**) und großen (**Abbildung 32C**) pulmonalen Gefäßen nach normoxischer und chronisch-hypoxischer Exposition in WT und TRPC1^{-/-} Mäusen untersucht. Aus der Analyse geht hervor, dass die chronische Hypoxie-Exposition in WT Mäusen zu einer Zunahme an voll-muskularisierten kleinen und mittleren Gefäßen führte, während die Anzahl der nicht-muskularisierten kleinen und mittleren Gefäßen abnahm (**Abbildung 32A, B**). Der Vergleich zwischen WT und TRPC1^{-/-} Mäusen machte deutlich, dass das Fehlen von TRPC1 einen Einfluss auf die charakteristischen Gefäßveränderungen unter chronischer Hypoxie hat. So führte die chronische Hypoxie in TRPC1^{-/-} Mäusen nicht zu einem signifikanten Anstieg der voll-muskularisierten kleinen Gefäße verglichen mit WT Mäusen (**Abbildung 32A**). Darüber

Ergebnisse

hinaus war nach chronischer Hypoxie-Exposition die Anzahl an nicht-muskularisierten kleinen Gefäßen in TRPC1^{-/-} Mäusen signifikant höher als in WT Mäusen unter gleichen Bedingungen. In den mittleren Gefäßen unterschied sich die Anzahl der nicht-muskularisierten Gefäße in den Mäusen beider Genotypen nach chronischer Hypoxie nicht voneinander (**Abbildung 32B**). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Anzahl der voll-muskularisierten großen Gefäße sowohl in WT als auch in TRPC1^{-/-} Mäusen unter chronischer Hypoxie nicht angestiegen war, während die nicht-muskularisierten Gefäße sowohl in WT als auch TRPC1^{-/-} Mäusen nicht mehr zählbar waren (**Abbildung 32C**). Die Muskularisierung von kleinen Gefäßen nach chronischer Hypoxie in WT und TRPC1^{-/-} Mäusen ist exemplarisch in **Abbildung 32D** zu sehen.

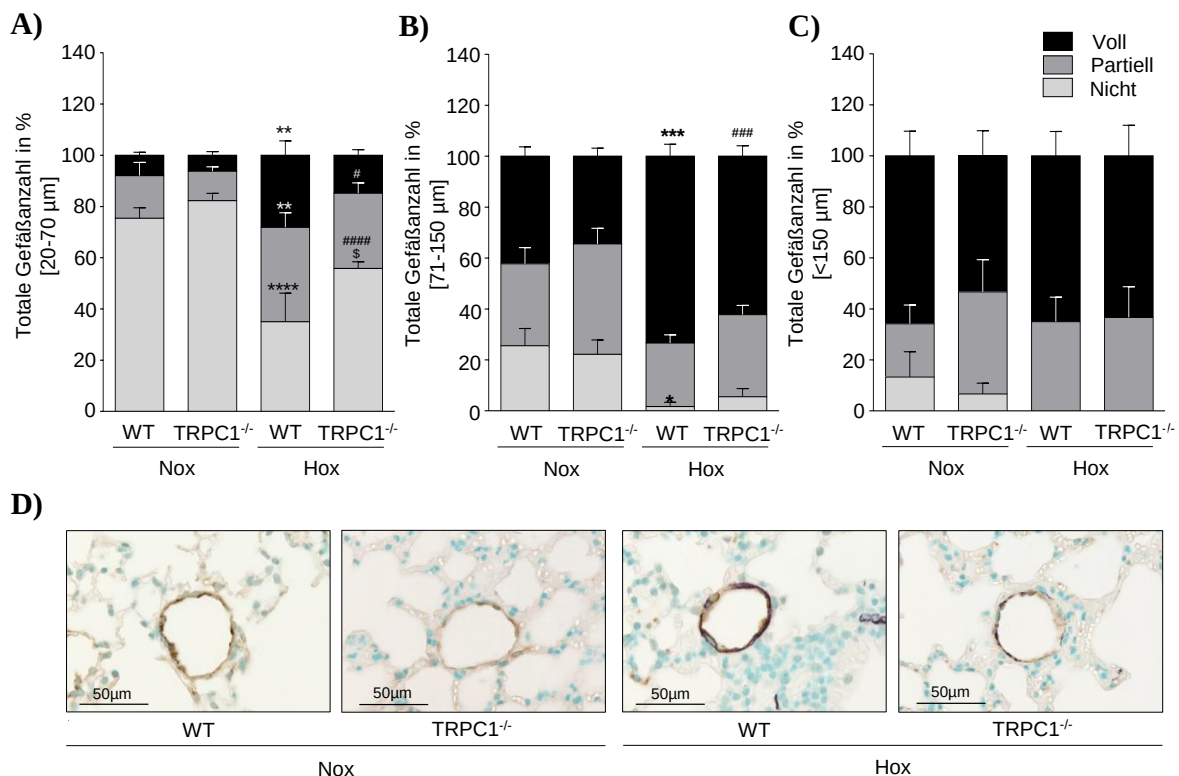


Abbildung 32: Darstellung des Effekts von TRPC1 Verlust auf die Muskularisierung von kleinen, mittleren und großen Gefäßen unter chronischer Hypoxie.

Muskularisierungsgrad von **A)** kleinen (externer Durchmesser 20-70 µm), **B)** mittlere (externer Durchmesser 71-150 µm) und **C)** großen (externer Durchmesser <150µm) Gefäßen nach 21 Tagen Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 21% O₂) in WT und TRPC1^{-/-} Mäusen (n=4-6). Der Anteil an voll-, partiell- und nicht-muskularisierten Gefäßen ist prozentual zur Gesamtzahl der Gefäße dargestellt. **D)** Repräsentative Bilder histologischer Färbungen von kleinen Gefäßen aus WT und TRPC1^{-/-} Mäusen nach Nox oder Hox. Färbung mit von-Willebrand Faktor (braun) und glattmuskulärem α-Aktin (violett) unter 200x Vergrößerung. Signifikanter Unterschied, wenn */#/\$: p≤0,05; **: p≤0,01; ***/####: p≤0,001; ****/#####: p≤0,0001; *: Vergleich WT Nox und Hox; #: Vergleich zwischen TRPC1^{-/-} Nox und Hox; \$: Vergleich zwischen WT und TRPC1^{-/-} unter Hox.

Zusammenfassend wurden in WT Mäusen die Ausbildung der Rechtsherzhypertrophie sowie die Verdickung der pulmonalen Gefäßwand beobachtet, die in PH resultieren. Obwohl die TRPC1^{-/-} Mäuse eine Rechtsherzhypertrophie entwickelten, war der Hypoxie-induzierte vaskuläre Gefäßumbau sowie der RVSP Anstieg in diesen Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen reduziert.

3.3 Charakterisierung der chronisch hypoxischen WT und TRPC1^{-/-} mPASC

Auf Grundlage der *in vivo* Ergebnisse wurde die funktionelle Relevanz von TRPC1 auf zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Migration und Apoptose, in WT und TRPC1^{-/-} mPASC unter chronischer Hypoxie-Exposition untersucht. Fehlregulationen der Proliferation, der Migration und der Apoptose sind ursächlich für die Gefäßveränderungen, die charakteristisch für die PH sind^{93; 152; 170}.

3.3.1 Einfluss von TRPC1 auf die mPASC Proliferation

Zunächst wurde der Einfluss von chronischer Hypoxie in unterschiedlichen Passagen auf das Proliferationsverhalten von WT mPASC mit Hilfe des *Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging* Kit untersucht. Sowohl in WT mPASC in Passage 0 nach 120 Stunden Hypoxie-Exposition als auch in Passage 1 nach 72 und 120 Stunden Hypoxie-Exposition induzierte chronische Hypoxie eine gesteigerte Proliferation der mPASC (**Abbildung 33A**). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sich das basale Proliferationsverhalten von WT mPASC unter Normoxie während der Passagierung veränderte. Die basale Proliferation war in mPASC in Passage 1 verglichen mit Passage 0 in Normoxie signifikant erhöht, während das erreichte Niveau nach chronischer Hypoxie zwischen den Passagen unverändert blieb (**Abbildung 33A**).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass chronische Hypoxie zu einer Erhöhung der Proliferationsrate führte, wurde der Effekt von chronischer Hypoxie in TRPC1^{-/-} mPASC untersucht. In **Abbildung 33B** wird ersichtlich, dass das Fehlen von TRPC1 keinen Einfluss auf die basale Proliferationsrate unter Normoxie im Vergleich zu WT mPASC hat. Ebenfalls konnte in den TRPC1^{-/-} mPASC beobachtet werden, dass die Hypoxie-Exposition zur Erhöhung der Proliferationsrate führte, verglichen mit WT mPASC aber signifikant vermindert war. Die Proliferation von WT und TRPC1^{-/-} mPASC sind exemplarisch in **Abbildung 33C** zu sehen.

Ergebnisse

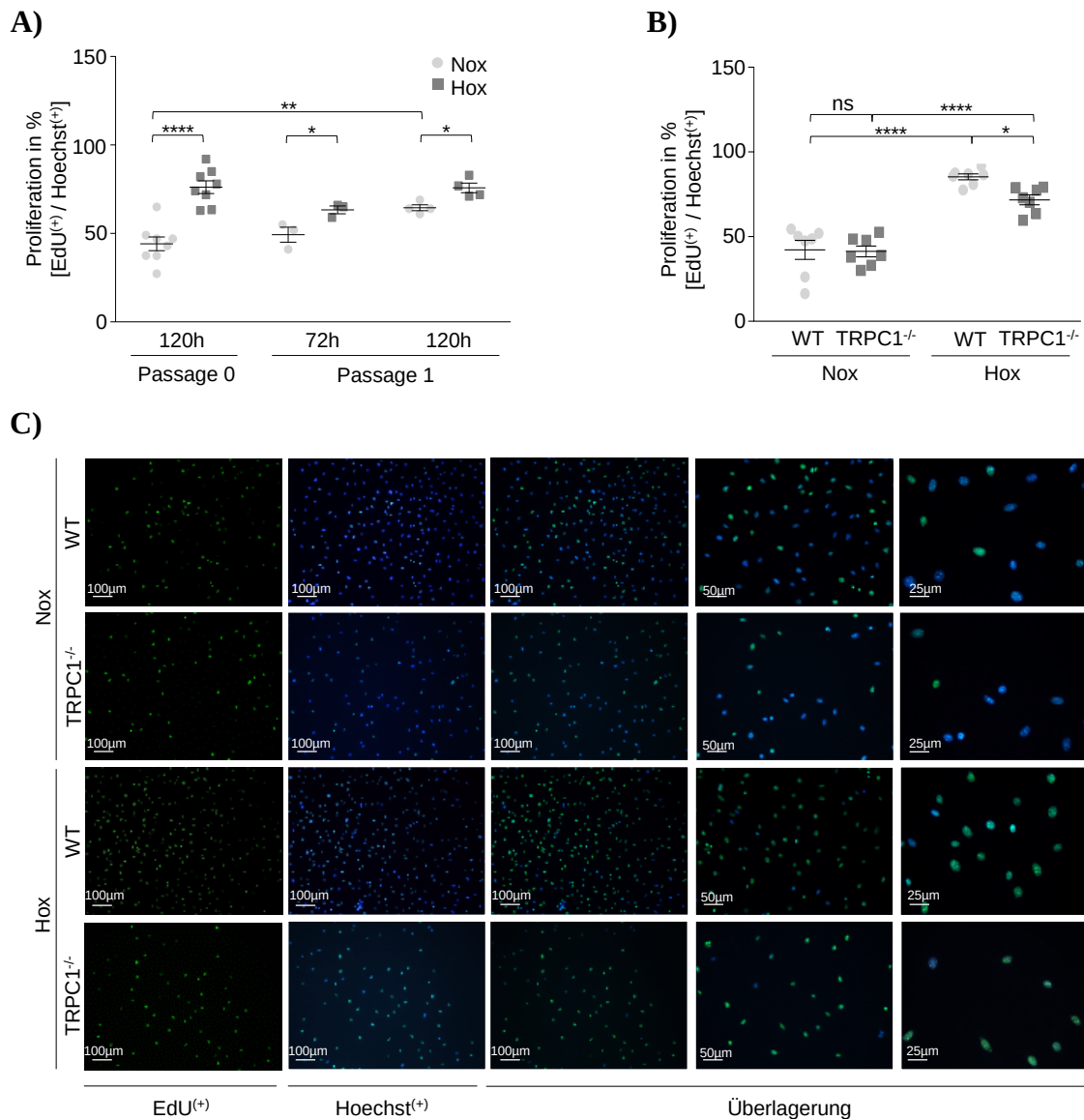


Abbildung 33: Proliferation von WT und TRPC1^{-/-} mPASC unter chronischer Hypoxie.

Untersuchung der Proliferation von mPASC unter Normoxie (Nox; 21% O₂) oder Hypoxie (Hox; 1% O₂) mittels 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU). **A)** WT mPASC wurden in Passage 0 nach 120 (n=8) und 72 Stunden (n=3) sowie in Passage 1 nach 120 Stunden (n=4) Nox oder Hox untersucht. **B)** WT und TRPC1^{-/-} mPASC in Passage 0 wurden nach 120 Stunden Nox oder Hox untersucht (n=7). Die Daten wurden durch Zählung der EdU-positiven (EdU⁽⁺⁾, grün) in Relation zu Hoechst-positiven (Hoechst⁽⁺⁾, blau) mPASC erzieht. **C)** Repräsentative Bilder der Proliferation von WT und TRPC1^{-/-} mPASC unter Normoxie oder Hypoxie unter 100x (Spalte 1 bis 3), 200x (Spalte 4) und 400x Vergrößerung (Spalte 5). Signifikanter Unterschied, wenn * (p ≤ 0,05); ** (p ≤ 0,01); **** (p ≤ 0,0001); ns: nicht signifikant; h: hours (Stunden).

Um den Einfluss von TRPC1 auf die Zellproliferation zu bestätigen, wurde eine weitere Proliferationsanalyse unter chronischer Hypoxie durchgeführt. TRPC1 wurde mit Hilfe einer TRPC1 spezifischen siRNA in WT mPASC herunterreguliert (*knockdown*). Die Effizienz des *knockdowns* wurde auf mRNA- und Protein-Ebene bestätigt (**Abbildung 34A; Abbildung 27C**). Nach dem *knockdown* von TRPC1 wurde die Proliferationsrate unter Normoxie und chronischer Hypoxie mit Kontroll-mPASC verglichen (**Abbildung 34B**). Auch hier zeigte

Ergebnisse

die Runterregulation von TRPC1 keinen Einfluss auf die basale Proliferationsrate unter normoxischen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle. Sowohl die WT mPASCs als auch die TRPC1^{-/-} mPASCs reagierten auf chronische Hypoxie mit einem signifikanten Anstieg der Proliferationsrate. Das Fehlen von TRPC1 in den transfizierten WT mPASCs führte ebenfalls zu einer verminderten Hypoxie-induzierten Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle. Die Proliferation von Kontroll- und mPASCs nach *knockdown* von TRPC1 ist exemplarisch in **Abbildung 34C** zu sehen.

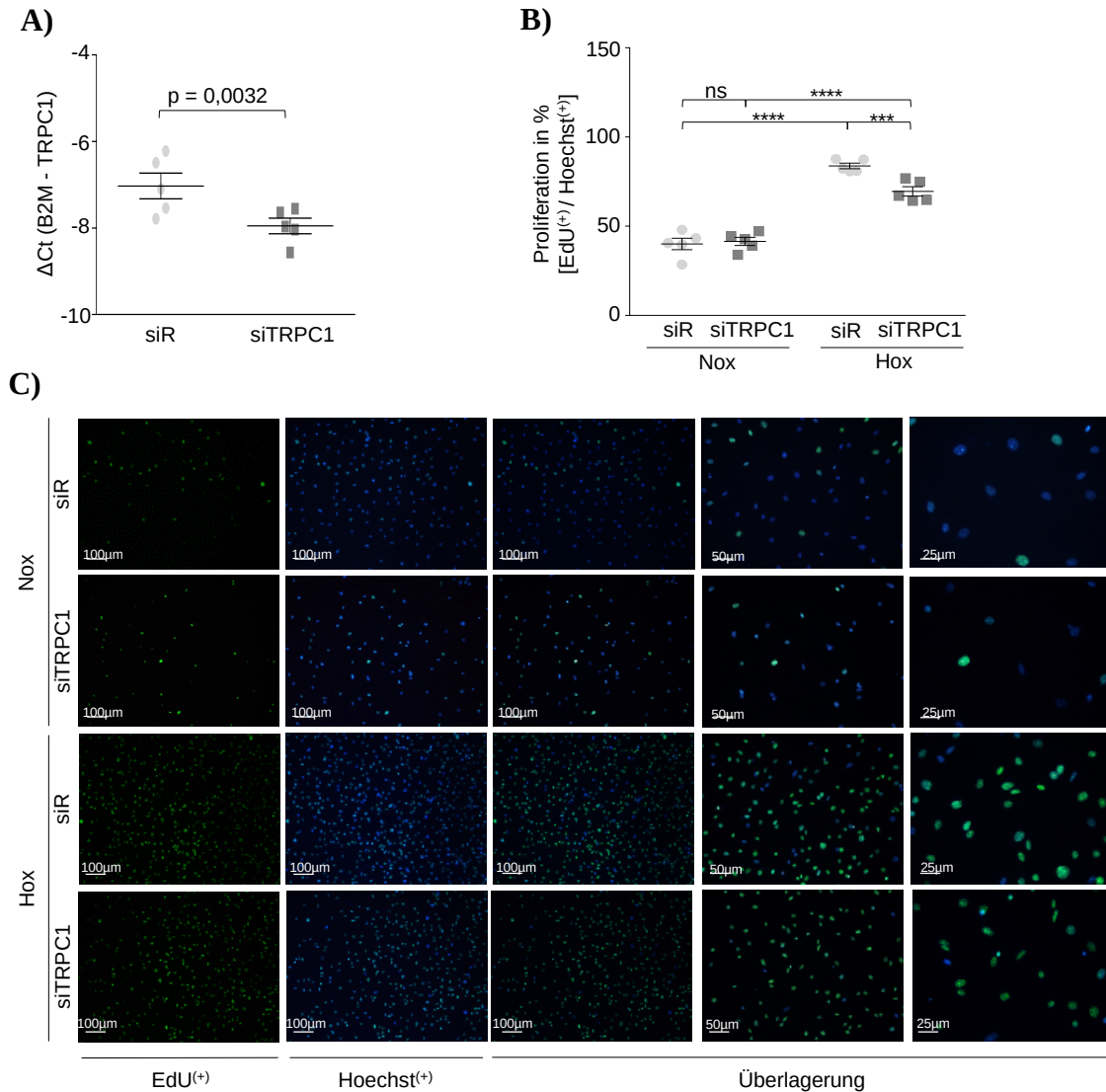


Abbildung 34: Proliferation von mPASCs nach *knockdown* von TRPC1 unter chronischer Hypoxie.

A) Relative TRPC1 mRNA-Expression in WT mPASCs in Passage 0 nach 24 Stunden TRPC1 *knockdown* (n=5) mittels RTqPCR. Die mPASCs wurden mit einer anti-TRPC1 siRNA oder einer Kontroll-siRNA (siR) unter Normoxie (Nox, 21% O₂) transfiziert. **B)** Untersuchung der Proliferation von WT mPASCs in Passage 0 nach TRPC1 *knockdown* nach 120 Stunden Nox oder Hypoxie (Hox; 1% O₂) (n=5) mittels 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU). Die mPASCs wurden nach der Isolation sowie an Tag 3 mit siTRPC1 oder siR transfiziert. Die Daten wurden durch Zählung der EdU-positiven (EdU⁽⁺⁾, grün) in Relation zu den Hoechst-positiven (Hoechst⁽⁺⁾, blau) mPASCs erzielt. **C)** Repräsentative Bilder der Proliferation von mPASCs unter Nox oder Hox nach Transfektion unter 100x (Spalte 1 bis 3), 200x (Spalte 4) und 400x Vergrößerung (Spalte 5). Signifikanter Unterschied, wenn *** (p≤0,001); **** (p≤0,0001); ns: nicht signifikant.

Ergebnisse

3.3.2 Einfluss von TRPC1 auf die mPASC Migration

Neben der Hypoxie-induzierten Proliferation von PASC, ist auch eine Veränderung des Migrationsverhaltens von PASC in PH in der Literatur beschrieben³⁹⁹. In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass 72 Stunden Hypoxie-Exposition zu einem signifikanten Anstieg der Migrationsrate in isolierten WT mPASC führte (**Abbildung 35A**). Die durch chronische Hypoxie induzierte Migration der WT mPASC wurde in TRPC1^{-/-} mPASC vollständig inhibiert. Auch die basale Migrationsrate unter normoxischen Bedingungen war in diesen mPASC verglichen mit WT mPASC signifikant vermindert. Die Migration von WT und TRPC1^{-/-} mPASC ist exemplarisch in **Abbildung 35B** dargestellt.

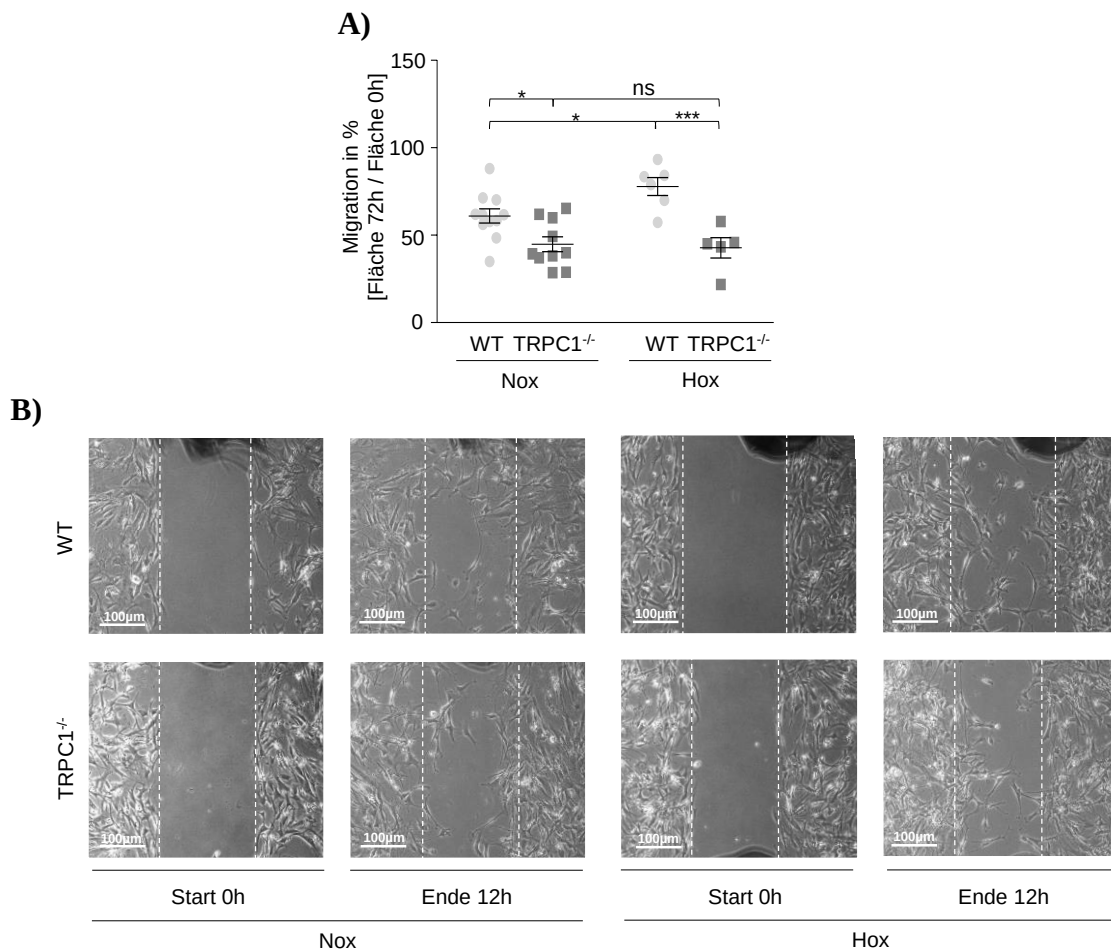


Abbildung 35: Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Migration von murinen PASC.

A) Analyse der relativen Migration von WT und TRPC1^{-/-} mPASC in Passage 1 (n=5-11) nach 72 Stunden Normoxie (Nox; 21% O₂) und Hypoxie (Hox; 1% O₂) mit Hilfe der *Wound-Healing* Methode. Die Migration wurde nach 60 Stunden gestartet (Migrationsstart; Start 0h) und bis zur Stunde 72 (Migrationsende; Ende 12h) beobachtet. Die migrierte Fläche zum Endzeitpunkt wurde in Prozent angegeben. **B)** Repräsentative Bilder der Migration von WT und TRPC1^{-/-} mPASC unter Nox und Hox unter 100x Vergrößerung zum Migrationsanfang und Migrationsende. Signifikanter Unterschied, wenn * (p ≤ 0,05); *** (p ≤ 0,001); ns: nicht signifikant; h: hour (Stunde).

Ergebnisse

3.3.3 Einfluss von TRPC1 auf die mPASC MC Apoptose

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von TRPC1 auf die Apoptose unter Normoxie und chronischer Hypoxie untersucht. Die Rolle von Hypoxie auf die Apoptoserate per se wurde nicht untersucht, da dies technisch nicht möglich war.

Wie man der **Abbildung 36A** entnehmen kann, zeigte sich kein Unterschied in der Apoptoserate zwischen WT und TRPC1^{-/-} mPASC MC sowohl unter normoxischen als auch unter chronisch hypoxischen Bedingungen (**Abbildung 36B**). Dieses Ergebnis konnte auch durch ein *knockdown* Experiment mit siRNA bestätigt werden (**Abbildung 36C, D**). Eine Behandlung mit Staurosporin, welche die Apoptose induziert, diente dabei als Positivkontrolle.

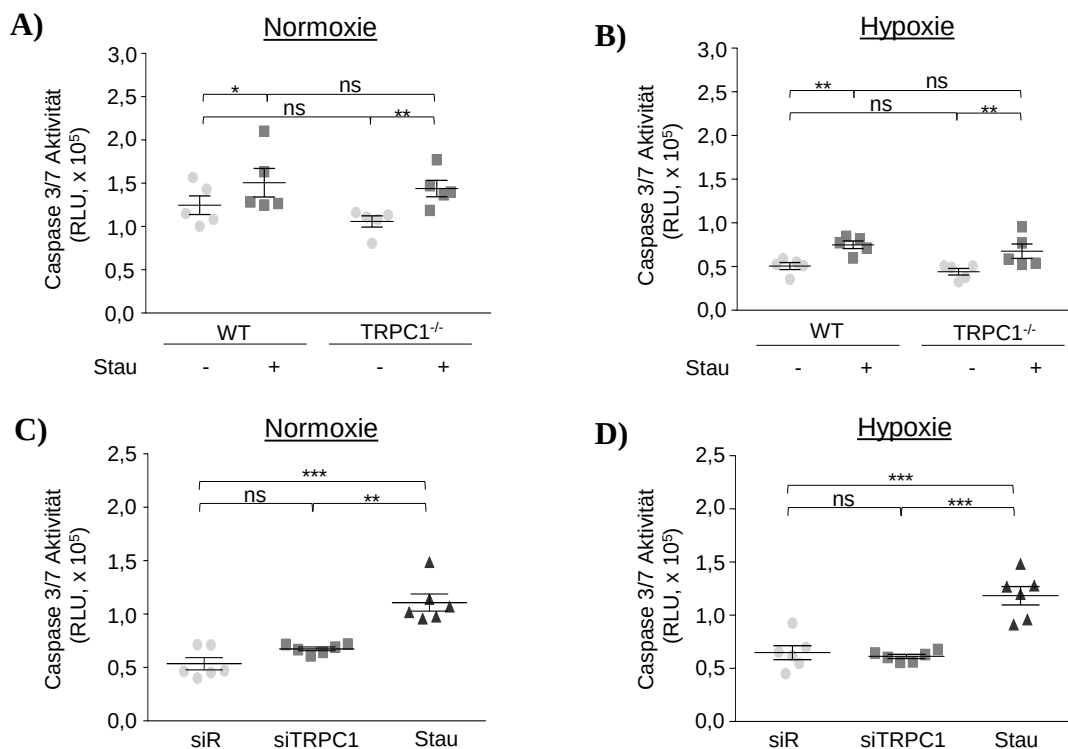


Abbildung 36: Einfluss von TRPC1 in mPASC MC auf die Apoptoserate unter chronischer Hypoxie.

Untersuchung der Apoptose von mPASC MC in Passage 1 unter 72 Stunden Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 1% O₂) mittels Messung der Caspase-3/7 Aktivität. Apoptose von WT und TRPC1^{-/-} mPASC MC unter **A**) Nox und **B**) Hox (n=5). **C, D**) Apoptose von WT mPASC MC nach dem *knockdown* von TRPC1 unter **C**) Nox und **D**) Hox (n=6). Die WT mPASC MC wurden im *knockdown* Experiment mit einer siRNA gegen TRPC1 (siTRPC1) oder einer Kontroll-siRNA (siR) transfiziert. Als Positivkontrolle dienten mit Staurosporin (Stau) inkubierte mPASC MC. Die Apoptose wurde in relativen Lumineszenz-Einheiten (*relative luminescence units*; RLU) gemessen. Signifikanter Unterschied, wenn * (p<0,05), ** (p<0,01) oder *** (p<0,001); ns: nicht signifikant.

Zusammenfassend geht aus der funktionellen Charakterisierung der WT und TRPC1^{-/-} mPASC MC hervor, dass TRPC1 die chronisch Hypoxie-anhängige Proliferation und Migration negativ beeinflusst. Die Apoptoserate wurde durch Fehlen von TRPC1 jedoch nicht verändert.

3.4 Einfluss von TRPC1 auf den Ca^{2+} -Haushalt in chronisch hypoxischen mPASMNC

Die beobachteten physiologischen und funktionellen Unterschiede zwischen WT Mäusen und $\text{TRPC1}^{-/-}$ Mäusen konnten auf molekularer Ebene bisher nicht geklärt werden. Der Ca^{2+} -Haushalt spielt in der Regulation der Proliferation, der Migration und der Apoptose eine wichtige Rolle^{173; 289; 304–306}. Da es sich bei TRPC1 um einen Kationen-Kanal handelt, ist eine Importanz dieses Proteins für den Ca^{2+} -Haushalt wahrscheinlich und wurde im folgenden Abschnitt genauer untersucht. Der Ca^{2+} -Haushalt wurde mit Hilfe einer Fura2-basierenden Fluoreszenzmethode in WT und $\text{TRPC1}^{-/-}$ mPASMNC untersucht. Hierfür wurden die isolierten mPASMNC unter normoxischen oder chronisch hypoxischen Bedingungen kultiviert und die Änderung im Ca^{2+} -Haushalt bestimmt. Dabei wurde die Relevanz des Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms (ROCE) und des Speicher-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) in chronischer Hypoxie sowie die Funktion von TRPC1 als ROC und SOC untersucht.

3.4.1 Untersuchung des Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms (ROCE)

Um Rückschlüsse auf die Importanz des ROCE in chronischer Hypoxie machen zu können, wurden mPASMNC mit Hilfe von OAG, einem DAG Analogon, stimuliert. DAG ist ein wichtiges Messenger-Molekül, welches nach Rezeptor-vermittelter Aktivierung von PLC intrazellulär an der Membran akkumuliert¹² und TRPC-Kanäle aktivieren kann^{364; 365}. Die intrazelluläre Akkumulation an der Membran von DAG¹² wird durch OAG-Gabe simuliert. Isolierte WT mPASMNC wurden nach fünftägiger Kultivierung unter Normoxie oder chronischer Hypoxie über eine Dauer von zehn Minuten gemessen. Der Messverlauf ist in **Abbildung 37A** und **Abbildung 37B** dargestellt. Es wurden unterschiedliche Messparameter ausgewertet und zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen verglichen. Die Messung der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ergab keinen Unterschied zwischen Normoxie und chronischer Hypoxie (**Abbildung 37C**). Durch die Stimulation der Zellen mit OAG wurde ein Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol induziert (**Abbildung 37A, B**). Dabei konnte beobachtet werden, dass die mPASMNC, kultiviert unter Hypoxie, einen schnelleren Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum zeigten (**Abbildung 37D**). Die erreichte maximale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unterschied sich zwischen normoxischen und hypoxischen mPASMNC weder in der absoluten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (**Abbildung 37E**) noch in den relativen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (**Abbildung 37F**).

Ergebnisse

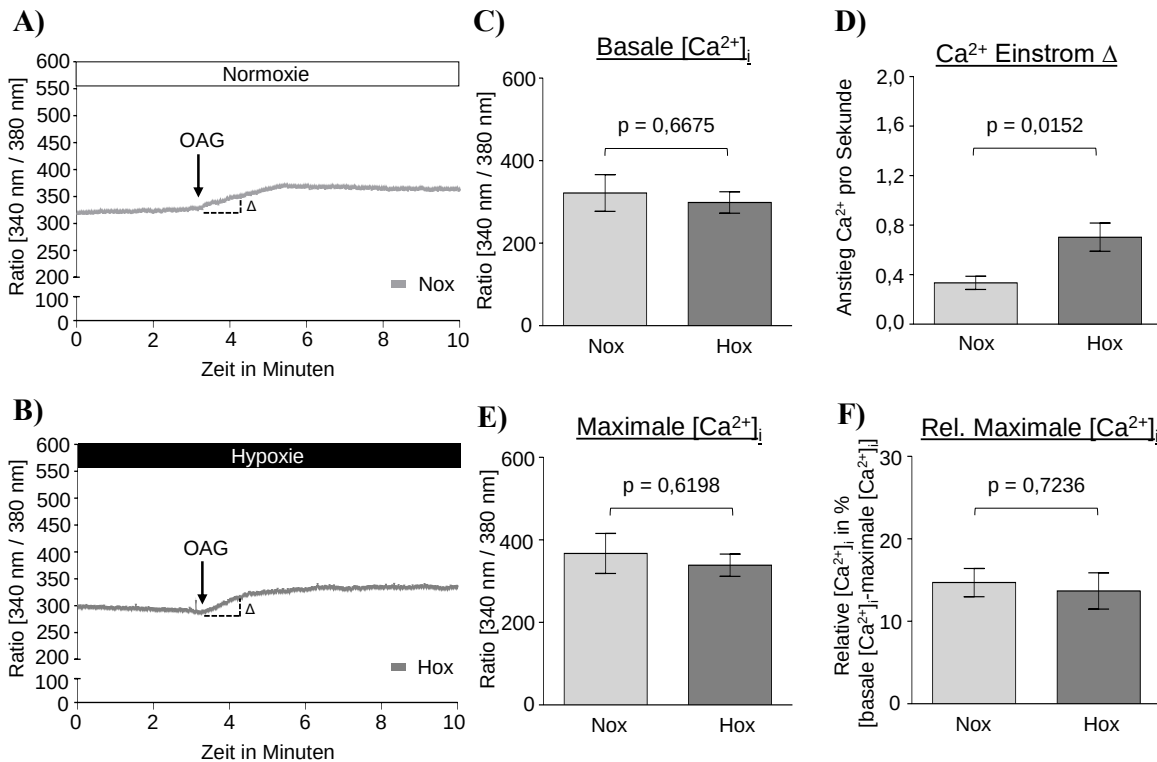


Abbildung 37: Effekt der chronischen Hypoxie auf den Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom (ROCE) in mPASC unter chronische Hypoxie.

Messungen der Ca^{2+} -Dynamik in mPASC in Passage 0 nach 120 Stunden **A)** Normoxie (Nox, 21% O_2) oder **B)** Hypoxie (Hox, 1% O_2) gemessen mit Hilfe von Fura2-AM in Ca^{2+} -haltigem Perfusat. ROCE wurde durch 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) induziert (n=6). **A, B)** Darstellung des Messungsverlaufs. Folgende Parameter wurden ausgewertet: **C)** die basale $[Ca^{2+}]_i$, **D)** die Änderung (Δ) im Ca^{2+} -Einstrom pro Sekunde nach OAG-Applikation, **E)** die maximale $[Ca^{2+}]_i$ nach OAG-Applikation und **F)** die relative Veränderung zwischen basaler und maximaler $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Der Vergleich von chronisch hypoxischen WT und TRPC1^{-/-} mPASC zeigte, dass das Fehlen von TRPC1 mehrere Messparameter beeinflusste. So wird aus **Abbildung 38A** deutlich, dass TRPC1^{-/-} mPASC im direkten Vergleich mit WT mPASC ein niedrigeres Fluoreszenzsignal aufwiesen, was auf eine niedrigere $[Ca^{2+}]_i$ hindeutet. Die Auswertung der Messparameter zeigte, dass TRPC1^{-/-} mPASC eine signifikant niedrigere basale $[Ca^{2+}]_i$ zeigten als WT mPASC (**Abbildung 38A**). Auch die Geschwindigkeit des durch OAG-induzierten Ca^{2+} -Einstrom war in TRPC1^{-/-} mPASC signifikant reduziert (**Abbildung 38C**). Die maximal erreichte $[Ca^{2+}]_i$ von WT mPASC nach OAG-Stimulation wurde von TRPC1^{-/-} mPASC nicht erreicht und lag signifikant unter dem Wert von WT mPASC (**Abbildung 38D**). Die relative Veränderung zum Ausgangssignal unterschied sich zwischen den Genotypen jedoch nicht (**Abbildung 38E**).

Ergebnisse

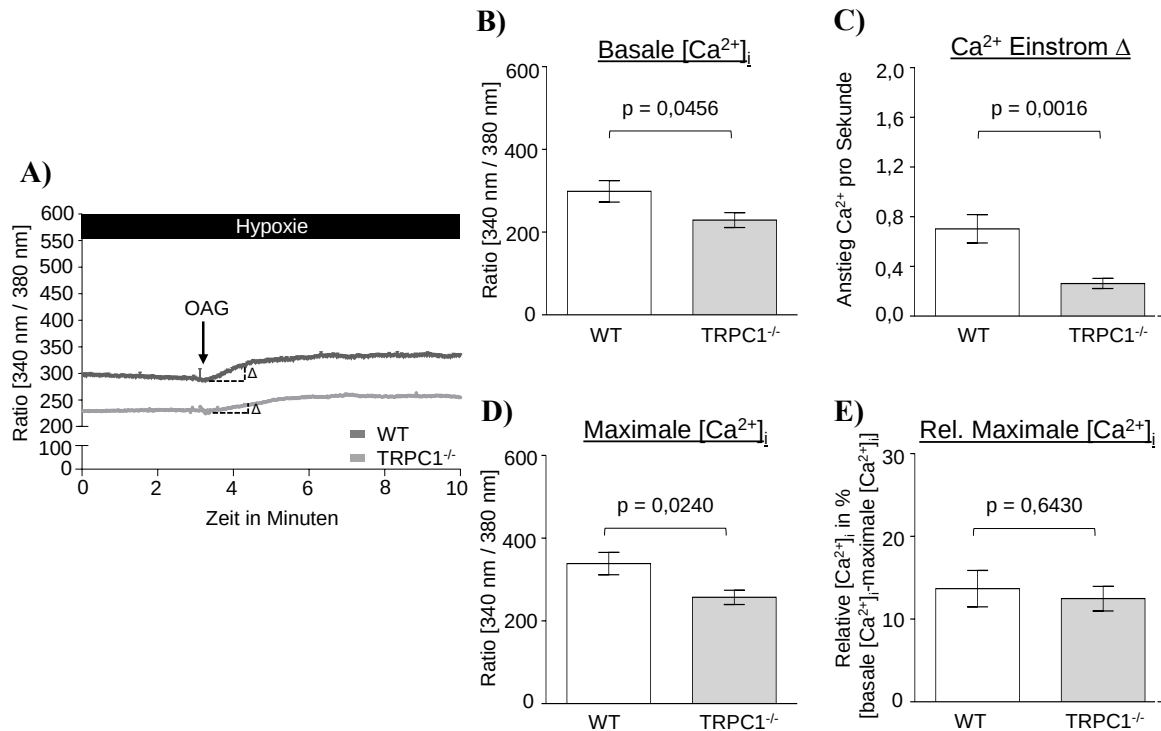


Abbildung 38: Einfluss von TRPC1 auf den ROCE in mPASC unter chronischer Hypoxie.

Messungen der Ca^{2+} -Dynamik in WT und TRPC1^{-/-} mPASC in Passage 0 nach 120 Stunden Hypoxie (Hox; 1% O_2) gemessen mit Hilfe von Fura2-AM in Ca^{2+} -haltigem Perfusat. ROCE wurde durch 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) induziert (n=6-7). **A)** Darstellung des Messungsverlaufs. Folgende Parameter wurden ausgewertet: **B)** die basale $[Ca^{2+}]_i$, **C)** die Änderung (Δ) im Ca^{2+} -Einstrom pro Sekunde nach OAG-Applikation, **D)** die maximale $[Ca^{2+}]_i$ nach OAG-Applikation und **E)** die relative Veränderung zwischen basaler und maximaler $[Ca^{2+}]_i$ in Prozent. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

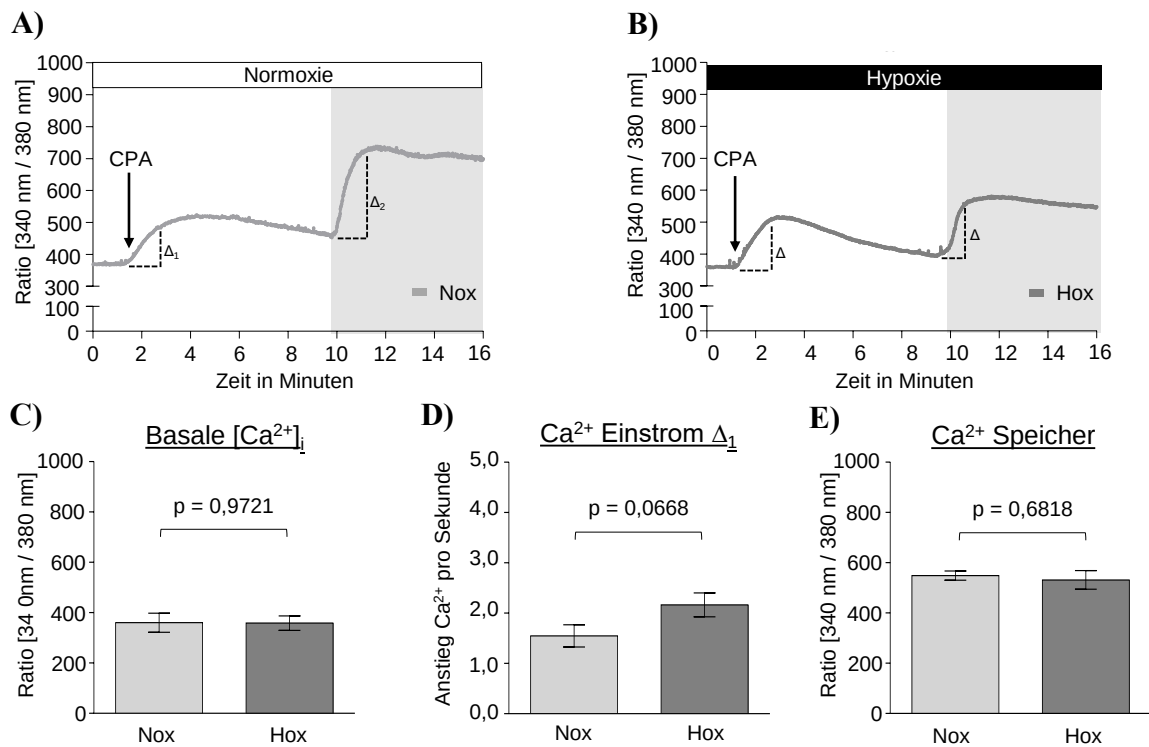
3.4.2 Untersuchung des Speicher-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE)

Um Rückschlüsse auf die Importanz des SOCE in chronischer Hypoxie machen zu können, wurden isolierte mPASC mit CPA behandelt. Die Chemikalie CPA verursacht die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und verhindert die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum über die Ca^{2+} -Pumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*)⁴⁰⁰. Die Speicherentleerung führt zur Aktivierung von SOC, sodass Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum in die Zelle einströmen kann^{98; 99}.

Isolierte WT mPASC wurden nach fünftägiger Kultivierung unter Normoxie oder chronischer Hypoxie über eine Dauer von 16 Minuten gemessen. Der Verlauf dieser Messungen ist in **Abbildung 39A** und **Abbildung 39B** dargestellt. Es wurden unterschiedliche Messparameter ausgewertet und zwischen normoxischer und hypoxischer Kondition verglichen. Die Messung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ zeigte keinen Unterschied zwischen Normoxie und chronischer Hypoxie (**Abbildung 39C**). Durch die Stimulation der mPASC mit CPA

Ergebnisse

wurde die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher induziert, wodurch ein Signalanstieg beobachtet werden konnte (**Abbildung 39A, B**). Wie in **Abbildung 39D** zu sehen ist, zeigte die Auswertung, dass es keinen Unterschied in der Geschwindigkeit der Entleerung zwischen mPASC, die unter Normoxie oder chronischer Hypoxie kultiviert wurden, gab. Das erreichte maximale Niveau nach CPA-Gabe unterschied sich ebenfalls nicht in den beiden Konditionen (**Abbildung 39E**). Anschließend wurde den mPASC extrazellulär Ca^{2+} angeboten, wodurch die mPASC mit einem Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol reagierten (**Abbildung 39A, B**). Dabei wurde beobachtet, dass sich die mPASC, kultiviert unter Normoxie oder chronischer Hypoxie, in der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Einstroms aus dem extrazellulären Raum nach Speicher-Entleerung nicht unterschieden (**Abbildung 39F**). Tendenziell zeigten die hypoxisch-kultivierten mPASC eine niedrigere maximale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Vergleich mit normoxisch-kultivierten mPASC (**Abbildung 39G**). In Relation zum basalen Signal konnte in den chronisch hypoxischen mPASC sogar ein geringerer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beobachtet werden (**Abbildung 39H**).



Ergebnisse

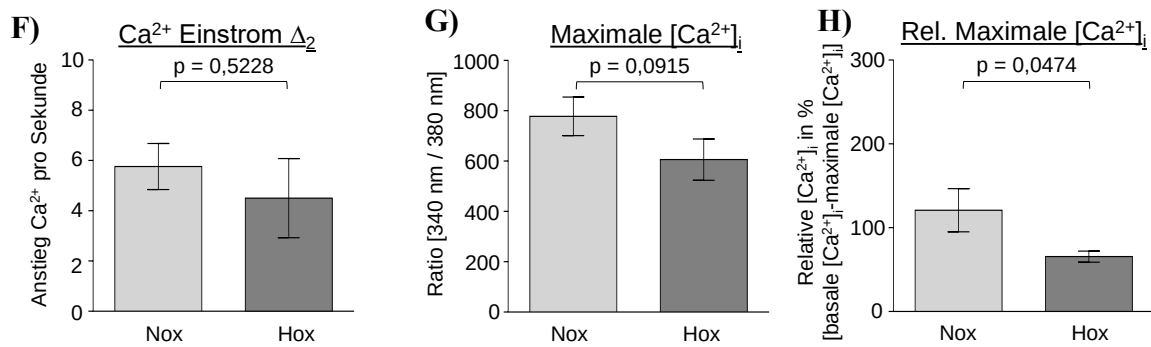
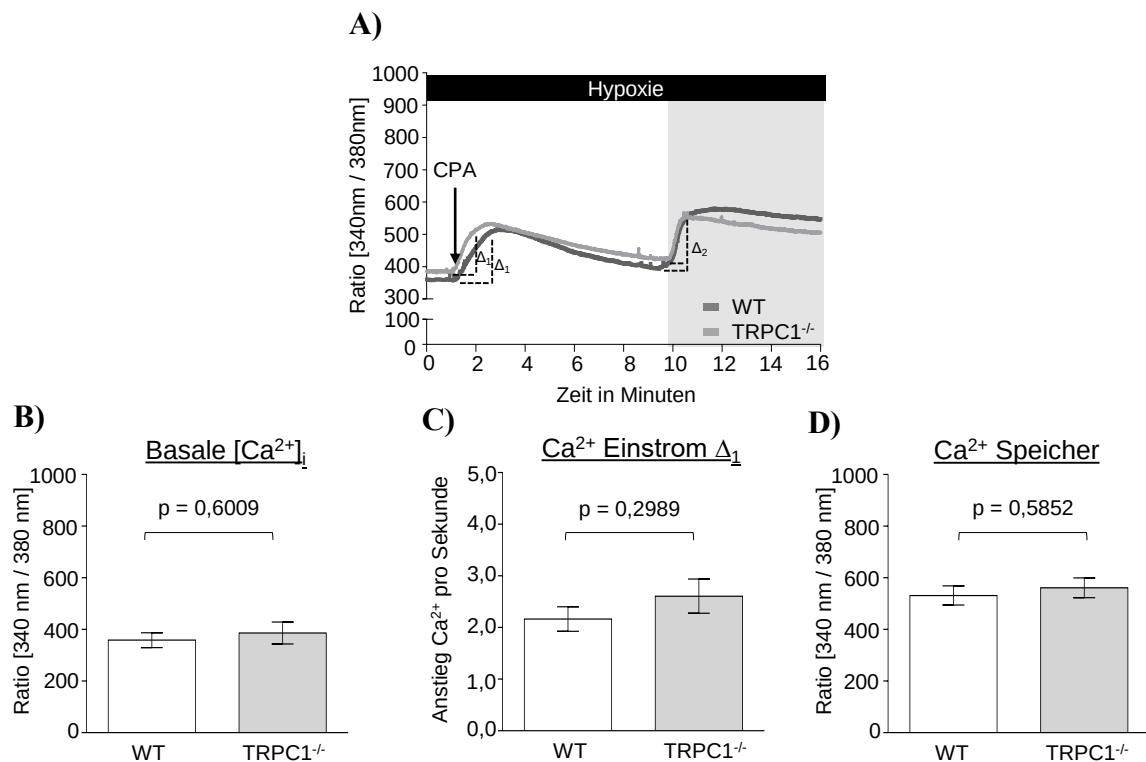


Abbildung 39: Effekt von chronischer Hypoxie auf Speicher-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom (SOCE).

Messungen der Ca^{2+} -Dynamik in mPASC in Passage 0 nach 120 Stunden (**A**) Normoxie (Nox, 21% O_2) oder (**B**) Hypoxie (Hox, 1% O_2) gemessen mit Hilfe von Fura2-AM in Ca^{2+} -freiem Perfusat. SOCE wurde durch Cyclopiazonsäure (*cyclopiazonic acid*, CPA) induziert (n=6-7). **A, B** Darstellung des Messungsverlaufs. Nach CPA-Applikation wurde dem Perfusat extrazellulär Ca^{2+} zugegeben (graue Schattierung). Folgende Parameter wurden ausgewertet: **C**) die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$, **D**) die Änderung (Δ_1) im Ca^{2+} -Einstrom pro Sekunde nach CPA-Applikation, **E**) die maximale Ca^{2+} -Speicher-Entleerung nach CPA-Applikation, **F**) die Änderung (Δ_2) im Ca^{2+} -Einstrom pro Sekunde nach extrazellulärer Ca^{2+} -Applikation, **G**) der maximale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach extrazellulärer Ca^{2+} -Applikation, **H**) die relative Veränderung zwischen basaler und maximaler $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Prozent. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Ein Vergleich zwischen WT und $\text{TRPC1}^{-/-}$ mPASC unter chronischer Hypoxie zeigte, dass das Fehlen von TRPC1 keinen der ausgewerteten Messparameter beeinflusste. So wird aus **Abbildung 40A** deutlich, dass $\text{TRPC1}^{-/-}$ mPASC im direkten Vergleich mit WT mPASC den gleichen Verlauf aufwiesen. Die Auswertung der Messparameter bestätigte, dass sich $\text{TRPC1}^{-/-}$ mPASC unter chronischer Hypoxie in keinem der ausgewerteten Messparameter (**Abbildung 40B-G**) von WT PASC unterschieden.



Ergebnisse

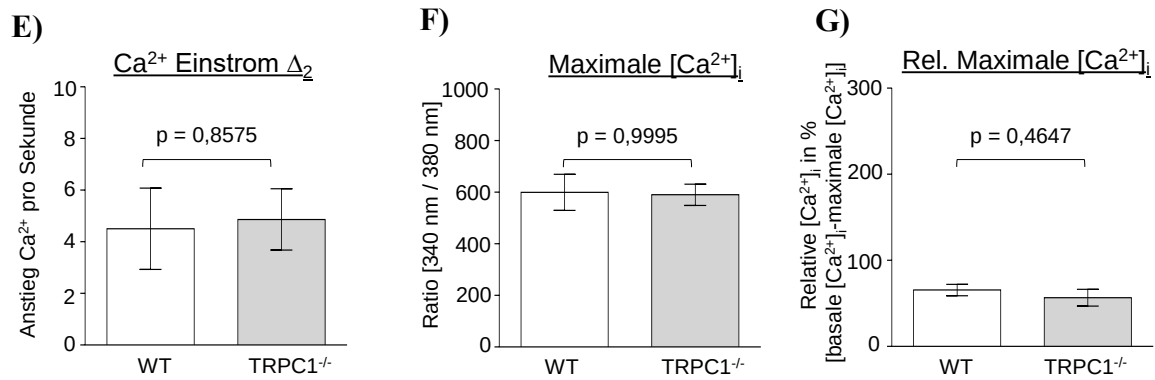


Abbildung 40: Einfluss von TRPC1 auf SOCE in mPASC unter chronische Hypoxie.

Messungen der Ca^{2+} -Dynamik in WT und TRPC1^{-/-} mPASC in Passage 0 nach 120 Stunden Hypoxie (Hox; 1% O_2) gemessen mit Hilfe von Fura2-AM in Ca^{2+} -freiem Perfusat. SOCE wurde durch Cyklopiazonsäure (*cyclopiazonic acid*, CPA) induziert (n=6-7). **A)** Darstellung des Messungsverlaufs. Nach CPA-Applikation wurde dem Perfusat Ca^{2+} extrazellulär zugegeben (graue Schattierung). Folgende Parameter wurden ausgewertet: **B)** die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$, **C)** die Änderung (Δ_1) im Ca^{2+} -Einstrom pro Sekunde nach CPA-Applikation, **D)** die maximale Ca^{2+} -Speicher Entleerung nach CPA-Applikation, **E)** die Änderung (Δ_2) im Ca^{2+} -Einstrom pro Sekunde nach extrazellulärer Ca^{2+} -Applikation, **F)** der maximale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach extrazellulärer Ca^{2+} -Applikation, **G)** die relative Veränderung zwischen basaler und maximaler $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Prozent. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

3.5 Molekulare Untersuchungen der chronisch hypoxischen WT und TRPC1^{-/-} Mäuse

3.5.1 Molekulare Veränderungen in WT Mäusen nach chronischer Hypoxie-Exposition

Um die Resultate aus den funktionellen Untersuchungen auf molekularer Ebene zu bestätigen und zugrundeliegenden Mechanismen zu analysieren, wurde das Expressionsniveau von charakteristischen Proliferations- und Apoptosemarkern untersucht. Die molekulare Analyse zeigte, dass die chronische Hypoxie-Exposition in Passage 0 zu einer signifikant erhöhten mRNA-Expression des pro-proliferativen Proteins Ki67 führte (**Abbildung 41A**). Darüber hinaus führte chronische Hypoxie auch zum Anstieg des Zellzyklus-steuernden Proteins Cyclin D1 (**Abbildung 41B**).

Ergebnisse

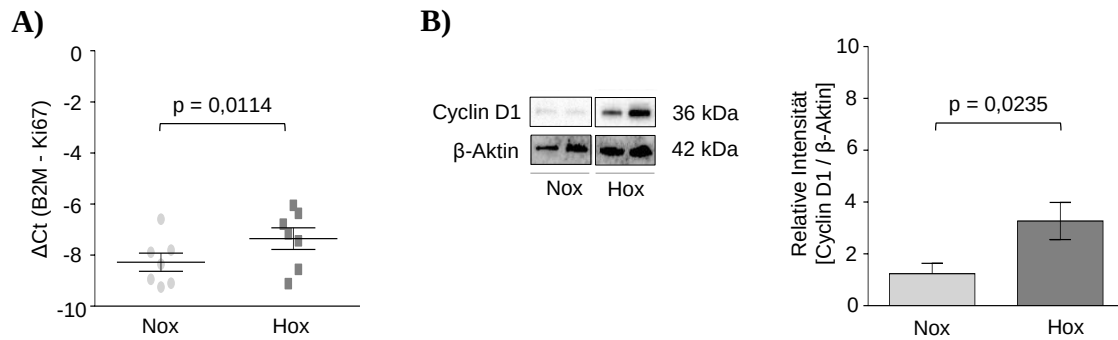


Abbildung 41: Expression von Ki67 und Cyclin D1 in WT mPASC unter chronischer Hypoxie.

Untersuchung der Expression von Ki67 und Cyclin D1 in WT mPASC in Passage 0 nach 120 Stunden Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 1% O₂). **A)** Relative Ki67 mRNA-Expression nach Nox oder Hox (n=7) untersucht mittels RTqPCR. **B)** Relative Cyclin D1 Protein-Expression nach Nox oder Hox (n=7) untersucht mittels Western Blot Analyse. Ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung sind dargestellt. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Die Phosphorylierung der pro-proliferativen extrazellulären signalregulierten Kinase 1 und 2 (Erk1/2) wurde jedoch nicht induziert (**Abbildung 42A**). In Relation zur β -Aktin Protein-Expression bewirkte chronische Hypoxie sogar eine signifikante Dephosphorylierung von Erk1/2. Das pro-proliferative Protein p38 hingegen wurde nach chronischer Hypoxie-Exposition signifikant phosphoryliert (**Abbildung 42B**).

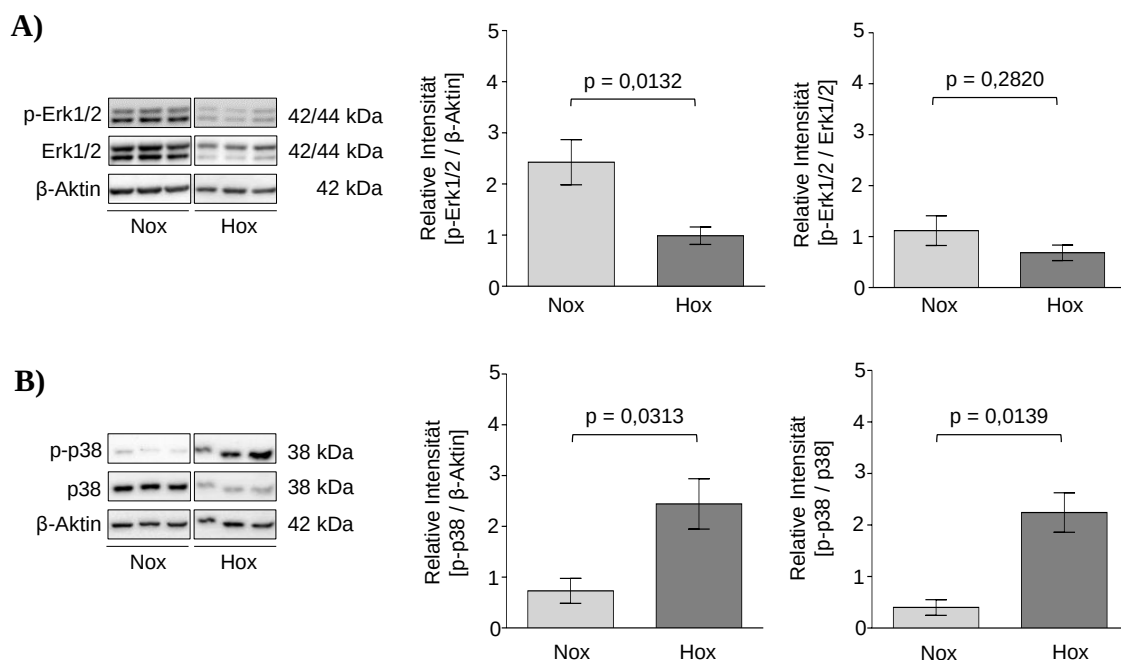


Abbildung 42: Der Effekt von chronischer Hypoxie auf die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 in WT mPASC.

Untersuchung der relativen Phosphorylierung (p-) von **A)** Erk1/2 und **B)** p38 in WT mPASC in Passage 0 nach 120 Stunden Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 1% O₂) (n=7) mittels Western Blot Analyse. Ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung sind dargestellt. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Ergebnisse

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch in homogenisierten WT Mäuslungen die Cyclin D1 Protein-Expression unter chronischer Hypoxie signifikant angestiegen war (**Abbildung 43A**). Allerdings wurde die Phosphorylierung von Erk1/2 unter chronischer Hypoxie in homogenisierten WT Mäuslungen nicht beeinflusst (**Abbildung 43B**), während die Phosphorylierung von p38 zugenommen hatte, nicht jedoch in Relation zu β -Aktin (**Abbildung 43C**).

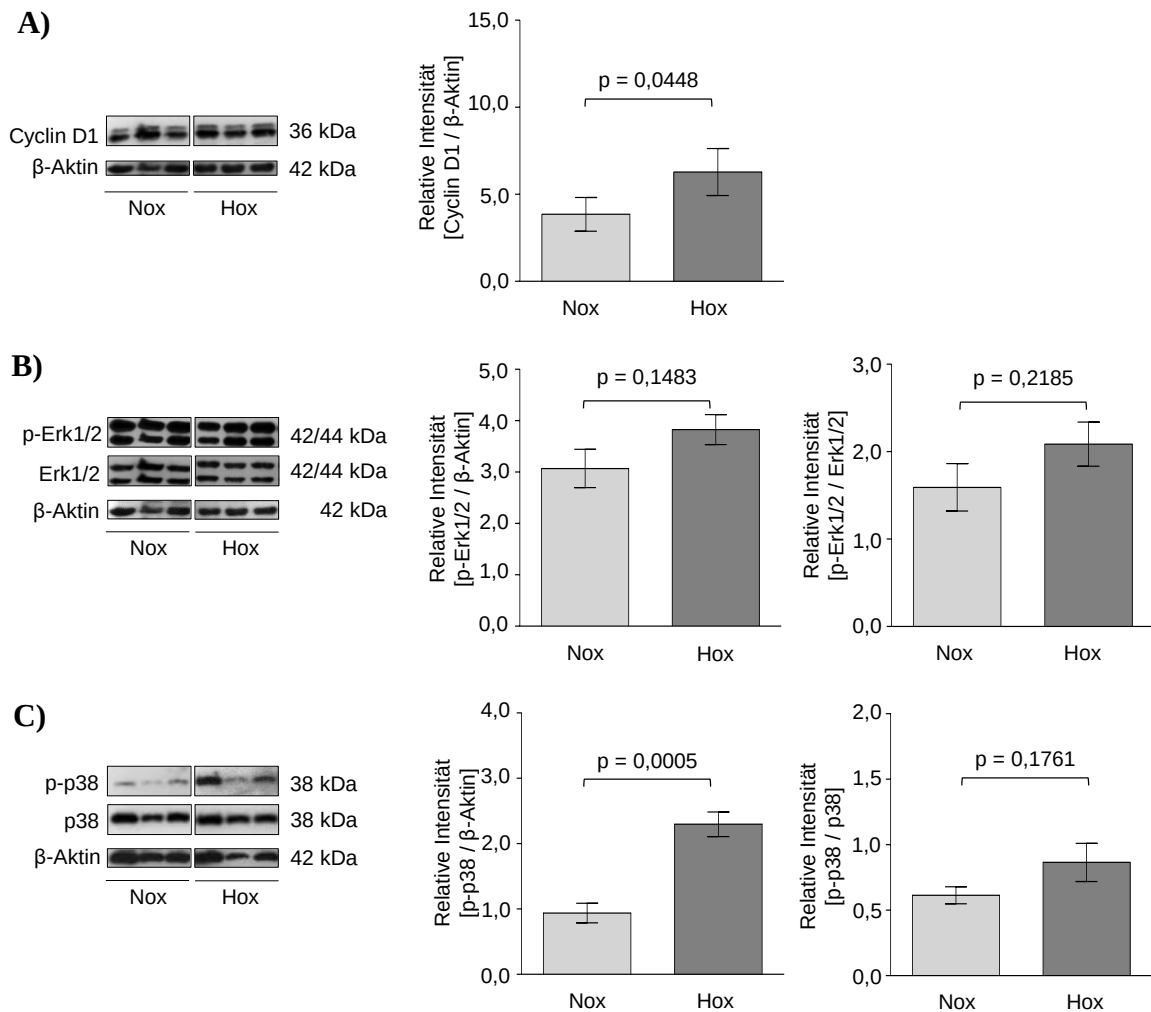


Abbildung 43: Der Effekt von chronischer Hypoxie auf die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 in homogenisierten Mäuslungen.

Untersuchung der relativen **A)** Cyclin D1 Protein-Expression sowie der Phosphorylierung (p-) von **B)** Erk1/2 und **C)** p38 in homogenisierten WT Mäuslungen nach 21 Tagen Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 10% O₂) (n=5) mittels Western Blot Analyse. Repräsentative Blots und die densitometrischen Auswertungen sind dargestellt. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Die Ergebnisse aus **Abbildung 44** zeigen, dass chronische Hypoxie außerdem zur reduzierten Expression von α -SMA auf mRNA- und Protein-Ebene in isolierten mPASCs führte.

Ergebnisse

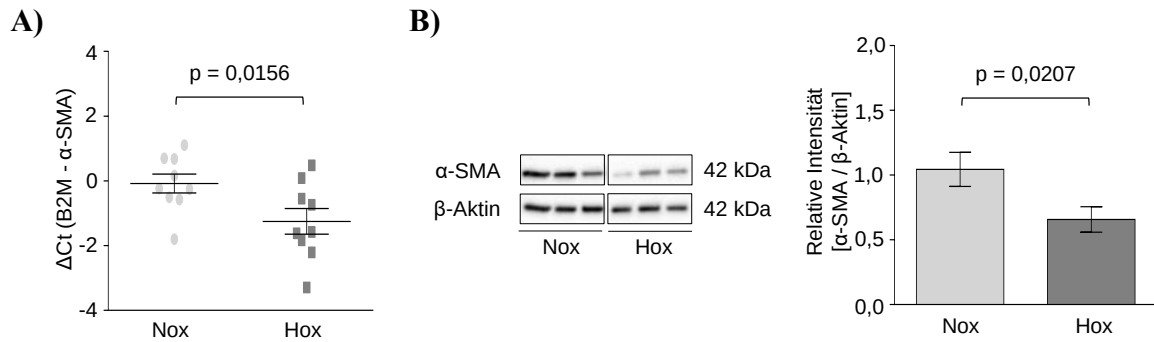


Abbildung 44: Effekt der chronischen Hypoxie auf α -SMA Expression in mPASC.

Untersuchung der α -SMA-Expression von WT mPASC in Passage 0 nach 120 Stunden Normoxie (Nox, 21% O_2) oder Hypoxie (Hox, 1% O_2). **A)** Relative α -SMA mRNA-Expression untersucht mittels RTqPCR (n=8) und **B)** relative α -SMA Protein-Expression mittels Western Blot Analyse (n=7). Ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung sind dargestellt. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Obwohl der Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Apoptoserate in WT mPASC per se nicht untersucht wurde, deutet die Herunterregulation des pro-apoptotischen Markers Bax (**Abbildung 45B**) auf mRNA-Ebene auf eine verminderte Apoptoserate unter chronischer Hypoxie im Vergleich zur Normoxie hin. Der pro-apoptotische Marker Bad (**Abbildung 45A**) sowie der anti-apoptotische Marker Bcl2 (**Abbildung 45C**) waren hingegen durch chronische Hypoxie nicht reguliert.

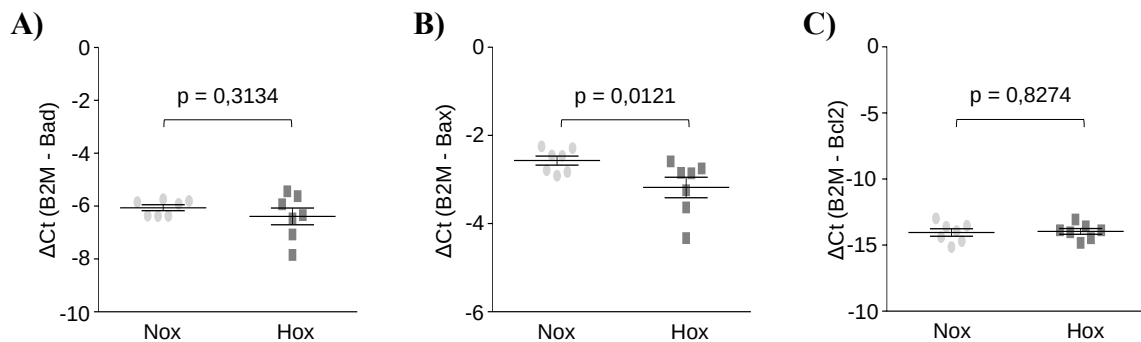


Abbildung 45: Effekt von chronischer Hypoxie auf pro- und anti-apoptotischen Protein in WT mPASC.

Quantitative Untersuchung der relativen **A)** Bad-, **B)** Bax- und **C)** Bcl2-Expression in WT mPASC in Passage 0 nach 120 Stunden Normoxie (Nox, 21% O_2) oder Hypoxie (Hox, 1% O_2) (jeweils n=7) mittels RTqPCR. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

3.5.2 Molekulare Veränderungen in $TRPC1^{-/-}$ Mäusen nach chronischer Hypoxie-Exposition

Neben den molekularen Veränderungen in WT mPASC wurde auch die Auswirkung des Fehlens von $TRPC1$ in mPASC unter chronischer Hypoxie auf molekularer Ebene untersucht. Der Vergleich von WT mPASC mit $TRPC1^{-/-}$ mPASC nach chronischer Hypoxie-Exposition zeigte, dass weder Unterschiede in der Expression des pro-proliferativen

Ergebnisse

Marker Ki67, noch des Zellzyklus-regulierenden Proteins Cyclin D1 (**Abbildung 46**) festgestellt werden konnten.

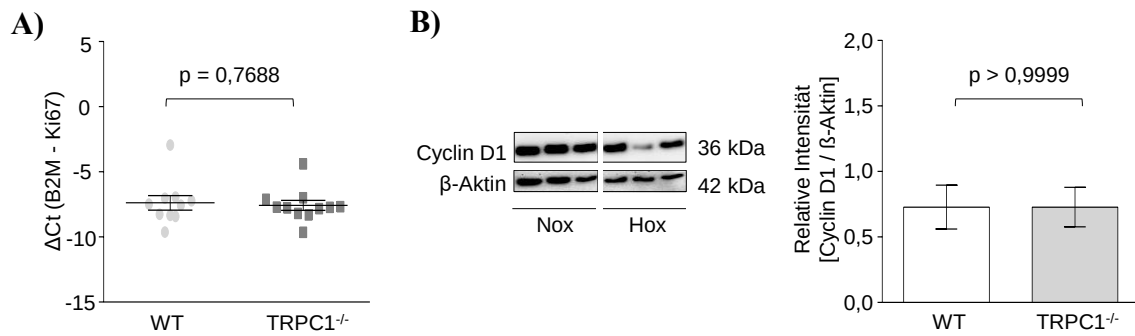


Abbildung 46: Einfluss von TRPC1 auf Ki67 und Cyclin D1 Expression unter chronischer Hypoxie.

Untersuchung der Ki67- und Cyclin D1-Expression nach 120 Stunden Hypoxie (1% O₂) in WT und TRPC1^{-/-} mPASC in Passage 0. **A)** Relativen Ki67 mRNA-Expression quantifiziert mittels RTqPCR (n=10-11). **B)** Relative Cyclin D1 Protein-Expression untersucht mittels Western Blot Analyse (n=5). Ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung sind dargestellt. Signifikanter Unterschied, wenn p ≤ 0,05.

Außerdem unterschieden sich die mPASC beider Genotypen nach chronischer Hypoxie nicht in der Phosphorylierung der pro-proliferativen Proteine Erk1/2 und p38 (**Abbildung 47**).

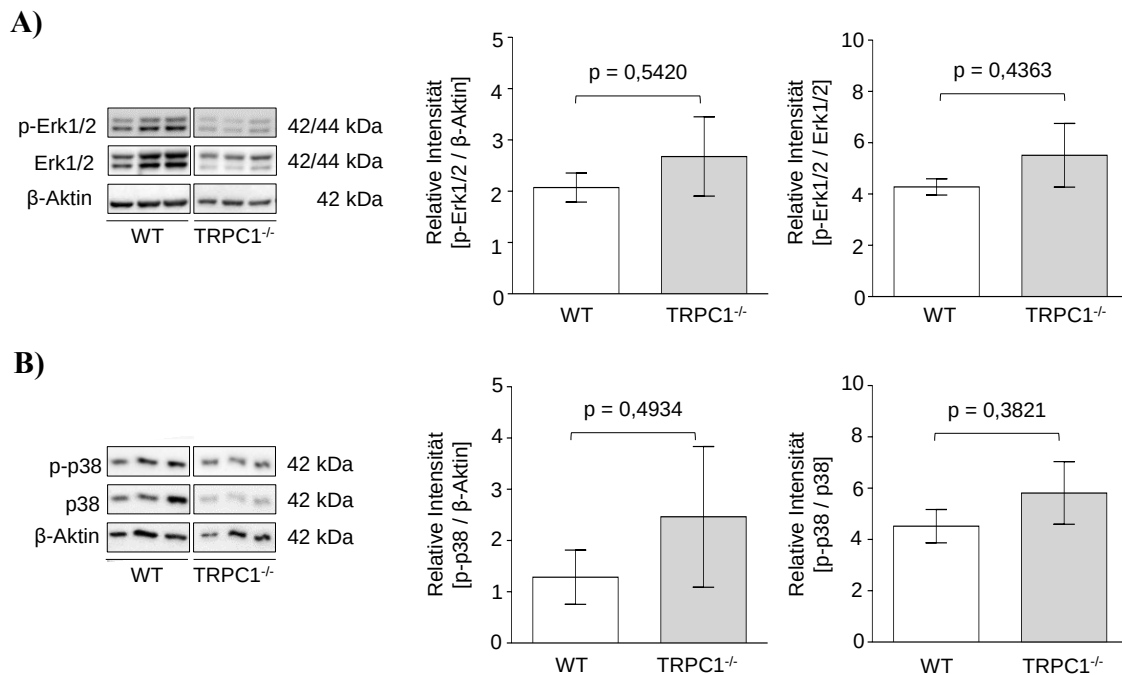


Abbildung 47: Einfluss von TRPC1 auf die Phosphorylierung der pro-proliferativen Proteine Erk1/2 und p38 in mPASC unter chronischer Hypoxie.

Untersuchung der relativen Phosphorylierung (p-) von **A)** Erk1/2 (n=5-7) und **B)** p38 (n=6-8) in WT und TRPC1^{-/-} mPASC in Passage 0 nach 120 Stunden Hypoxie (1% O₂) mittels Western Blot Analyse. Ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung sind dargestellt. Signifikanter Unterschied, wenn p ≤ 0,05.

Diese Beobachtung konnte in homogenisierten Lungen aus WT und TRPC1^{-/-} Mäusen nach chronischer Hypoxie-Exposition ebenfalls gemacht werden. Aus **Abbildung 48** geht hervor,

Ergebnisse

dass sich die Cyclin D1 Protein-Expression als auch die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 zwischen WT und TRPC1^{-/-} nicht unterschieden.

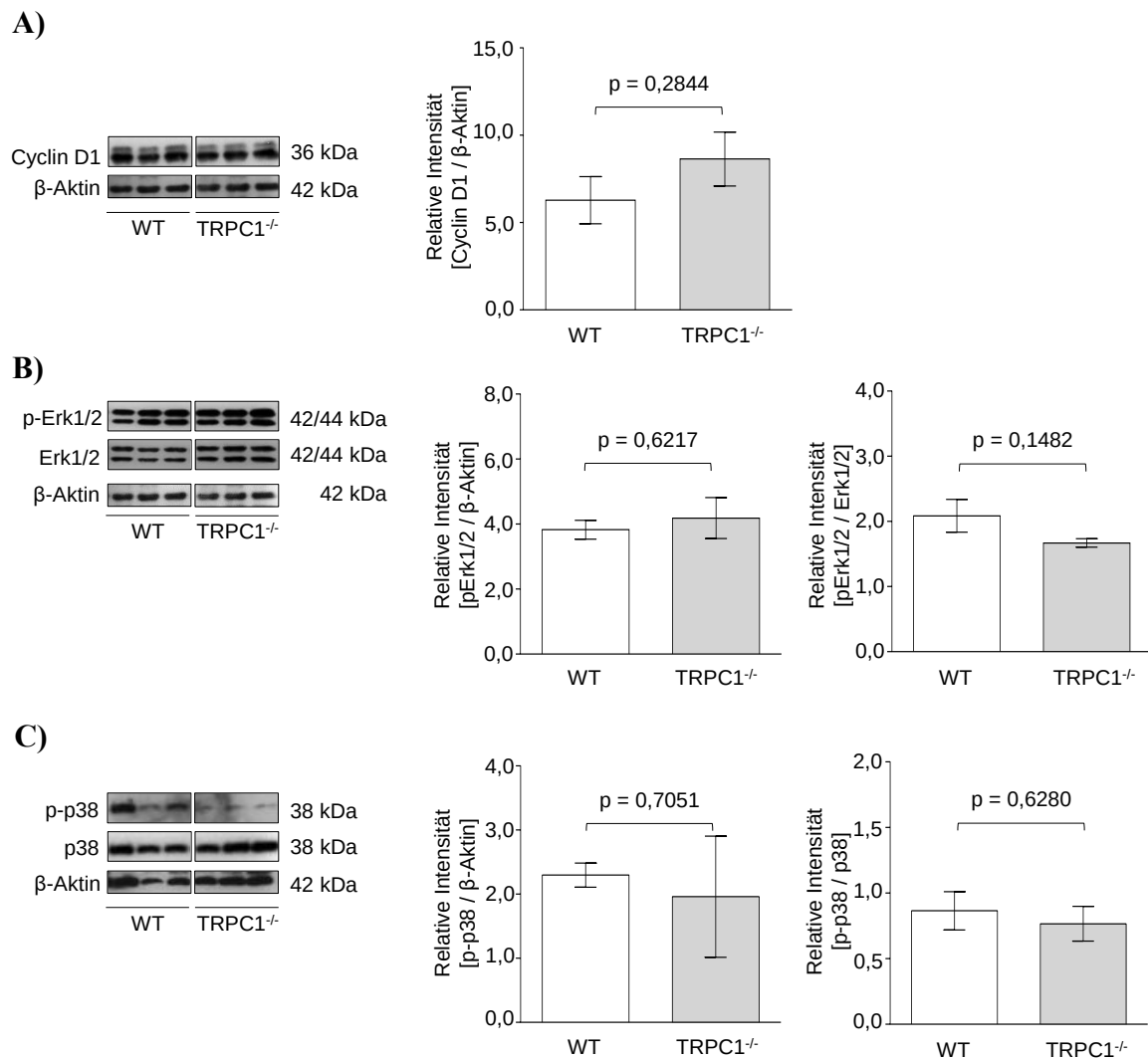


Abbildung 48: Einfluss von TRPC1 auf die Phosphorylierung der pro-proliferativen Proteine Erk1/2 und p38 sowie auf die Expression von Cyclin D1 in homogenisierten Maoslungen unter chronischer Hypoxie.

Untersuchung der relativen **A)** Cyclin D1 Expression sowie der relativen Phosphorylierung (p-) von **B)** Erk1/2 und **C)** p38 in homogenisierten Maoslungen aus WT und TRPC1^{-/-} Mäusen nach 21 Tagen Hypoxie (10% O₂) (n=5) mittels Western Blot Analyse. Ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung sind dargestellt. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Darüber hinaus konnte auch kein Unterschied in der α -SMA Expression auf mRNA- und Protein-Ebene festgestellt werden (**Abbildung 49**).

Ergebnisse

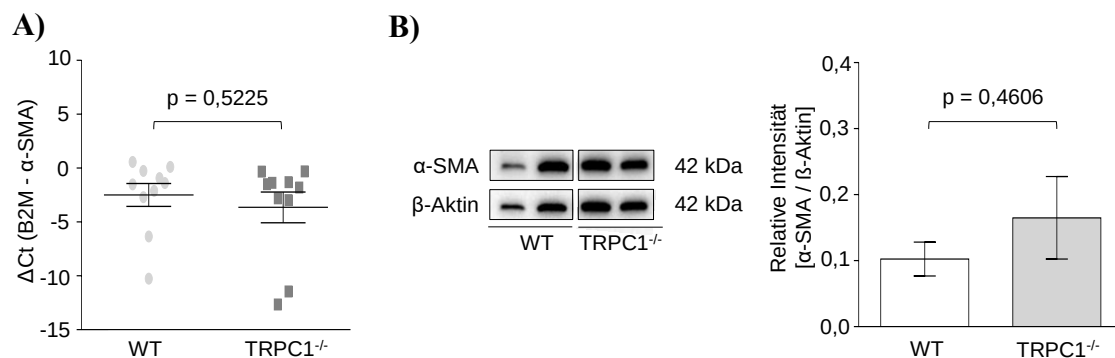


Abbildung 49: Einfluss von TRPC1 auf die Expression von α -SMA in mPASC unter chronischer Hypoxie. Untersuchung der α -SMA nach 120 Stunden Hypoxie (1% O₂) in WT und TRPC1^{-/-} mPASC in Passage 0. **A)** Relative α -SMA mRNA-Expression untersucht mittels RTqPCR (n=10). **B)** Relative α -SMA Protein-Expression untersucht mittels Western Blot Analyse (n=4-6). Ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung sind dargestellt. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Weiterhin konnte kein Unterschied in der mRNA-Genexpression der pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Marker Bad, Bax und Bcl2 (**Abbildung 50**) zwischen WT und TRPC1^{-/-} mPASC nach chronischer Hypoxie-Exposition beobachtet werden.

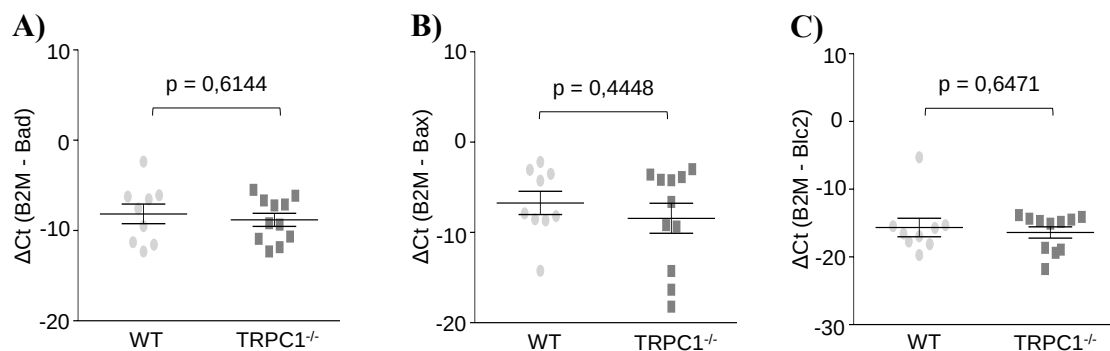


Abbildung 50: Einfluss von TRPC1 auf pro- und anti-apoptotische Genexpression in mPASC unter chronischer Hypoxie. Quantitative Untersuchung der relativen **A)** Bad-, **B)** Bax- und **C)** Bcl2- Expression nach 120 Stunden Hypoxie (1% O₂) in WT und TRPC1^{-/-} mPASC in Passage 0 untersucht mittels RTqPCR (jeweils n=9-11). Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das Fehlen von TRPC1 die in dieser Arbeit untersuchten Hypoxie-abhängigen molekulare Veränderungen nicht beeinflusst.

3.5.3 Einfluss von HIF-1 α auf die TRPC1-Expression

Die bisher erzielten Ergebnisse zeigen, dass chronische Hypoxie zur Hochregulation von TRPC1 führte. Chronische Hypoxie führt zur Stabilisierung von HIF-1 α in mPASC (**Abbildung 51A**). Um den Einfluss von HIF-1 α auf die TRPC1-Expression zu untersuchen, wurde HIF-1 α durch *knockdown* mit spezifischer siRNA inhibiert. Nach dem *knockdown* von

Ergebnisse

HIF-1 α (**Abbildung 51B**) in isolierten chronisch hypoxischen WT mPASCs war TRPC1 signifikant geringer exprimiert als in entsprechenden Kontroll-mPASCs (**Abbildung 51C**).

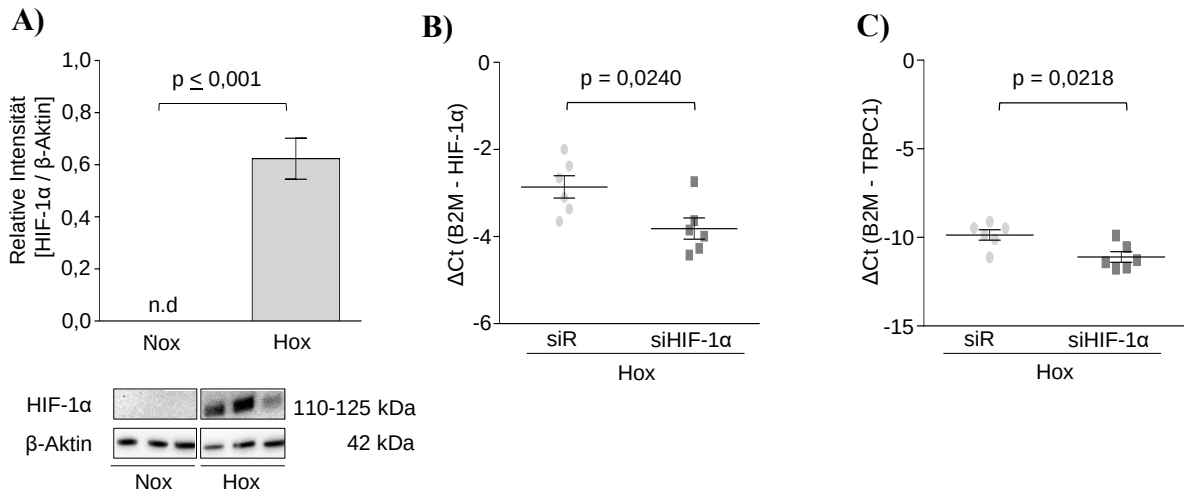


Abbildung 51: Effekt von HIF-1 α auf die TRPC1-Expression unter chronischer Hypoxie.

Untersuchung der relativen **A)** HIF-1 α Protein-Expression von mPASCs in Passage 1 nach 72 Stunden Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 1% O₂) quantifiziert mittels Western Blot (n=6). Repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung ist dargestellt. Untersuchung der relativen **B)** HIF-1 α und **C)** TRPC1 mRNA-Expression in mPASCs nach *knockdown* von HIF-1 α nach 72 Stunden Hox (n=6) quantifiziert mittels RTqPCR. Die mPASCs wurden zu Beginn mit einer siRNA gegen HIF-1 α (siHIF-1 α) oder mit einer Kontroll-siRNA (siR) transfiziert. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$; n.d.: nicht detektierbar.

Zudem wurde eine bioinformatische Untersuchung der Promoterregion 5000 Basenpaare *upstream* des Transkriptionsstartpunktes nach HIF-1 Bindestellen, den sogenannten *hypoxia responsive elements* (HRE), durchgeführt. Die Kernbindesequenz „cacgtggt“ konnte nicht nachgewiesen werden. Die Bindesequenz „acgt“ wurde neun Mal identifiziert (**Abbildung 52**).

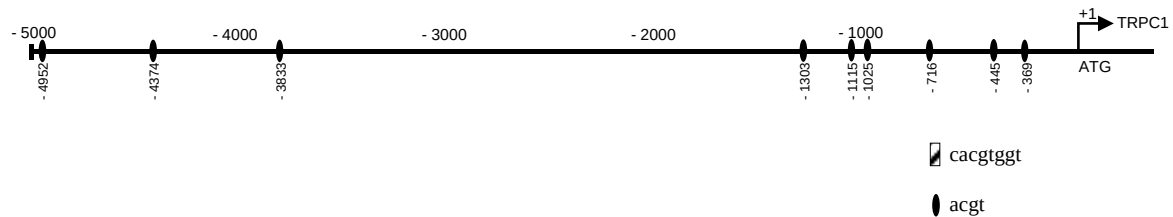


Abbildung 52: HRE-Bindestellen im TRPC1 Promotor.

Schematische Repräsentation der murinen TRPC1-Promotorregion mit potentiellen *hypoxia responsive elements* (HRE). Bindesequenz „cacgtggt“ ergab keine Bindestelle, während die Kernsequenz „acgt“ neun Bindestellen ergab. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

3.5.4 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die TRPC1-Expression

Die PH wird durch eine Mitogen-Wachstumsfaktor-Imbalance charakterisiert^{12; 123; 180; 181; 236–239; 242}.

Um den Mechanismus der TRPC1 Regulation weiter zu untersuchen, wurden WT mPASCs mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren stimuliert. Die Gabe von VEGF 120, VEGF 164 und

Ergebnisse

VEGF 188 sowie PDGF, EGF und IGF-1 zeigte keinen Einfluss auf die TRPC1-Expression (Abbildung 53).

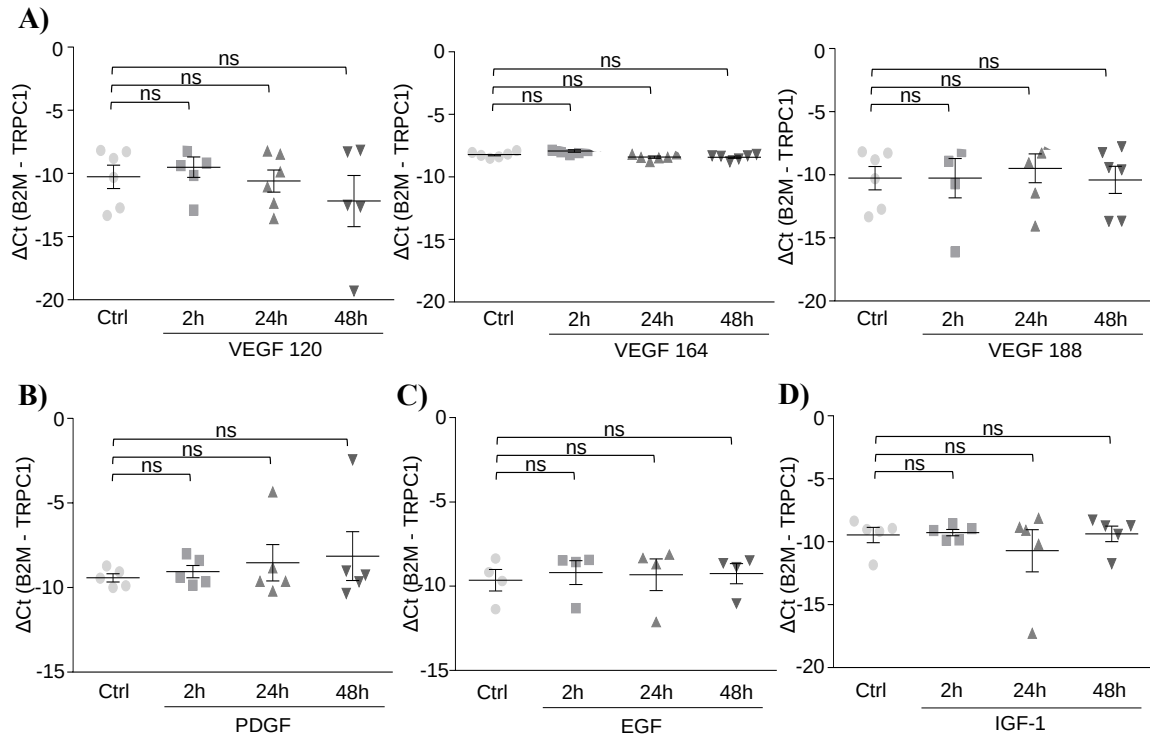


Abbildung 53: Einfluss von VEGF, PDGF, EGF und IGF-1 auf die TRPC1-Expression in mPASC.

Relative TRPC1 mRNA-Expression nach Stimulation von mPASC in Passage 2 mit **A)** VEGF 120, 164 oder 188 (20 ng/mL; n=4), **B)** IGF-1 (100 ng/mL; n=5), **C)** EGF (50 ng/mL; n=4) und **D)** PDGF (10 ng/mL; n=5) für die angegebenen Zeitpunkte untersucht mittels RTqPCR. ns: nicht signifikant; Ctrl: Kontrolle.

Die Stimulierung der WT mPASC mit TGF-β1 führte zu einem signifikanten Anstieg der TRPC1-Expression, während die Stimulierung mit TNFα zu einer Runterregulation von TRPC1 führte (Abbildung 54).

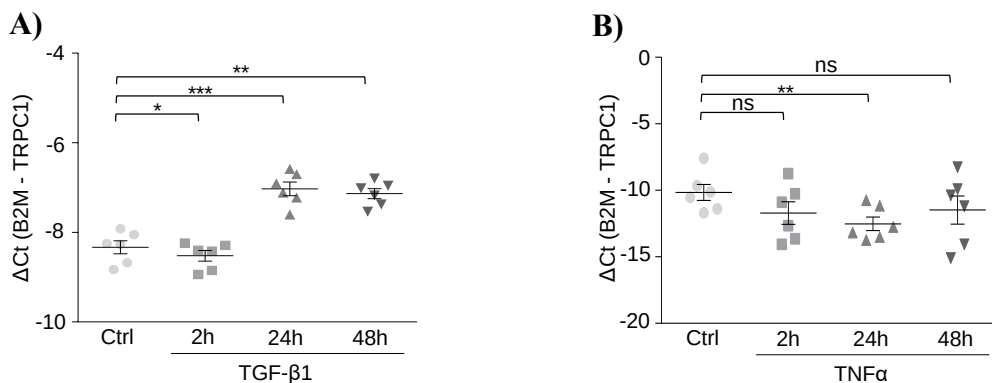


Abbildung 54: Einfluss von TGF-β1 und TNFα auf die TRPC1-Expression in mPASC.

Relative TRPC1 mRNA-Expression nach Stimulation von mPASC in Passage 2 mit **A)** TGF-β1 (5 ng/mL; n=6) und **B)** TNFα (20 ng/mL; n=3) für die angegebenen Zeitpunkte quantifiziert mittels RTqPCR. Signifikanter Unterschied, wenn * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) oder *** ($p \leq 0,001$); ns: nicht signifikant; Ctrl: Kontrolle.

Ergebnisse

Untersuchung der Produktion von TGF- β 1 und TNF α in homogenisierten WT Lungen und WT mPASMC zeigte keinen Unterschied zwischen der Produktion unter Normoxie als auch unter chronischer Hypoxie (**Abbildung 55A, B, D, E**). Darüber hinaus wurden M θ aus WT Mäusen isoliert und mit LPS stimuliert. Die M θ dienten als Positivkontrolle der endogenen Produktion von TNF α (**Abbildung 55C**). Die Untersuchung der Produktion von TGF- β 1 in isolierten mPAEC zeigte einen signifikanten Anstieg unter chronischer Hypoxie verglichen mit Normoxie und diente als Positivkontrolle der endogenen Produktion von TGF- β 1 (**Abbildung 55F**).

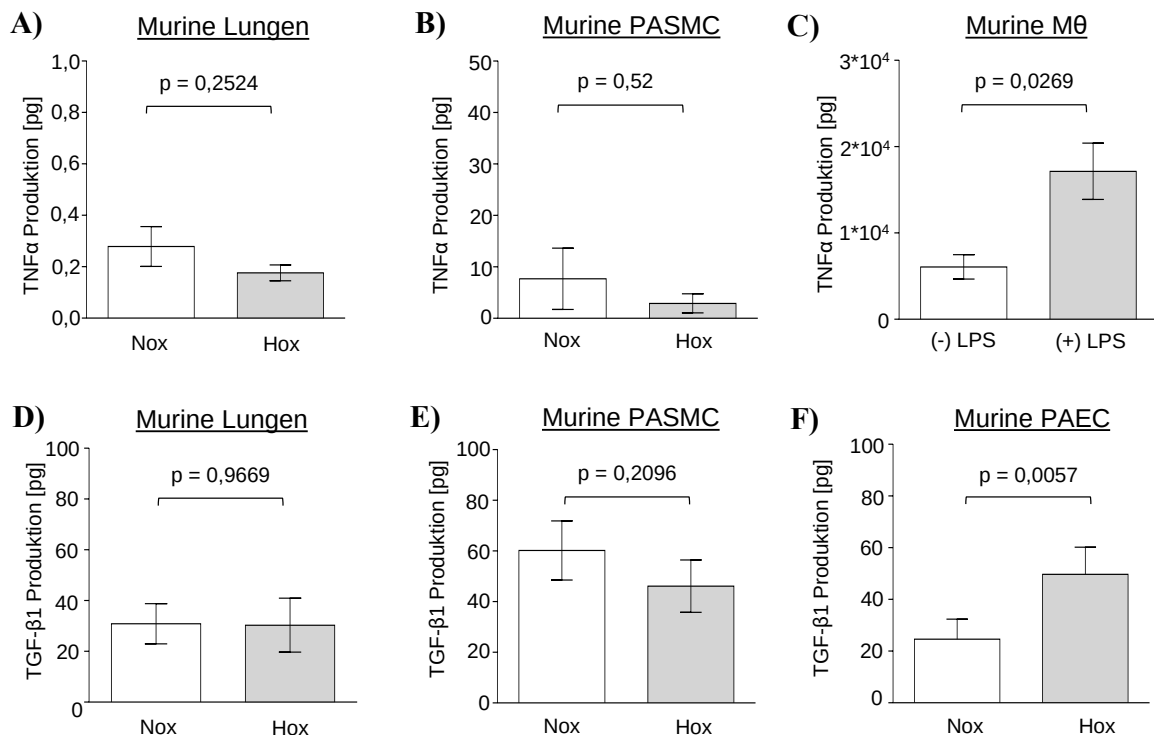


Abbildung 55: TNF- α und TGF- β 1 Produktion unter chronischer Hypoxie.

Quantitative Untersuchung der **A-C)** TNF- α und **D-F)** TGF- β 1 Produktion **A, D)** in homogenisierten Lungen aus WT Mäusen nach 21 Tagen Normoxie (Nox, 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 10% O₂) (n=5) und **B, E)** in mPASMC in Passage 0 nach 120 Stunden Nox (21% O₂) und Hox (1% O₂) (n=6). TNF- α Produktion in **C)** alveolaren Makrophagen (M θ) nach Stimulation mit Lipopolisaccharid (LPS; mit LPS: (+); ohne LPS (-)) (n=3) und TGF- β 1 Produktion in **F)** mPAEC nach 120 Stunden Nox (21% O₂) oder Hox (1% O₂) (n=6).

In folgenden wurde der *downstream*-Signalweg nach TGF- β 1-Stimulation genauer untersucht. Die Stimulierung der mPASMC führte zur Stabilisierung von HIF-1 α und zur Erhöhung der Cyclin D1 Protein-Expression (**Abbildung 56A, B**). Die Ki67 mRNA-Expression wurde durch TGF- β 1-Stimulierung hochreguliert (**Abbildung 56C**).

Ergebnisse

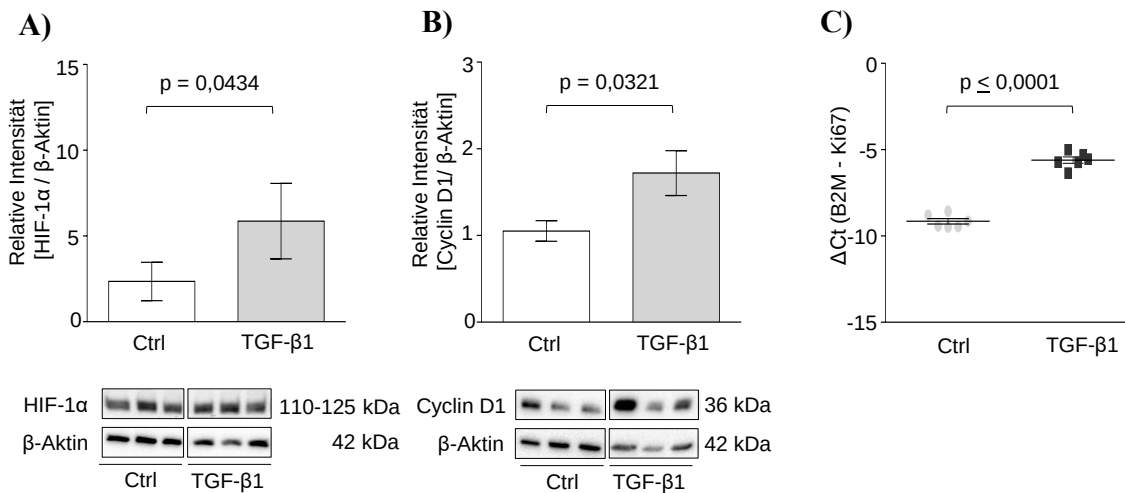


Abbildung 56: Einfluss von TGF-β1 Stimulation auf die HIF-1α Stabilität sowie Ki67- und Cyclin D1-Expression in mPASC unter chronischer Hypoxie.

Quantitative Untersuchung der HIF-1α, Cyclin D1 und Ki67 Expression nach TGF-β1-Stimulation (5 ng/mL) von mPASC unter Hypoxie (24 Stunden, 1% O₂). **A)** Relative HIF-1α (n=8) und **B)** Cyclin D1 (n=5) Protein-Expression untersucht mittels Western Blot Analyse. Ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung sind dargestellt. **C)** Relative Ki67 mRNA-Expression (n=6) untersucht mittels RTqPCR. Signifikanter Unterschied, wenn p ≤ 0,05.

Die Untersuchung von hypoxischen mPASC nach TGF-β1-Stimulation sowie nach *knockdown* von HIF-1α zeigte, dass die TGF-β1 Stimulation die Proliferation von mPASC induziert, während der HIF-1α *knockdown* zur Inhibierung der Proliferation führte. Der proliferative Effekt von TGF-β1 wurde durch HIF-1α *knockdown* inhibiert (**Abbildung 57**).

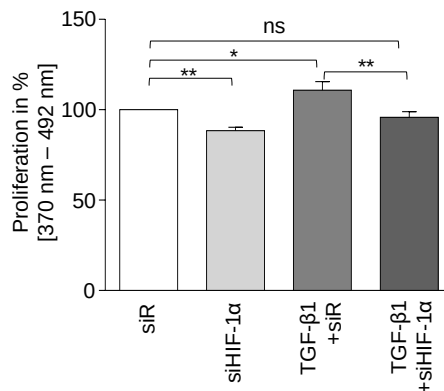


Abbildung 57: Einfluss von HIF-1α und TGF-β1 auf die Proliferation von mPASC unter chronischer Hypoxie.

Untersuchung des Proliferationsverhaltens von WT mPASC unter Hypoxie (1% O₂) mittels des Thymidin-Analogons 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU). Die mPASC wurden mit einer siRNA gegen HIF-1α (siHIF-1α) oder mit einer Kontroll-siRNA (siR) transfiziert sowie mit TGF-β1 (5 ng/mL) stimuliert und für 24 Stunden in Passage 1 unter Hox kultiviert (n=5-9). Die Daten wurden durch kolorimetrische Messung des Farbumschlags erzielt. Signifikanter Unterschied, wenn * (p ≤ 0,05) und ** (p ≤ 0,01); ns: nicht signifikant.

TGF-β1 führte in den stimulierten mPASC zur Dephosphorylierung von Smad2/3 sowie p38 und zur Phosphorylierung von Erk1/2 (**Abbildung 58**). Im Vergleich zu β-Aktin konnte

Ergebnisse

tendenziell eine erhöhte Phosphorylierung von p38 gezeigt werden, nicht jedoch von Smad2/3 oder Erk1/2.

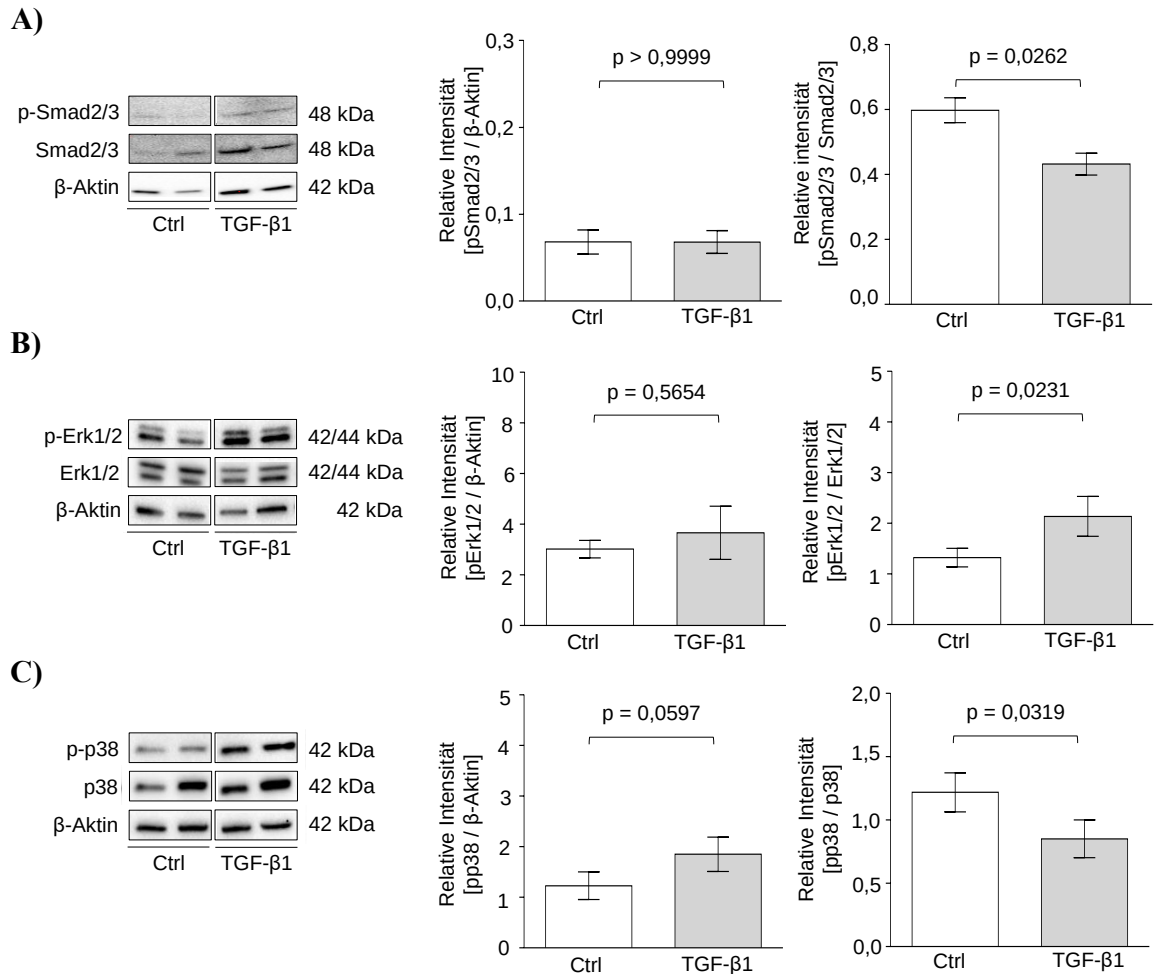


Abbildung 58: Einfluss von TGF-β1 auf die Phosphorylierung von Smad2/3, p38 und Erk1/2 in isolierten mPASC unter chronischer Hypoxie.

Quantitative Untersuchung der relativen **A)** Smad2/3, **B)** Erk1/2 und **C)** p38 Phosphorylierung (p-) nach TGF-β1-Stimulation (5 ng/mL) von WT mPASC in Hypoxie (24 Stunden, 1% O₂; n=5) quantifiziert mittels Western Blot Analyse. Repräsentativer Western Blots und die densitometrische Auswertungen sind dargestellt. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Schlussendlich wurde die Phosphorylierung von Smad2/3 unter chronischer Hypoxie in WT mPASC untersucht. Dabei zeigte sich eine tendenzielle Dephosphorylierung von Smad2/3 unter chronischer Hypoxie (**Abbildung 59A**) und kein Unterschied der Phosphorylierung zwischen hypoxischen mPASC isoliert aus TRPC1^{-/-} Mäusen verglichen mit WT mPASC (**Abbildung 59B**).

Ergebnisse

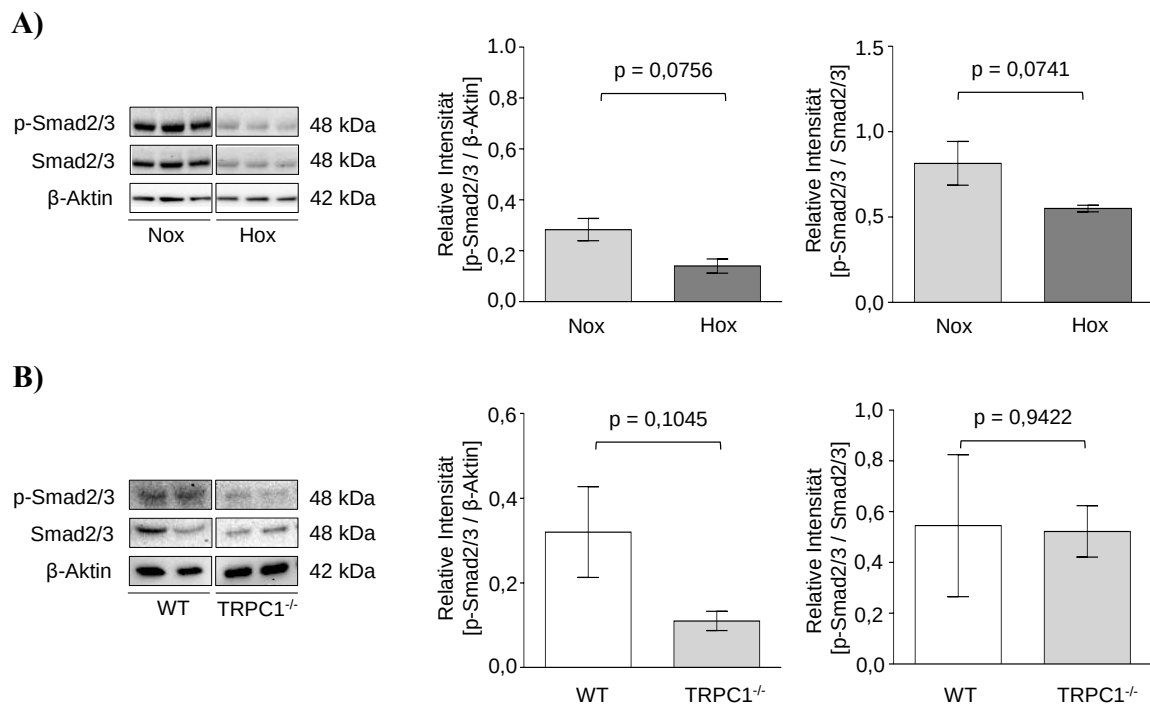


Abbildung 59: Effekt von chronischer Hypoxie sowie Einfluss von TRPC1 auf die Phosphorylierung von Smad2/3 in mPASC.

Quantitative Untersuchung der relativen Smad2/3 Phosphorylierung (p-) **A)** in WT mPASC nach 120 Stunden Normoxie (Nox 21% O₂) oder Hypoxie (Hox, 1% O₂) (n=5) sowie **B)** in WT und TRPC1^{-/-} mPASC (n=4) nach 120 Stunden Hox in Passage 0 quantifiziert mittels Western Blot Analyse. Repräsentative Western Blots und die densitometrischen Auswertungen sind dargestellt. Signifikanter Unterschied, wenn $p \leq 0,05$.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von TRPC1 durch HIF-1 α und TGF- β 1 induziert wird, wobei HIF-1 α durch TGF- β 1 stabilisiert wird. Außerdem wurde die mRNA-Expression von TRPC1 durch TNF α gehemmt.

4 Diskussion

Die CHPH ist eine Erkrankung, dessen pathologischer Mechanismus äußerst komplex ist. Die Pathogenese umfasst diverse Zelltypen und basiert auf der Interaktion verschiedener Signalwege, die simultan oder sukzessiv ablaufen. Die in der CHPH vorliegenden charakteristischen Veränderungen sind unter anderem mit einer veränderter Ca^{2+} -Homöostase assoziiert³⁷⁵. In diesem Zusammenhang wird in mehreren Studien die Rolle von TRP-Proteinen suggeriert, die als Kationenkanäle für den erhöhten Ca^{2+} -Einstrom³⁷⁰ und der damit einhergehenden erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der PH verantwortlich sein können.

4.1 Auswahl von TRPC1 als Kandidat in CHPH

In Lungengeweben von PH-Patienten^{8; 401}, in chronisch-hypoxischen Ratten und Mäusen^{76; 375; 303; 402; 403} sowie in distalen Pulmonalarterien von MCT-behandelten Ratten⁴⁰⁴, wurde eine hohe Expression von TRPC6 auf mRNA- und Protein-Ebene beobachtet. Obwohl TRPC6 in Mausversuchen essentiell für die akute Phase der HPV zu sein scheint, spielt TRPC6 in der anhaltenden Phase hingegen keine Rolle, während die Bedeutung in der CHPH weiterhin umstritten bleibt^{12; 76; 383; 405; 402}.

In dieser Arbeit wurde eine mögliche Rolle von weiteren TRPC-Proteinen in der CHPH untersucht. Um in Betracht kommende Kandidaten zu identifizieren, wurde die Genexpression von TRPC-Proteinen auf mRNA-Ebene zunächst in murinen Lungen untersucht, welche zeigte, dass TRPC1, TRPC3 und TRPC6 prominent exprimiert sind. Zusätzlich zeigte die Untersuchung von kleinen, mittleren und großen pulmonalen Gefäßen sowie Bronchien und Septen nach Laser-Mikrodissektion, dass TRPC1 im Vergleich zu TRPC3 und TRPC6 in den meisten Strukturen besonders hoch exprimiert ist. Eine Hypoxie-abhängige Regulation der untersuchten TRPCs in den pulmonalen Arterien konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden, obwohl dies zuvor für TRPC1 und TRPC6 beschrieben wurde³⁷⁵. Die unterschiedlichen Resultate beider Untersuchungen könnten sowohl Spezies-abhängige als auch Methoden-abhängige Ursachen haben (siehe Kapitel 4.4). Im Gegensatz zu Wang et al. wurden in dieser Arbeit homogenisierte Lungen und „intakte“ Gefäße untersucht, die aus verschiedenen Zelltypen bestehen⁴⁰⁶, was die mögliche Hypoxie-induzierte Regulationen in den einzelnen Zelltypen überdeckt haben könnte.

Da die erhöhte Proliferation der PASMC ein charakteristisches Merkmal der PH ist^{93; 171; 407; 408}, war die Analyse der TRPC-Expression in diesen Zellen von besonderem Interesse. Um einen Hypoxie-regulierten Kandidaten aus der TRPC-Subfamilie zu ermitteln, wurde die

Diskussion

mRNA-Expression einzelnen TRPC-Proteine in isolierten mPASMCM der Passage 2 überprüft. Dabei konnte zum einen dargelegt werden, dass TRPC1 und TRPC6 prominent exprimiert waren und zum anderen, dass die TRPC1-Expression durch Hypoxie induziert wurde. Diese Hypoxie-abhängige Regulation konnte in mPASMCM sowohl in der Passage 0 als auch in der Passage 1 mittels RTqPCR bestätigt werden. Zudem konnte in einer cDNA-Microarray-Analyse gezeigt werden, dass die TRPC1-Expression durch chronische Hypoxie induziert wurde. Des Weiteren waren in der cDNA-Microarray-Analyse nur TRPC1 und TRPC6 detektiert worden, während andere TRPCs durch ihre geringe Expression nicht detektierbar waren. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit eine Hochregulation von TRPC1 in Folge der chronischen Hypoxie-Exposition sowohl in humanen als auch in Ratten PASMCM gezeigt werden. Die Hypoxie-induzierte Expression von TRPC1 konnte auch in anderen Studien in mPASMCM⁷⁶ und rPASMCM^{375; 303; 403; 405; 409; 410} beobachtet werden und impliziert eine Relevanz von TRPC1 in unterschiedlichen Spezies. Allerdings gibt es keine vergleichbaren Studien an hPASMCM.

In der vorliegenden Arbeit konnte, im Gegensatz zu anderen Studien^{76; 402}, keine Hypoxie-abhängige TRPC6-Expression in mPASMCM gezeigt werden. Allerdings wurde die TRPC6-Expression lediglich in Passage 1 und Passage 2 nach 72 Stunden Hypoxie untersucht und schließt eine Regulation in Passage 0 nicht aus. Zudem ist es möglich, dass 72 Stunden Hypoxie-Exposition nicht ausreichen, um eine TRPC6-Expression zu induzieren. Eine Verifizierung der Hypoxie-abhängigen TRPC1-Induktion auf Proteinebene konnte nicht erbracht werden. Die Überprüfung diverser TRPC1-Antikörpern legte offen, dass spezifische Antikörper gegen murines TRPC1 derzeit nicht verfügbar sind^{332; 383}.

4.2 Rolle von TRPC1 *in vivo* und *in vitro*

4.2.1 Rolle von TRPC1 *in vivo*

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Bedeutung von TRPC1 in der HPV und der CHPH *in vivo* untersucht. Hierbei konnte die Relevanz von TRPC1 im Mechanismus der HPV ausgeschlossen werden. Das Fehlen von TRPC1 führte nicht zur Veränderung der biphasischen Vasokonstriktion nach akuter und anhaltender Hypoxie. Im Gegensatz dazu führte das Fehlen von TRPC1 unter chronischer Hypoxie zu einem signifikant verminderten Anstieg des RVSP sowie einer signifikant verringerten Muskularisierung von kleinen pulmonalen Gefäßen im Vergleich zu WT Mäusen. Die TRPC1^{-/-} Tiere waren in dieser Arbeit partiell vor der PH geschützt, was auch in einer Studie von Xia et al.⁷⁶ bestätigt wurde.

Diskussion

Ein weiteres klinisches Merkmal der PH ist die Entwicklung der Rechtsherzhypertrophie, welche durch den *knockout* von TRPC1 nicht beeinflusst wurde. Diese Beobachtung könnte zwei Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass die Rechtsherzhypertrophie in TRPC1^{-/-} Mäusen unabhängig vom erhöhten PAP direkt durch Hypoxie ausgelöst wird. Zum anderen könnte der in hypoxischen TRPC1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen verminderte RVSP sekundär in Folge einer Rechtsherzdekompensation entstehen, die das Herzzeitvolumen reduziert. Diesbezüglich könnte TRPC1 im rechten die gleiche Rolle wie im linken Herzen spielen, wo ebenfalls eine Hochregulation von TRPC1 in Ratten beobachtet wurde⁴¹¹. Die Rolle von TRPC1 in hypertrophen Signalwegen in Kardiomyozyten, welche zu Linksherzhypertrophie und schließlich zum Linksherzversagen führen, wurde bereits gezeigt⁴¹². Xia et al.⁷⁶ konnte im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen eine verminderte Rechtsherzhypertrophie in TRPC1^{-/-} Mäusen beobachten. Allerdings wurde in dieser Studie eine hohe Tieranzahl verwendet, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird auch kleinere Unterschiede zwischen WT und TRPC1^{-/-} Mäusen zu detektieren. Des Weiteren konnte Xia et al.⁷⁶ in TRPC6^{-/-} Mäusen zeigen, dass sich Rechtsherzhypertrophie auch im späteren Verlauf entwickeln kann und Mäuse nur in der frühen Phase der Hypoxie-Exposition geschützt sind. Ein solcher Mechanismus könnte in TRPC1^{-/-} Mäusen theoretisch auch denkbar sein. Letztendlich verwendete Xia. et al.⁷⁶ in seiner Studie nur männliche Mäuse, während in der vorliegenden Arbeit beide Geschlechter verwendet wurden. Es ist bekannt, dass es im Menschen zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der PH Ausprägung kommen kann. So leiden Frauen häufiger an PH und unter einer schwereren Form der PH als Männer^{413; 414}. Zusätzlich wurden Polymorphismen im TRPC6-Promotor nachgewiesen, die den Schweregrad der IPAH beeinflussten und bei Männern häufiger auftreten⁴¹⁵. Ob es in Mäusen zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Ausprägung der PH kommen kann, ist in der Literatur bislang jedoch nicht untersucht worden.

4.2.2 Rolle von TRPC1 *in vitro*

Um die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Effekte von TRPC1 auf das Gefäßsystem zu erklären, wurden präkapillare mPASMCM nach Hypoxie-Exposition näher charakterisiert. Da in dem Mechanismus des pulmonalvaskulären Gefäßumbaus der PH Veränderungen in der Proliferation, der Migration sowie der Apoptose zugrunde liegen^{93; 152; 172–174; 399}, wurde der Einfluss von TRPC1 auf diese Vorgänge untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRPC1 in der chronisch Hypoxie-induzierten Proliferation von mPASMCM relevant ist, da der *knockout* von TRPC1 zu einer

Diskussion

verminderten Proliferation führte. Allerdings konnte keine vollständige Hemmung der chronisch Hypoxie-induzierten Proliferation beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass dieser Prozess multifaktoriell ist. Die in dieser Arbeit durchgeführte cDNA-Microarray-Analyse zeigte eine generell starke Regulation des Zellzyklus-assoziierten Signalweges in mPASC und nach chronischer Hypoxie-Exposition (siehe Anhang **Abbildung 63**). So wurde die Expression der Proliferation-assoziierten Proteine Cyclin D1 und Ki67 in mPASC und in homogenisierten Mäuslungen durch chronische Hypoxie induziert, nicht jedoch durch den TRPC1-Verlust beeinflusst. Daraus kann konkludiert werden, dass Cyclin D1- und/oder Ki67-assoziierte Signalwege trotz TRPC1 *knockouts/knockdowns* durch chronische Hypoxie aktiviert werden, wodurch es zur Hypoxie-induzierten Proliferation kommt. Gleiches gilt auch für die basale Proliferationsrate unter Normoxie. Sie ist nicht durch den *knockdown/knockout* von TRPC1 beeinflusst. Entweder ist die TRPC1-Expression unter Normoxie zu gering um Einfluss zu nehmen oder der Proliferationsprozess wird unter Normoxie durch andere proliferative Mechanismen gesteuert. Ebenso ist es möglich, dass TRPC1 in normalen physiologischen Prozessen keine große Rolle spielt³⁷⁰. Eine potentielle Rolle von TRPC1 in der Zellproliferation wird von zuvor veröffentlichten Ergebnissen im Zusammenhang mit Brustkrebs⁴¹⁶, Eierstockkrebs⁴¹⁷, der Proliferation von hPASC⁴¹⁸ und endothelialer Progenitorzellen⁴¹⁹ unterstützt.

Die Migration ist ein weiterer Mechanismus, der zum Gefäßumbau der PH beiträgt und zur Neovaskularisierung von nicht- oder partiell-muskularisierten pulmonalen Gefäßen führt^{172-174; 399}. Der Verlust von TRPC1 in mPASC führte zur vollständigen Inhibition der Hypoxie-induzierten Migration, während die Migration unter Normoxie durch den *knockout* nicht beeinflusst wurde. Anhand der durchgeführten Versuche kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die TRPC1^{-/-} mPASC nur vermindert und/oder ungerichtet migrieren. In Myoblasten⁴²⁰ und Nierenepithelzellen⁴²¹ konnte ein Einfluss von TRPC1 auf die gerichtete Migration gezeigt werden. Während TRPC1 in Nervenzellen eine inhibierende Wirkung auf die Migration³⁴⁴ zeigt, konnte in Skelettmyoblasten⁴²⁰ und endothelialen Progenitorzellen⁴¹⁹ eine induzierende Wirkung beobachtet werden. Der der Migration zugrundeliegende Mechanismus ist äußerst komplex und bisher nicht vollständig geklärt. Die Migration hängt von der Interaktion interner (molekularer) und externer (physikalischer) Faktoren und Signalwege ab⁴²². Als molekulare Faktoren steuern Wachstumsfaktoren wie PDGF^{423; 424}, TGF- β ⁴²⁴, VEGF und AngII⁴²⁵ die Migration. Als physikalische Faktoren sind Druck⁴²⁶ und Scherstress^{427; 428} zu nennen. Außerdem ist die Interaktion von EC und SMC für die Migration relevant⁴²⁸. Dies kann zu Unterschieden zwischen verschiedenen Zelltypen führen.

Diskussion

Mit der Proliferation und Migration von SMC ist der Phänotyp assoziiert, der kontraktile oder synthetisch/proliferativ sein kann^{425; 429–431}. Die Änderung des Phänotyps wird durch mehrere Faktoren^{429; 432} wie extrazelluläre Matrixproteine^{433; 434}, Wachstumsfaktoren wie PDGF⁴³⁵ und TGF- β ⁴³⁶, Scherstress⁴³⁷ sowie ROS⁴³⁸ beeinflusst. Außerdem ist der Phänotyp der SMC durch das Expressionsmuster einiger Proteine charakterisiert^{425; 431}. So kommt es während der Änderung vom kontraktilem zum synthetischen/proliferativen Phänotyp zur erhöhten Expression von extrazellulären Matrixproteinen^{439–441}, die mit Zelladhäsion zusammenhängen und charakteristisch für die Veränderungen in der PH sind. Zusätzlich kommt es zum Verlust von Proteinen wie Myosin, Tropomyosin und α -SMA, die mit der Kontraktion von SMC assoziiert sind^{430; 431}. In der vorliegenden Arbeit konnte der Wechsel vom kontraktilem zum synthetischen Phänotyp anhand der reduzierten Expression von α -SMA in den mPASMC gezeigt werden. Durch das Fehlen von TRPC1 wurde die Expression von α -SMA und somit die Änderung zum synthetischen/proliferativen Phänotyp nicht beeinflusst, obwohl Ionenkanäle für den Phänotyp-Wechsel wichtig sind. So wurde bereits eine Rolle von TRPC6 im Phänotyp-Wechsel in rPASMC nachgewiesen⁴³¹. Außerdem sind die VDCC beim synthetischen/proliferativen Phänotyp von Bedeutung. Die VDCC bilden eine Familie von Ca^{2+} -Kanälen, die in vier Subfamilien, L-, N-, P/Q- und R-Typ, gegliedert werden können⁴⁴². Die L-Typ VDCC, welche durch eine langsame Inaktivierung charakterisiert sind (*longlasting*, L), werden im synthetischen verglichen mit dem kontraktilem Phänotyp, vermindert exprimiert, während die T-Typ VDCC, welche durch geringe Depolarisation aktiv werden, verstärkt exprimiert und somit die L-Typ VDCC ersetzen könnten⁴⁴³. T-Typ VDCC sind in humanen pulmonalen Arterien⁴⁴⁴ exprimiert und in pulmonalen Arterien aus chronisch Hypoxie-exponierten Mäusen hochreguliert⁴⁴⁵. Sie spielen sowohl in der Zellproliferation⁴⁴⁴ als auch in der Zellkontraktion⁴⁴⁵ eine Rolle. Es ist allerdings bisher nicht bekannt, ob eine Aktivierung von T-Typ VDCC durch TRPC-Kanäle möglich ist. Da TRPC1^{-/-} Mäuse nur teilweise vor CHPH geschützt sind, ist es vorstellbar, dass andere Ionenkanäle⁴⁴⁶ unabhängig von TRPC1 zur Entstehung der PH beitragen.

Letztendlich ist der Gefäßumbau während der PH mit einer verminderten Apoptose der PASMC assoziiert^{447; 448}. Der Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Apoptoserate der mPASMC konnte in dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht untersucht werden. Um die Apoptoserate zwischen normoxisch- und hypoxisch-kultivierten mPASMC vergleichen zu können, müssen gleiche Zellzahlen zum Zeitpunkt der Messung vorliegen. Da chronische Hypoxie die Proliferation von mPASMC induziert, ist eine Vergleichbarkeit des Apoptose-Signals zwischen normoxischen und hypoxischen mPASMC nicht aussagekräftig. Aus diesem Grund wurde

Diskussion

lediglich der Einfluss von TRPC1 auf die Apoptose unter Normoxie oder unter Hypoxie im Vergleich zu WT mPASC unter untersucht, wobei keine Relevanz von TRPC1 für die Apoptose festgestellt werden konnte. Die Analyse der Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen auf mRNA-Ebene zeigte hingegen, dass das Apoptose-assoziierte Protein Bax unter chronischer Hypoxie vermindert exprimiert wurde, was auf eine gesenkte Apoptoserate von mPASC unter chronischer Hypoxie hindeutet. Eine mögliche Rolle von TRPC1 in der Apoptose konnte in der Analyse der Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend stehen die in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Migration und zur Proliferation der mPASC im Einklang mit den *in vivo* Resultaten. Die chronische Hypoxie resultierte in der gesteigerten Migration und Proliferation und vermutlich mit einer gesenkten Apoptose, was den Anstieg der Muskularisierung und des RVSP erklären könnte. Der Verlust von TRPC1 verminderte die Proliferation sowie die Migration der mPASC, was sich *in vivo* in einer reduzierten Muskularisierung der Gefäße manifestiert haben könnte (**Abbildung 60**).

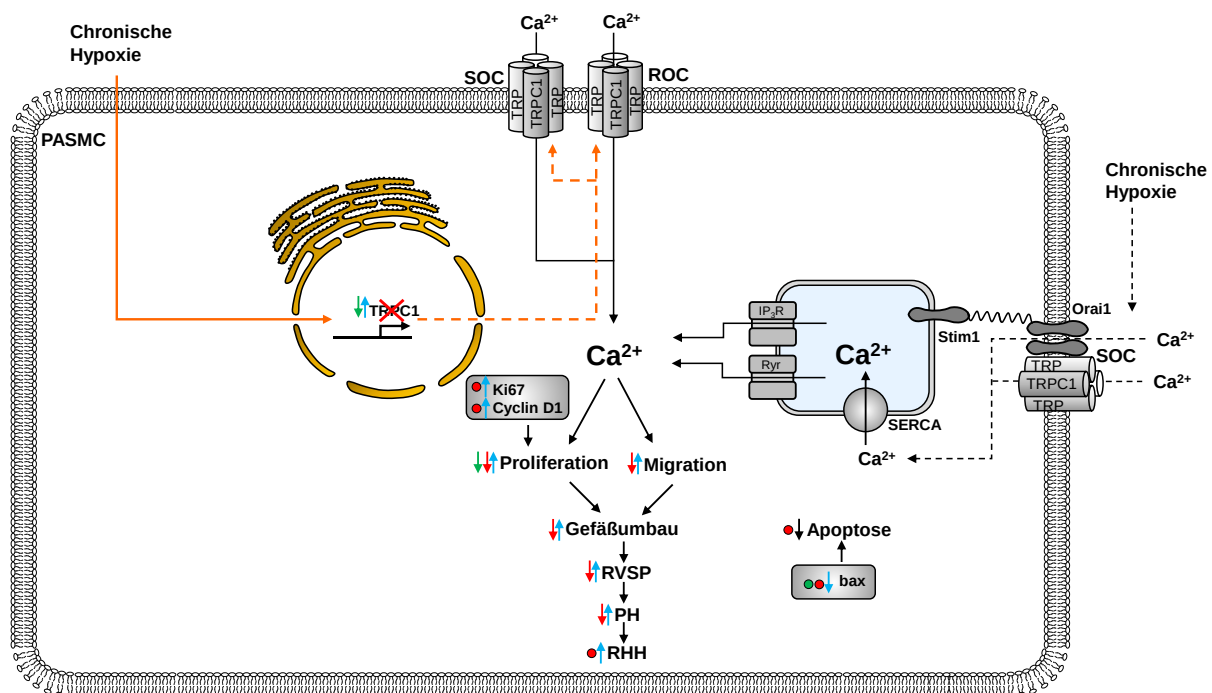


Abbildung 60: Einfluss TRPC1 auf die Entstehung der CHPH.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch chronische Hypoxie die Expression des klassischen *transient receptor potential 1* (TRPC1)-Kanals in pulmonalerteriellen glatten Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cells*, PASC) und die Expression von Cyclin D1 und Ki67 induziert, während die Expression von Bax gehemmt wird (blaue Pfeile). Durch das Fehlen von TRPC1 durch *knockdown* (grüner Pfeil) und/oder *knockout* (roter Pfeil) wurde die Proliferation und die Migration der mPASC gesenkt. Ein Einfluss von TRPC1 auf die Apoptoserate sowie auf die Expression von Cyclin D1, Ki67 und Bax konnte nicht beobachtet werden (grüner/roter Punkt). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in TRPC1^{-/-} Mäusen das Fehlen von TRPC1 zum verminderten Gefäßumbau und zum gesenkten rechtsventrikulären systolischen Druck (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) führt, wodurch die pulmonale Hypertonie (PH) vermindert wird. Die Rechtsherzhypertrophie (RHH) bleibt

Diskussion

unbeeinflusst. IP₃R: Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor; stim1: *stromal interaction molecule 1* (Stromales Interaktionsmolekül 1); Orai1: *Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel protein 1* (Ca²⁺ aktivierbares Ca²⁺-Kanalprotein 1); ROC: *receptor-operated channel* (Rezeptor-aktivierbarer Kanal); Ryr: Ryanodine Rezeptor; SERCA: *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (Ca²⁺-Pumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums); SOC: *store-operated channel* (Speicher-aktivierbarer Kanal); TRP: *transient receptor potential*; orange Pfeile: in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Signalwege; schwarze Pfeile: in der Literatur beschriebene Signalwege; gestrichelte Pfeile: nicht völlig entschlüsselte molekulare Signalwege; Pfeil nach oben: Erhöhung; Pfeil nach unten: Senkung; Punkt: kein Unterschied; rot: *knockout*; grün: *knockdown*; blau: Hypoxie-Effekt; schwarz: in der Literatur beschrieben.

4.3 Aufklärung des Signalweges in der Hypoxie-induzierten Proliferation der mPASMC

In der Funktionsweise von TRPC1 kommt es wahrscheinlich zu einer komplexen Interaktion von diversen Signalwegen, die letztendlich die Proliferation und die Migration beeinflussen. In dieser Arbeit wurden drei Aspekte untersucht, um den TRPC1-assoziierten Mechanismus zu charakterisieren: 1) die Aktivierung von TRPC1-assoziierten Kationenkanälen, 2) der *downstream*-Signalweg und 3) der *upstream*-Signalweg.

4.3.1 Die Aktivierung von TRPC1-assoziierten Kationenkanälen

Die Ca²⁺-Homöostase ist im Zusammenhang mit der CHPH von zentraler Bedeutung^{29; 295; 299; 311}. Ca²⁺ ist nicht nur wichtig für die Proliferation sowie den Zellwachstum⁴⁴⁹ der PASMC, sondern auch für die Regulation der Genexpression durch Ca²⁺-regulierte Transkriptionsfaktoren^{309; 450}.

Die Relevanz von TRPC1 im Ca²⁺-Einstrom und der Zellproliferation wurde durch viele Studien in vaskulären SMC^{443; 451} und Krebszelllinien^{452; 453} gezeigt. Im Gegensatz zu anderen TRPC-Proteinen ist die Funktion von TRPC1 als Ionenkanal umstritten⁴⁵⁴. Das Heterolog exprimierte TRPC1 wird nur schwach als Homomer in die Plasmamembran³⁴² eingebaut. Wahrscheinlich wirkt TRPC1 physiologisch daher nicht für sich alleine, sondern als Linker- oder Regulatorprotein in anderen funktionellen tetrameren TRPC-Kanälen^{332; 344}. Da es keine hochspezifischen TRPC1-Antikörper gibt, welche native TRPC1-Kanäle in primären murine Zellen detektieren können, ist die Identifizierung von funktionellen TRPC1-assoziierten TRPC-Kanälen in der Plasmamembran bisher nicht möglich.

Wie eingangs beschrieben, können TRPCs als ROC^{341; 345; 346; 360; 361} oder SOC^{341; 345; 346; 360–363} in der Ca²⁺-Homöostase eine Rolle spielen^{8; 29; 326; 375}. Um die Relevanz von TRPC1 im Ca²⁺-Haushalt der CHPH zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktion von TRPC1-assoziierten Kationenkanälen als SOC und als ROC analysiert.

Diskussion

Der SOC-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) wurde mit Hilfe der Substanz CPA induziert. CPA inhibiert die Ca^{2+} -Pumpe SERCA, welche unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich Ca^{2+} aus dem Zytoplasma in den intrazellulären Speicher pumpt. Das Inhibieren der SERCA führt durch kontinuierliches Entweichen von Ca^{2+} -Ionen zur Entleerung des Speichers, welches über verschiedene Wege die Aktivierung des SOCE vermittelt^{19; 26; 61–64}. In der vorliegenden Arbeit wurde kein Unterschied in der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in WT mPASCs nach chronischer Hypoxie im Vergleich zur Normoxie beobachtet, obwohl in einigen Studien eine höhere basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Hypoxie gezeigt werden konnte^{173; 455}. Diese Diskrepanz könnte zum einen durch methodische Unterschiede verursacht sein (siehe Kapitel 4.4). Zum anderen wird bei der Verwendung von Fura2-AM die Konzentration der freien Ca^{2+} -Ionen in der Zelle gemessen. So ist es denkbar, dass freie Ca^{2+} -Ionen durch Ca^{2+} -bindenden Proteinen, wie Calmodulin, Calretinin und Calcineurin, unter Hypoxie vermehrt gebunden sind^{456; 457}. So wurde bereits gezeigt, dass TGF- β 1, dessen Expression in PASCs aus IPAH Patienten sowie in Mäusen nach chronischer Hypoxie-Exposition induziert wird²³⁴, die Expression von Calcineurin in Ratten FB hochreguliert⁴⁵⁸. Dies würde erklären, dass in den eigenen Untersuchungen kein Unterschied in der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beobachtet werden konnte.

Weiterhin konnten keine Unterschiede in der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oder der Ca^{2+} -Einstromgeschwindigkeit in WT mPASCs nach chronischer Hypoxie im Vergleich zur Normoxie nach CPA-Gabe beobachtet. Dies weist darauf hin, dass die Anzahl der SOC durch Hypoxie nicht verändert ist und es zu keinem erhöhten SOC-vermittelten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Hypoxie kommt. Der Vergleich des relativen maximalen Ca^{2+} -Einstroms zwischen normoxischen und hypoxischen mPASCs lässt schlussfolgern, dass chronische Hypoxie möglicherweise eine inhibierende Wirkung auf den SOCE hat. Die Relevanz des SOCE auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter chronischer Hypoxie wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die meisten Studien konnten einen wichtigen Beitrag von SOC auf die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in chronischer Hypoxie zeigen^{303; 353; 418; 459}. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten lediglich durch die Resultate einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt werden⁴⁶⁰, welche zeigen konnte, dass SOCE nach chronischer Hypoxie reduziert war. Allerdings wurden in dieser Studie unter anderem intrapulmonale Arterien mit einem Durchmesser von 100 bis 300 μm nach Entfernen des Endothels aus chronisch hypoxischen Ratten verwendet. Dieser und weitere methodische Unterschiede erschweren den Vergleich zwischen verschiedenen Studien, worauf im weiteren Verlauf eingegangen wird (siehe Kapitel 4.4).

Der *knockout* von TRPC1 zeigte keinen Einfluss auf die gemessenen Parameter nach CPA-Gabe im Vergleich zu WT mPASCs unter chronischer Hypoxie. Dies lässt darauf schließen,

Diskussion

dass der TRPC1-assoziierte Kationenkanal in chronischer Hypoxie keine SOC bildet. Diese Theorie wird durch eine weitere Studie bestätigt³⁴⁴.

Um die Funktion von TRPC1-assoziierten Kationenkanälen als ROC in chronisch Hypoxie-exponierten PASMC zu untersuchen, wurden mPASMC mit OAG, einem DAG-Analogon, stimuliert. Die Nutzung von OAG an Stelle von DAG ermöglicht die Untersuchung der ROC-Aktivierung unabhängig von anderen Signalwegen (z. B. IP₃-vermittelte Speicherentleerung, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen) und von unterschiedlichen Agonisten (z. B. ET-1⁴⁶¹, AngII⁴⁶²), von der Synthese von DAG durch PLC oder DAG-Lipasen⁴⁶³ und vom Abbau von DAG durch DAG-Kinasen sowie von der Rezeptorexpression und -aktivität^{248; 249}, die durch Hypoxie reguliert sein kann. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass OAG trotz Analogie zu DAG, die gleichen Kanäle und in der gleichen Weise wie DAG aktiviert.

Der Vergleich der basalen $[Ca^{2+}]_i$ zwischen normoxischen und chronisch hypoxischen WT mPASMC zeigte ebenfalls keinen Unterschied. Weiterhin konnte auch kein Unterschied in der maximalen $[Ca^{2+}]_i$ nach ROC-Aktivierung durch OAG beobachtet werden. Wie bereits erörtert ist es denkbar, dass schnelle Änderungen der Einstromgeschwindigkeit von Ca^{2+} durch Fura2-AM gemessen werden können, dass aber die einströmenden Ca^{2+} -Ionen intrazellulär durch Ca^{2+} -bindenden Proteinen, welche unter Hypoxie vermehrt exprimiert oder aktiviert sein könnte, schnell gebunden werden^{456; 457}. Dies könnte erklären, warum in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ und in der maximalen $[Ca^{2+}]_i$ nach CPA- und OAG-Gabe keine Unterschiede in der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen werden konnten. Unter chronischer Hypoxie kommt es allerdings zu einer signifikant erhöhten Ca^{2+} -Einstromgeschwindigkeit, was auf eine höhere Anzahl an aktivierten ROC in der Membran schließen lässt. Lin. et al.³⁰³ konnten ebenfalls eine Relevanz von ROCE unter chronischer Hypoxie in isolierten rPASMC zeigen. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, konnte diese Arbeitsgruppe jedoch auch einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom über SOC beobachten. Diese Unterschiede könnten methodische Ursachen haben. Zum einen wurden die Ca^{2+} -Messungen mit Hilfe der Mangan-Quenching Methode mit Fluo-3-AM³⁰³ durchgeführt, was möglicherweise eine genauere Methode darstellen könnte als die Messung mit Fura2-AM. Zum anderen verwendete diese Arbeitsgruppe mPASMC aus normobaren Ratten nach Normoxie und Hypoxie. Diese rPASMC wurden lediglich für 16 bis 24 Stunden unter 4% O₂ kultiviert³⁰³. Es ist zu hinterfragen, ob dieser Hypoxie-Stimulus stark genug ist, da in anderen Studien gezeigt wurde, dass 4% O₂ nicht ausreichen um HIF-1 α zu stabilisieren⁴⁶⁴ und auch keinen Effekt auf die Expression anderer Gene hat⁴⁶⁵. Lin et al. schlussfolgerten zudem, dass TRPC6 für den ROCE und TRPC1 für den SOCE verantwortlich seien³⁰³. Die Ergebnisse

Diskussion

wurden mit Hilfe von siRNA erzielt, deren Effizienz auf der Untersuchung von Western Blots basierte, die mit Antikörpern durchgeführt wurden, welche nach neusten Erkenntnisstand unspezifisch zu sein scheinen^{332; 383}.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen vergleichenden Analysen zwischen WT und TRPC1^{-/-} mPASMCMC unter chronischer Hypoxie zeigte, dass das Fehlen von TRPC1 zu einer gesenkten basalen und maximalen $[Ca^{2+}]_i$ führte. Der relative Vergleich von basaler und maximaler $[Ca^{2+}]_i$, zeigte jedoch keinen Unterschied. Dies könnte darauf hindeuten, dass trotz des Fehlens von TRPC1-assoziierten ROC andere TRPC1-nicht-assoziierte ROC durch OAG aktiviert werden und unter chronischer Hypoxie, verglichen mit der basalen $[Ca^{2+}]_i$, die gleiche Menge an Ca^{2+} leiten, wie in WT mPASMCMC TRPC1-assoziierte und TRPC1-nicht-assoziierte ROC. Des Weiteren führte der Verlust von TRPC1 zu einer signifikant verminderten Ca^{2+} -Einstromgeschwindigkeit. Dies lässt schlussfolgern, dass TRPC1 eine Rolle als ROC unter chronischer Hypoxie einnimmt. Über die Rolle von TRPC1 als ROC in PASMCMC unter Normoxie und/oder Hypoxie ist wenig bekannt. Lediglich in humanen T-Zellen aus der Milz konnte der OAG-induzierte Ca^{2+} -Einstrom auf TRPC1-assoziierte ROC zurückgeführt werden⁴⁶⁶. In humanen ML-1 Schilddrüsenkrebszellen konnte ebenfalls eine Funktion von TRPC1 als ROC gezeigt werden⁴⁵³.

Man sollte berücksichtigen, dass es schwierig ist, den SOCE und den ROCE getrennt voneinander zu untersuchen. Zum einen werden bei der PLC-vermittelte Hydrolyse von PIP_2 ²¹ DAG und IP_3 generiert, wodurch sowohl ROC als auch SOC aktiviert werden können. Zum Anderen gibt es Hinweise, dass TRPC-Kanäle sowohl als SOC als auch als ROC in Abhängigkeit vom Expressionslevel agieren können⁴⁶⁷. Andere Studien lassen auch vermuten, dass die Funktionsweise von TRPC1 als SOC oder ROC durch Stim1 bestimmt sein könnte^{46; 468}. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Caveolin-1 die Funktion von SOC im Zusammenhang mit IPAH beeinflusst⁴⁶⁹, was durch die Interaktion von Caveolin-1 und TRPC1 vermittelt sein könnte³⁵⁹. Diese unter andere Mechanismen könnten die beschriebenen Unterschiede zwischen verschiedenen Studien der Analyse von SOCE und ROCE erklären. Die Diskrepanzen in den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen könnte des Weiteren durch nicht standardisierte Versuchsbedingungen verursacht worden sein. So wurden PASMCMC aus Arterien ohne Endothel⁴⁶⁰ oder mit intaktem Endothel gemessen³⁰³, es wurden unterschiedliche Gefäßabschnitte in den verschiedenen Studien (intrapulmonale Arterien der Ratte mit einem Durchmesser von 300 μm bis 800 μm ³⁰³ und mit einem Durchmesser von 100 μm bis 300 μm ⁴⁶⁰) untersucht, welche sich durch unterschiedliche Expressionsprofile und Phänotypen an PASMCMC^{470; 471} auszeichnen könnten. Des Weiteren könnten methodische Unterschiede in

der Zellisolation relevant sein wie z. B. die Isolation der PASMC mit und ohne enzymatischen Verdau^{303; 460}, das Alter der Zellen zum Zeitpunkt des Versuch und die Qualität der Hypoxie (Dauer, pO₂, Ausschluss der Reoxygenierung etc.). In dieser Arbeit wurde beispielsweise durchgängig sichergestellt die chronisch Hypoxie-exponierten PASMC nicht zu reoxygenieren. Inwiefern andere Studien unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wurden, kann nicht immer beurteilt werden. Die Wahl des Mediums und der Mediumzusammensetzung spielt ebenfalls eine Rolle. So zeigten in Wachstumsfaktor-haligem Medium kultivierte hPASMC einen signifikant höheren durch CPA-initiierten Ca²⁺-Einstrom als hPASMC, die in Wachstumsfaktor-freiem Medium kultiviert wurden⁴⁷².

The diagram illustrates the Ca^{2+} signaling pathway in PASMCs. It shows the cell membrane with receptors (TRP, SOC, ROC, GPGR) and signaling molecules (PIP₂, PLC, DAG, IP₃). The pathway involves the release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum (ER) and the sarcoplasmic reticulum (SR) into the cytoplasm. The resulting Ca^{2+} levels affect proliferation (Ki67, Cyclin D1), migration, and apoptosis (bax). The diagram also shows the effect of chronic hypoxia on the pathway, leading to increased Ca^{2+} levels and subsequent apoptosis.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die klassisch *transient receptor potential 1* (TRPC1)-assoziierten Kationenkanäle durch 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG), einem Analog von Diazylglyzerol (DAG), die Ca^{2+} -Konzentration in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cell*, mPASC) regulieren und Rezeptor-aktivierbaren Kanälen (*receptor-operated channel*, ROC) bilden. Der *knockout* (rot) von TRPC1 beeinflusst den Ca^{2+} -Einstrom negativ. Cyklopiazonsäure (*Cyclopiazic acid*, CPA) hingegen führt zur Entleerung von intrazellulären Speichern (sarkoplasmatisches Retikulum, SR), wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Es kommt jedoch nicht zur Aktivierung von TRPC1-assoziierten Kationenkanälen. Speicher-aktivierbare Kanäle (*store-operated channel*, SOC) spielen weder in chronischer Hypoxie eine Rolle, noch scheinen TRPC1-assoziierte Kanäle zu den SOC zu zählen. Durch die gesenkte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration werden Proliferation und Migration gesenkt, was zu reduzierten Gefäßumbau

Diskussion

und reduziertem rechtsventrikulärer systolischer Druck (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) führt, wodurch die TRPC1^{-/-} Mäuse partiell vor pulmonaler Hypertonie (PH) geschützt waren. GF: *growth factor* (Wachstumsfaktor); GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; IP₃: Inositol-1,4,5-triphosphat; IP₃R: Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor; Orai1: *Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel protein 1* (Ca²⁺ aktivierbares Ca²⁺-Kanalprotein 1); P: Phosphorylierung; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PLC: Phospholipase C; RHH: Rechtsherzhypertrophie; Ryr: Ryanodine Rezeptor; Stim1: Stromal Interaktionsmolekül 1; SERCA: *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (Ca²⁺-Pumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums); TRP: *transient receptor potential*; orange Pfeile: in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Signalwege; schwarze Pfeile: in der Literatur beschriebene Signalwege; gestrichelte Pfeile: nicht völlig entschlüsselte molekulare Signalwege; Pfeil nach oben: Erhöhung; Pfeil nach unten: Senkung; Punkt: kein Unterschied; rot: *knockout*; grün: *knockdown*; blau: Hypoxie-Effekt; schwarz: in der Literatur beschrieben.

4.3.2 Upstream- und Downstream-Signalwege

In der vorliegenden Arbeit konnte die Hochregulation von TRPC1 in mPASMC durch chronische Hypoxie-Exposition sowie die Relevanz von TRPC1 in der chronisch Hypoxie-induzierten Proliferation und Migration und in der Dysregulation der Ca²⁺-Homöostase nachgewiesen werden. Aus der Literatur sind mannigfaltige Hinweise auf molekulare TRPC1-assoziierte *downstream*-Signalwege bekannt. Eine Schlüsselrolle des TRPC1-vermittelten Ca²⁺-Einstroms wurde in vaskulären SMC⁴⁴³ sowie Lungenkarzinomazellen⁴⁵² im Zusammenhang mit Proliferation beschrieben. In Lungenkarzinomazellen wurde gezeigt, dass der TRPC1-vermittelte Ca²⁺-Einstrom für die Aktivierung von EGF-Rezeptoren sowie die Induktion der Cyclin-Expression essentiell war⁴⁵². Wie bereits beschrieben, konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen TRPC1 und Cyclin D1 hergestellt werden. Des Weiteren wurde in der Literatur gezeigt, dass der TRPC1-vermittelte Ca²⁺-Einstrom wichtig für die Induktion des Phosphoinosid-3-Kinase/Proteinkinase B Signalwegs und des mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) -Signalwegs ist⁴⁵². Da im Zusammenhang mit chronisch Hypoxie-induzierter Proliferation die Relevanz des MAPK-Signalwegs, insbesondere der Aktivierung von Erk1/2 sowie p38 beschrieben wurden^{473; 474}, wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf diese Signalwege gelegt. Die cDNA-Microarray-Analyse zeigte eine generelle starke Regulation des MAPK-Signalweg in mPASMC nach chronischer Hypoxie-Exposition (**Abbildung 63**). In homogenisierten Lungen und mPASMC führte Hypoxie zur Erhöhung der p38 Phosphorylierung jedoch zur Verringerung der Erk1/2 Phosphorylierung. Des Weiteren zeigte sich in der cDNA-Microarray Analyse, dass der *knockout* von TRPC1 zu einer veränderten Regulation im MAPK-Signalweg führt (**Abbildung 63**). Es konnte jedoch kein Unterschied in der Phosphorylierung von Erk1/2 oder p38 zwischen WT und TRPC1^{-/-} mPASMC unter chronischer Hypoxie beobachtet werden. Während in der Literatur bisher lediglich beschrieben wurden, dass die Phosphorylierung von p38 zur Expression von TRPC1 in rPASMC führt⁴⁰⁵, ist der Erk1/2-assoziierte Signalweg bereits näher beschrieben worden.

Diskussion

Dabei soll die Aktivierung von Ca^{2+} -sensitiven Signaltransduktionsproteinen in Brustkrebszellen über den TRPC1-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom zur Phosphorylierung von Erk1/2 führen⁴⁷⁵. Die Phosphorylierung/Aktivierung von Erk1/2 in diesen Zellen wurde zudem als notwendiger Schritt in der Induktion der TRPC1-Expression beschrieben⁴⁷⁶. Die Diskrepanz zu den vorliegenden Ergebnissen könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen unterscheiden sich die zugrundeliegenden Mechanismen womöglich zwischen unterschiedlichen Zellen (PASMC und Brustkrebszellen) und/oder Spezies (Mensch, Ratte, Maus). Zum anderen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der ROC-vermittelte TRPC1-assoziierte Ca^{2+} -Einstrom für die chronische Hypoxie relevant ist. Die Aktivierung von ROC wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und durch Rezeptor-Tyrosinkinasen vermittelt, mit welchen eine Vielzahl von Signalwegen assoziiert sind^{22; 23}. So ist es denkbar, dass unter chronischer Hypoxie auch andere Signalwege aktiviert werden, die die Phosphorylierung von Erk1/2 gleichzeitig hemmen könnten^{477–479}. Eine hemmende Wirkung auf die Erk1/2 Phosphorylierung im Zusammenhang mit Hypoxie wurde die für die MAPK Phosphatase 1 (MKP1)^{479; 480} beschrieben. Sowohl die Expression von MAPK1 in der Plazenta und im Gehirn^{481; 482} als auch die Aktivität in FB⁴⁷⁹ wird durch Hypoxie erhöht. Ebenso ist es möglich, dass die Phosphorylierung von Erk1/2 durch kurzzeitige⁴⁸³ aber nicht durch länger anhaltende Hypoxie induziert wird^{484; 485}. Eine zeitabhängige Phosphorylierung konnte auch für p38 gezeigt werden⁴⁸⁶.

Da die CHPH mit der Dysregulation vieler Faktoren einhergeht, ist es denkbar, dass diverse Faktoren auch die Expression und Funktion von TRPC1 beeinflussen können. Verschiedene Faktoren wie TGF- β 1^{487; 488}, PDGF und EGF^{489–493}, IGF-1⁴⁹⁴, VEGF¹⁶⁴ und TNF α ² wurden im Zusammenhang mit PH bereits beschrieben.

In der durchgeführten Untersuchung der Fähigkeit einiger Faktoren (IGF-1, PDGF, EGF, VEGF, TNF α , TGF- β 1) die TRPC1-Expression zu induzieren, konnte, mit Ausnahme von TGF- β 1 und TNF α , keiner der analysierten Kandidaten die TRPC1-Expression beeinflussen. Obwohl in HUVEC gezeigt wurde⁴⁹⁵, dass die TNF α -Stimulation die TRPC1-Expression über den Nukleusfaktor leichter κ -Ketten der aktivierten B-Zelle (*nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells*, NF- κ B) Signalweg in EC induziert^{496–498}, zeigte die TNF α -Stimulation in PASMC in dieser Arbeit einen inhibierenden Effekt. Es konnte auch nur eine geringe Freisetzung von TNF α in murinen Lungengewebe sowie in isolierten mPASMC nach chronischer Hypoxie beobachtet werden. Sowohl TNF α ⁴⁹⁹ als auch NF- κ B^{500–503} sind mit Inflammation und inflammatorischen Erkrankungen assoziiert^{504; 505}. So wurden in PAH Patienten²⁵⁶ und Tiermodellen der PH⁵⁰⁶ erhöhte TNF α Spiegel beobachtet. TNF α wirkt über

Diskussion

den Transkriptionsfaktor NF- κ B⁵⁰⁷, der in IPAH Patienten⁵⁰⁸ und Tiermodellen der PH^{500–503} hochreguliert und/oder aktiviert ist. Hierbei korreliert der Grad der Inflammation unter anderem mit dem Hypoxie-induzierten vaskulären Gefäßumbau⁵⁰⁹. Von der Maus weiß man, dass sie verglichen mit anderen Spezies (z. B. Rind, Mensch) nur eine geringe Inflammation aufweist, die teilweise lediglich in der frühen Phase der PH zu beobachten ist und sich spontan wieder auflöst⁴⁷¹. Die in der eigenen Arbeit gefundene, niedrige TNF α -Produktion nach chronischer Hypoxie unterstützt diese Theorie.

Im Gegensatz zur TNF α -Stimulation führte die Stimulation mit TGF- β 1 zur Induktion der TRPC1-Expression. Ein ähnlicher Effekt von TGF- β 1 konnte für die TRPC6-Expression bereits in FB gezeigt werden⁴⁵⁸. Die TGF- β 1-Stimulation kann über TGF- β Rezeptoren I oder II in Smad-abhängiger oder Smad-unabhängiger Art und Weise wirken^{510; 511}. Der Smad-abhängige Signalweg ist mit der Phosphorylierung von Smad2 und/oder Smad3 verbunden^{512; 511; 513}. Smad2/3 bilden einen Komplex mit Smad4 und Translokation in den Nukleus. Dieser Komplex reguliert über die Promotorsequenz „caca“⁵¹⁴ eine Vielzahl von Genen über cis-regulatorische Elemente⁵¹⁵. Die Stimulation von mPASC mit TGF- β 1 zeigte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Smad2/3, es zeigte sich jedoch ein Effekt auf die Expression von Smad2/3. Weiterhin hatte weder chronische Hypoxie noch der Verlust von TRPC1 einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Smad2/3. Die Smad-abhängigen Signaltransduktion spielt weder eine Rolle in der chronischen Hypoxie in mPASC, noch in der TGF- β 1-vermittelten Induktion der TRPC1-Expression. Womöglich haben andere Signalwege eine inhibitorische Wirkung auf den Smad-abhängigen Signalweg. Für Calmodulin wurde eine inhibitorische Wirkung beschrieben⁵¹⁰. Ob die Calmodulin Protein-Expression durch chronische Hypoxie beeinflusst wird, wurde in der Literatur bislang nicht untersucht. So kann nur darüber spekuliert werden, welchen Einfluss Calmodulin auf Smad-Proteine unter chronischer Hypoxie hat. Des Weiteren zeigt Cyclin D1 einen inhibitorischen Effekt auf Smad2/3⁵¹¹, dessen Protein-Expression sowohl durch chronische Hypoxie als auch durch TGF- β 1-Stimulation in dieser Arbeit induziert wurde.

Der Smad-unabhängige Signalweg hingegen ist mit p38, Erk1/2 sowie JNK und RhoA Signalwegen assoziiert⁵¹⁶. Nach Stimulation der mPASC mit TGF- β 1 konnte tendenziell die Phosphorylierung von p38 erhöht werden, ein Effekt auf die Erk1/2 Phosphorylierung konnte nicht beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch ein Effekt von TGF- β 1 auf die Expression von p38 und Erk1/2. Bei Betrachtung des TGF- β 1 Spiegels in homogenisierten Mäuslungen und mPASC nach chronischer Hypoxie konnte keine erhöhte TGF- β 1 Freisetzung nachgewiesen werden. Ebenso konnte kein Effekt von chronischer Hypoxie auf den TGF-Signalweg in der

Diskussion

cDNA-Microarray-Analyse in mPASC MC gezeigt werden. In isolierten mPAEC konnte jedoch eine erhöhte TGF- β 1-Freisetzung nachgewiesen werden, welches die Literatur bestätigt²³⁴. Murine PASC MC scheinen im Gegensatz zu mPAEC TGF- β 1 unter chronischer Hypoxie nicht freizusetzen. Da die SMC und die EC *in vivo* in intakten Gefäßen in enger Interaktion stehen¹⁷⁷ und die Freisetzung von Faktoren aus PAEC einen wichtigen Einfluss auf PASC MC haben¹⁷⁷, könnte die Hypoxie-induzierte Freisetzung von endothelialem TGF- β 1 unter anderem die TRPC1-Expression in PASC MC induzieren. Eine mögliche Ursache für den Unterschied in der Phosphorylierung von p38 und Erk1/2 in TGF- β 1 stimulierten mPASC MC und nach chronischer Hypoxie könnte darin liegen, dass keine Co-Kulturen mit mPAEC verwendet wurden, die TGF- β 1 in Abhängigkeit von Hypoxie hätten freisetzen können. Das Weiteren war das verwendete Medium TGF- β 1-frei.

TGF- β 1 könnte seine Wirkung auf die TRPC1-Expression außerdem über den Transkriptionsfaktor HIF-1 α , welcher unter Hypoxie (<2% pO₂) mehr als 100 Gene induziert⁵¹⁷, ausüben. HIF-1 α ist im Mechanismus der CHPH im Tiermodell essentiell und wird durch unterschiedliche Faktoren, wie TGF- β 1, stabilisiert^{139; 198; 208}. Die stabilisierende Wirkung von TGF- β 1 erfolgt, indem es die PHD-2-Expression reduziert^{200; 518}. PHD spielt eine wichtige Rolle im Abbau von HIF-1 α unter Normoxie^{192; 193}. Die Expression von HIF-1 α kann zudem von TGF- β 1, PDGF, TNF α und IL-1 β ⁵¹⁹, EGF⁵²⁰ und IGF-1⁵²¹ beeinflusst werden.

Um den direkten Einfluss von HIF-1 α auf die Hypoxie-abhängige TRPC1-Expression zu untersuchen, wurde der murinen TRPC1-Promotor mit Hilfe einer computergestützten Promotoranalyse nach *hypoxia responsive elements* gescreent. Dabei konnte die Kernbindesequenz „acgt“ identifiziert werden, während die Bindesequenz „cacgtggt“ nicht nachgewiesen werden konnte. Die Beteiligung von HIF-1 α an der TRPC1-Induktion in mPASC MC konnte durch das in dieser Arbeit durchgeführte *knockdown* Experiment gezeigt werden. Der *knockdown* von HIF-1 α führte zur verminderten Expression von TRPC1. Eine Abhängigkeit der TRPC1-Expression von HIF-1 α wurde in rPASC MC bereits nachgewiesen³⁷⁵. Außerdem konnte die stabilisierende Wirkung von TGF- β 1 auf HIF-1 α gezeigt werden. Die Ergebnisse lassen zwei HIF-1 α -abhängige Mechanismen der TRPC1-Regulation vermuten. Zum einen könnte Hypoxie selbst zur Stabilisierung von HIF-1 α und somit zur TRPC1-Expression führen, zum anderen könnte die Hypoxie-abhängige Freisetzung von vasoaktiven Faktoren wie TGF- β 1^{139; 198; 208} HIF-1 α stabilisieren und so die TRPC1-Expression induzieren (**Abbildung 62**). Des Weiteren wird der Zusammenhang zwischen TGF- β 1 über HIF-1 α dadurch gestützt, dass die Stimulierung von mPASC MC mit TGF- β 1 zur erhöhten Proliferation führt. Dieser Effekt konnte durch gleichzeitigen HIF-1 α *knockdown* inhibiert werden, wodurch

Diskussion

HIF-1 α eine Schlüsselrolle in der TRPC1-Expression zukommt.

Ein ähnlicher Mechanismus wurde durch Sanders et al.⁵²² beschrieben. In der Untersuchung wurde die TGF- β 1-Expression durch HIF-1 α induziert. Die TGF- β 1-Freisetzung bewirkte wiederum die HIF-1 α Stabilisierung und eine NADPH Oxidase 4 (NOX4) -abhängige ROS Produktion. Dieser Prozess resultierte in einer gesteigerten Proliferation der PASMC. In der Literatur wird eine Rolle von NOX4 in der CHPH beschrieben, da diese Oxidase in CHPH⁵²³, in humanen proliferierenden PASMC⁵²⁴ sowie in der Hypoxie-induzierter Proliferation der PASMC⁵²⁵ hochreguliert ist. Außerdem wird sie durch HIF-1 α reguliert⁵²⁵. Weiterhin wurde in der CHPH ein Zusammenhang zwischen dem knochenmorphogenetischen Protein 4 (*bone-morphogenic protein 4*, BMP4), einem Wachstumsfaktor aus der TGF- β Superfamilie, ROS und TRPC1 gezeigt⁴⁰⁹. BMP4^{405; 410; 526–528} wird sowohl in pulmonalen Arterien der Maus als auch in PASMC durch HIF1-1 α reguliert⁴¹⁰. BMP4 vermittelt außerdem die ROS-Produktion durch NOX4⁴⁰⁹ und induziert sowohl die Expression von TRPC1 als auch TRPC6⁴¹⁰. In heterozygoten BMP4 Mäusen kommt es nach chronischer Hypoxie zum partiellen Schutz vor PH und Rechtsherzhypertrophie sowie zur reduzierten Muskularisierung in kleinen Gefäßen^{526; 410}. Diese Ergebnisse ähneln den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen in TRPC1^{-/-} Mäusen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression von TRPC1 und TRPC6 in BMP4 stimulierten rPASMC über Erk1/2 und p38 Phosphorylierung erfolgte⁴⁰⁵. Der zugrundeliegende Signalweg ist mit der HIF-1 α -abhängigen Induktion der BMP4-Expression⁴¹⁰ und mit der Produktion von ROS assoziiert⁴⁰⁹. Es kann darüber spekuliert werden, ob ROS die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38⁵²⁹ sowie Stabilität von HIF-1 α fördern²⁸¹, wodurch es zur TRPC1 und TRPC6 Expression kommt^{530; 528}. Der Zusammenhang zwischen der ROS-Produktion, dem SOCE bzw. ROCE sowie der Genexpression von TRPC1 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Auch andere in dieser Arbeit nicht untersuchte Faktoren und Signalwege könnten die Expression von TRPC1 unter chronischer Hypoxie sowie die Aktivität von TRPC1-assoziierten Kanälen beeinflusst haben. Hier ist die AngII-Freisetzung zu nennen. AngII ist in der Hypoxie-induzierten Vasokonstriktion von pulmonalen Arterien und im Gefäßumbau relevant^{531–533}. Dieser Faktor könnte die Binderate von NF- κ B an die Promotorsequenz im TRPC1-Promoter erhöht haben⁴⁵¹, was zu einer erhöhten TRPC1-Expression und erhöhten Ca²⁺-Einstrom geführt haben könnte, ohne die Expression von TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6, und TRPC7 beeinflusst zu haben^{531–533}. Weiterhin könnte NF- κ B die Translokation von TRPC1 zur Ca²⁺-Kanalbildung induzieren⁴⁹⁷.

Diskussion

EGF beispielsweise bindet an EGF-Rezeptoren und führt über Phosphorylierung von Erk1/2 und Expression von AMD1 zur Aktivierung von PLC γ 1⁴⁸⁴. Zudem gibt es Hinweise, dass TRPC1 den EGFR-Signalweg beeinflusst⁴⁵².

Die Komplexität der PH wird in Studien verdeutlicht, in denen Sildenafil zum Einsatz gekommen ist. Sildenafil, welches in der Behandlung von IPAH eingesetzt wird, erhöht unter anderem die Konzentration von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) γ ⁵³⁴, senkt die Translokationsrate von NFAT3c in den Nukleus⁴⁵⁹ und inhibiert die TRPC1-Expression^{459; 535}. Es ist bekannt, dass chronische Hypoxie zu gesenkten PPAR γ Level führt⁵³⁵. Außerdem ist bekannt, dass die Expression von TRPC1 und TRPC6 durch PPAR γ inhibiert wird⁵³⁵. Möglicherweise kommt es durch die Dysbalance von PPAR γ unter chronischer Hypoxie zur Induktion der TRPC1 und TRPC6 Expression. Sildenafil hat des Weiteren einen Effekt auf die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT in den Nukleus⁴⁵⁹. NFAT ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der nach Ca²⁺-Einstrom aktiviert wird^{459; 536} und für die Proliferation von diversen Zelltypen entscheidend ist^{537–543}. Möglicherweise wird NFAT durch den TRPC1-vermittelten Ca²⁺-Einstrom aktiviert^{497; 459}. Da im TRPC1-Promotor eine NFAT Bindesequenz beschrieben wurde^{411; 544}, könnte es durch die Ca²⁺-abhängige Aktivierung von NFAT zu einem positiven Feedback gekommen sein, wodurch eine TRPC1-Expression induziert worden ist. Der NFAT-Signalweg wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht weiter untersucht.

Diese und ähnliche Mechanismen, die gleichzeitig in der CHPH und chronisch Hypoxie-induzierten Proliferation und Migration gewirkt haben könnten, könnten zum einen erklären, warum der Verlust von TRPC1 lediglich zu einer reduzierten Proliferation unter chronischer Hypoxie geführt hat und zum anderen, warum man beim Verlust von TRPC1 in der Phosphorylierung von p38, Erk1/2 sowie in der Expression von Cyclin D1, Ki67 und α -SMA keine Unterschiede im Vergleich zum WT gesehen hat. Diese Resultate machen deutlich, wie komplex die Vorgänge in PASMC während der chronischen Hypoxie scheinbar sind.

Diskussion

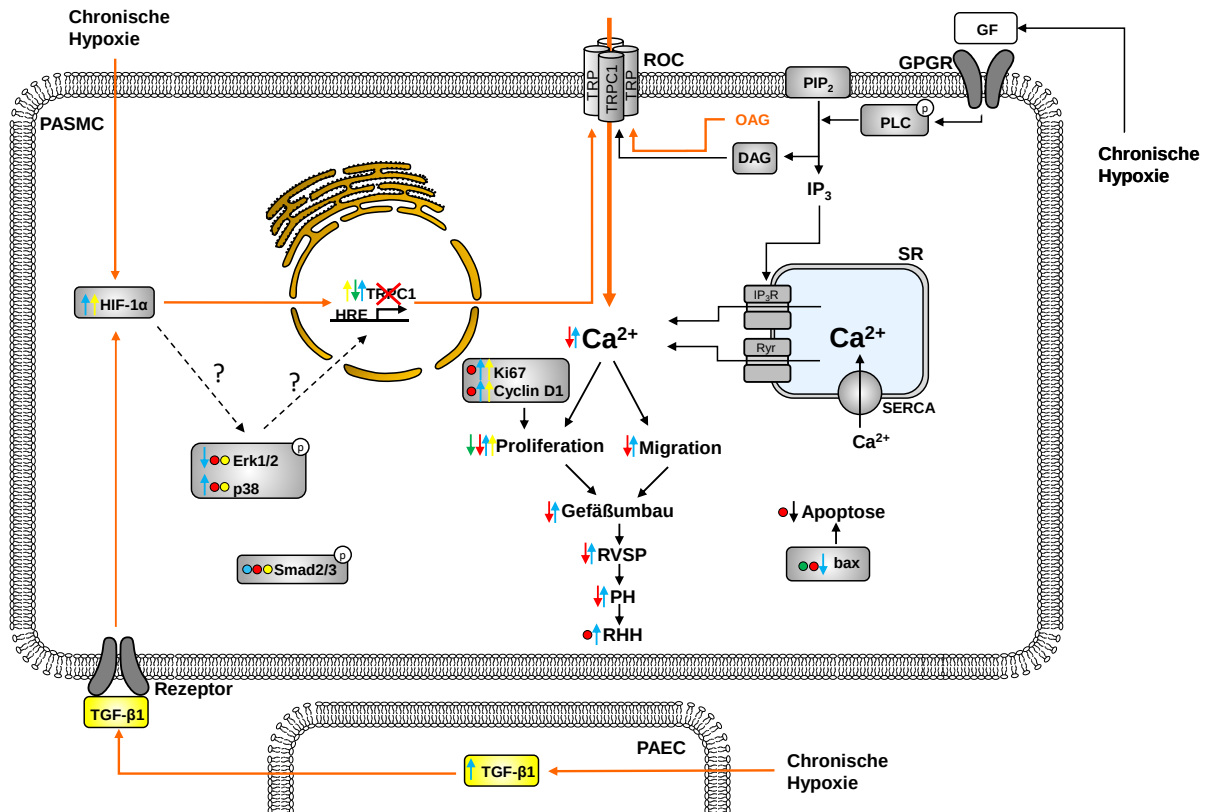


Abbildung 62: TGF- β 1 und der Hypoxie führen zur Stabilisierung von HIF-1 α und induzieren die TRPC1-Expression.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression des klassischen *transient receptor potential 1* (TRPC1) -Kanals in pulmonalarteriellen glatte Muskelzelle (*pulmonary arterial smooth muscle cell*, PASMC) durch den transformierenden Wachstumsfaktor- β 1 (*transforming growth factor- β 1*, TGF- β 1, gelb) sowie den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF)-1 α induziert wird. Es bleibt unklar, ob TGF- β 1, welches durch pulmonalarterielle Endothelzellen (*pulmonary arterial endothelial cells*, PAEC) nach Hypoxie-Exposition freigesetzt wird, über HIF-1 α unabhängige Signalwege die TRPC1-Expression über die Phosphorylierung (P) von p38 und/oder Erk1/2 induzieren kann. Der Smad2/3 abhängige Signalweg spielt in dem Mechanismus keine Rolle. Des Weiteren ist auch nicht geklärt, ob HIF-1 α die TRPC1-Expression direkt induziert oder ob die Phosphorylierung p38 und Erk1/2 involviert sind. DAG: Diazylglycerol; GF: *growth factor* (Wachstumsfaktor); GPGR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; IP₃: Inositol-1,4,5-triphosphat; IP₃R: Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor; OAG: 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (DAG Analog); PH: pulmonale Hypertonie; PLC: Phospholipase C; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; RHH: Rechtsherzhypertrophie; ROC: *receptor-operated channel* (Rezeptor-aktivierbarer Kanal); RVSP: *right ventricular systolic pressure* (Rechtsventrikulärer systolischer Druck); Ryr: Ryanodin Rezeptor; SERCA: *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase* (Ca²⁺-Pumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums); TRP: *transient receptor potential*; SR: sarkoplasmatisches Retikulum; orange Pfeile: in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Signalwege; schwarze Pfeile: in der Literatur beschriebene Signalwege; gestrichelte Pfeile: nicht völlig entschlüsselte molekulare Signalwege; Pfeil nach oben: Erhöhung; Pfeil nach unten: Senkung; Punkt: kein Unterschied; rot: *knockout*; grün: *knockdown*; blau: Hypoxie-Effekt; schwarz: in der Literatur beschrieben.

4.4 Kritische Betrachtung der verwendeten Modelle

4.4.1 Das Tiermodell

Um die CHPH Pathogenese zu entschlüsseln, sind Tiermodelle von besonderer Bedeutung. Es gibt eine Vielzahl von Modellen, um verschiedene Formen der humanen PH zu untersuchen. Dabei zählen die MCT-induzierte PH der Ratte und die chronisch Hypoxie-induzierte PH verschiedener Spezies zu den bedeutsamsten Tiermodellen⁵⁴⁵. Diese sind histopathologisch detailliert beschrieben, sind sehr gut reproduzierbar und ermöglichen die Untersuchung von therapeutischen Ansätzen oder der PH zugrundeliegenden Mechanismen. Die derzeit etablierten Tiermodelle spiegeln bestimmte Aspekte der humanen Erkrankung wieder und repräsentieren, zumindest zum Teil, bestimmte Formen der humanen PH. Bisher gibt es jedoch kein Tiermodell, das die komplexen Veränderungen aller humanen PH Formen komplett abbildet^{2; 155}, da die verschiedenen humanen Formen der PH unterschiedliche Charakteristika aufweisen. Obwohl die Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus den verschiedenen Tiermodellen kritisch hinterfragt werden muss, sind die Erkenntnisse im Hinblick auf die Analyse von verschiedenen Signalwegen und Auslösern, die dem Mechanismus der humanen PH zugrundeliegen können, von hohem Wert. Obgleich nicht jeder Therapieansatz, der im Tiermodellen getestet wurde, in der Behandlung der humanen PH eine vergleichbare Wirkung erzielen konnte, konnten dennoch mehrere therapeutische Ansätze, die auf Basis der Tiermodelle entwickelt wurden, erfolgreich auf den Menschen übertragen werden⁵⁴⁵.

Im Modell der MCT-behandelten Ratte wird PH durch die Gabe von MCT induziert¹⁵⁵. MCT wird in der Leber zum aktiven und toxischen Monocrotalin-Pyrrol metabolisiert, induziert Inflammationsprozesse sowie Endothelverletzungen und löst innerhalb von zwei bis drei Wochen eine schwere Form der PH aus. Allerdings wird MCT in Mäusen nicht zum aktiven und toxischen Monocrotalin-Pyrrol verstoffwechselt, wodurch das MCT-Modell in Mäusen nicht angewendet werden kann⁵⁴⁶. Das MCT-Modell der Ratte spiegelt am ehesten die humane Form der IPAHA wieder. Es kommt zu einem ähnlich Schweregrad, einem rapiden Fortschreiten der PH⁵⁴⁵, zusätzlich jedoch auch zu PH unspezifischen Symptomen¹⁵⁵. Im Hinblick auf das Fehlen der Ausbildung von plexiformen¹⁴³ und Intimal-Läsionen^{2; 155}, spiegelt das MCT-Modell aber nicht die exakte Situation in der humanen IPAHA wieder. Durch Kombination des MCT-Modells mit anderen Modellen (kontralaterale Pneumektomie, *knockout*), können weitere pathologischen Veränderungen induziert werden, welche in der humanen IPAHA beobachtet wurden⁵⁴⁵.

Diskussion

Das Modell der Hypoxie-induzierten PH führt in fast allen untersuchten Säugetieren zur Entwicklung einer PH. Zwischen den verschiedenen Spezies kommt es lediglich zu Variationen im Schweregrad nach Hypoxie-Exposition. So wird in der Ratte eine moderate PH induziert⁵⁴⁵, während Mäuse eine milde Form der PH entwickeln^{155; 378}, die durch einen vaskulären Gefäßumbau⁵⁰⁹ und eine geringe Zellproliferationsrate^{209; 547} gekennzeichnet ist. Weiterhin tritt in Mäusen eine geringe inflammatorische Veränderung auf, die teilweise nur in der frühen Phase der PH zu beobachten ist und sich spontan wieder auflöst⁴⁷¹. Die in der Maus induzierte CHPH ist nach Reoxygenierung völlig reversibel^{155; 546}, gut reproduzierbar und kann innerhalb von drei Wochen durch Hypoxie (10% O₂) ausgelöst werden³⁷⁸. Sie ist durch verstärkte Muskularisierung der distalen Gefäße und versteiften proximalen Arterien charakterisiert¹⁵⁵. Dieses Modell spiegelt die humane Situation nach chronischer Hypoxie-Exposition sehr gut wieder, kann aber nur bedingt auf andere Formen der humanen PH übertragen werden⁵⁴⁵. Eine schlimmere Form der PH, die mit stärkerer arterieller Muskularisierung und Kollagendeposition in der *Tunica media* und der *Tunica adventitia* sowie Läsionen charakterisiert ist⁵⁴⁸, kann in Mäusen durch die Gabe eines VEGF-Inhibitors (SU5416) in Kombination mit Hypoxie ausgelöst werden.

Die Wahl der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Spezies wurde durch die Verfügbarkeit genetisch veränderter Organismen maßgeblich bestimmt. Genetisch veränderte Organismen in Kombination mit verschiedenen Tiermodellen bieten die Möglichkeit spezielle Signalwege in bestimmten Formen der PH gezielt untersuchen zu können⁵⁴⁵. Da bereits Mäuse mit einem globalen *knockout* generiert und bis dato keine anderen TRPC1 *knockout* Spezies erzeugt wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit die Maus im Tiermodell verwendet. Zudem fehlen TRPC1-spezifischen Inhibitoren um TRPC1 untersuchen zu können³²⁶, weshalb auf TRPC1^{-/-} Mäuse zurückgegriffen werden musste. Der Einsatz von Mäusen, die einen globalen, konstitutionellen *knockout* aufweisen, hat jedoch den Nachteil, dass das Fehlen von TRPC1 durch Regulation anderer Gene kompensiert werden könnte. Eine kompensatorische Regulation anderer TRPC-Proteine in mPASMOC konnte nicht beobachtet werden³⁸³, in homogenisierten Lungen hingegen wurde eine kompensatorische Regulation von TRPC7 identifiziert³⁸³. Der Einfluss dieser Regulation sowie weiterer kompensatorischen Mechanismen können nicht ausgeschlossen werden und müssen bei der Verwendung von *knockout* Mauslinien als mögliche Fehlerquelle berücksichtigt werden.

Da in der vorliegenden Arbeit die Rolle von TRPC1 in CHPH untersucht werden sollte, wurde das Modell der CHPH gewählt. Da die Reaktion verschiedener Spezies auf SU5416 variiert,

die entstehenden Läsionen sich teilweise nach Reexposition in Normoxie entwickeln^{548; 549} und die Rolle von VEGF in PH nicht völlig geklärt ist^{166; 247}, wurde auf die Kombination von Hypoxie und SU5416 verzichtet.

4.4.2 Das Zellmodell

Obwohl Tiermodelle die komplexen Mechanismen der CHPH am Besten widerspiegeln, eignen sie sich als Modelle zur Untersuchung von molekularen Mechanismen bedingt. In ganzen Organen werden zeitgleich verschiedene Signalwege in diversen Zelltypen durch verschiedene Faktoren induziert, wodurch mögliche relevante Signalwege in den zu untersuchenden Zielzellen überlagert sein können. Demensprechend ist es üblich die der CHPH zu Grunde liegenden Mechanismen in einzelnen Zelltypen zu untersuchen. Da die Veränderungen der *Tunica media* im Pathomechanismus der CHPH besonders ausgeprägt sind und durch eine Imbalance zwischen Proliferation und Apoptose von PASMC verursacht werden¹⁷⁰, wurden in dieser Arbeit hauptsächlich mit diesen Zellen in Monokultur gearbeitet. Monokulturen stellen kein optimales Modell dar, weil die Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen fehlen, diese aber für komplexe Vorgänge essentiell und zur Aktivierung wichtiger Signalwege notwendig sind¹⁷⁷. In diesem Zusammenhang ist vor allem die enge Interaktion von PASMC und PAEC zu nennen. Bedauerlicher Weise konnte die Kultivierung von primären mPASMC mit primären mPAEC in Co-Kulturen bislang nicht etabliert werden. Zudem handelt es sich bei primären mPASMC nicht um Reinkulturen. Die Verunreinigung dieser mPASMC mit anderen, nicht im Fokus stehenden Zellen (z. B. FB) ist wahrscheinlich. Die Reinheit der isolierten mPASMC in Zellkultur wurde auf ca. 80% bestimmt³⁸³. Diese kann jedoch variieren und den Ausgang eines Zellversuches beeinflussen.

Weiterhin ist der Umgang mit primären PASMC schwierig. Verschiedene Faktoren haben Auswirkungen auf die kultivierten Zellen. Zu diesen Faktoren zählen die Herkunft der Zellen (Spezies, Abschnitt der Pulmonalarterie), Zellpopulation, Phänotyp und Kultivierungsbedingungen (O₂-Konzentration, Dauer der Behandlung, Zell-Zellkontakt/Aussaatdichte, Mono- oder Co-Kultur, Anwesenheit/Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und/oder Serum)¹⁸⁸. Die Zellpopulation hat eine besonders wichtige Bedeutung. In großen Tieren wie Rindern sowie Menschen konnten bisher zwei unterschiedliche SMC Populationen isoliert werden^{92; 440; 550; 551}; gut differenzierte SMC, welche nicht mit Proliferation auf Hypoxie reagieren und nicht-differenzierte SMC, welche mit starker Proliferation auf Hypoxie reagieren^{440; 552; 553}. In neonatalen Kälbern wurden zudem *smooth muscle like cells* isoliert, die hoch proliferativ sind, die resistent gegen Apoptose sind

Diskussion

und Faktoren wie S100A4 und PDGF- β freisetzen⁵⁵⁴. Der Ursprung der Zellen ist für den Phänotyp bedeutsam. PASMC aus distalen Pulmonalarterien vom Rindern zeigen eine geringe Proliferation als Reaktion auf Hypoxie-Exposition oder auf Wachstumsfaktoren^{471; 470}. Aus distalen, stark vom Gefäßumbau betroffenen humanen Pulmonalarterien wurden hochproliferative Zellen isoliert⁵⁵⁵. Der Phänotyp wird unter anderem durch die Kultivierung beeinflusst⁵⁵⁶. Frisch isolierte SMC können ihren kontraktilen Phänotyp ab Passage zwei ohne äußere erkennbare Einwirkung zum synthetischen Phänotyp ändern. Diese Veränderung ist durch ein verändertes Genexpressionsmuster sowie ein verändertes Proliferations- und Migrationsverhalten charakterisiert⁴²⁵. Den Phänotyp-Wechsel konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Unter Normoxie kultivierte mPASMC änderten ihren Phänotyp in Passage 2, was sich in einer erhöhten Proliferation manifestierte. Der Vergleich der TRPC1-Expression unterschiedlicher Passagen zeigte außerdem einen direkten Einfluss auf die Expression von TRPC1 und wurde in allen Versuchen berücksichtigt.

Zusammenfassend erschweren nicht-standardisierte Versuchsbedingungen zwischen unterschiedlichen Forschungsgruppen und der spontanen Phänotyp-Wechsel die Arbeit mit primären PASMC. Da sie der vorherrschende Zelltyp im der *Tunica media* sind, ist die Arbeit mit ihnen sinnvoll und notwendig. Da verschiedene Faktoren Einfluss auf die kultivierten PASMC haben, wurde die verwendeten Zellen in der vorliegenden Arbeit möglichst unter gleichen Bedingungen kultiviert und untersucht.

4.5 Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRPC1 in der CHPH bedeutsam ist. Dieses Erkenntnis wird nicht nur durch den partiellen Schutz von TRPC1^{-/-} Mäuse vor CHPH gestützt, sondern auch durch die Beobachtung, dass chronische Hypoxie zur Hochregulation von TRPC1 in PASMC führt und diese die Proliferation sowie die Migration beeinflusst. Die zugrunde liegenden Mechanismen für diese Beobachtungen sind nicht völlig geklärt, dennoch wird TRPC1 vermutlich über HIF-assoziierte Signalweg induziert. Aber auch andere Signalwege, die durch Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 aktiviert werden, könnten die Expression von TRPC1 beeinflusst haben. Während der chronischen Hypoxie wird der $[Ca^{2+}]_i$ -Einstrom vermutlich über ROC vermittelt, in denen TRPC1-assoziierte Kationkanäle involviert sind. Die chronische Hypoxie führt jedoch weder zum Anstieg der basalen $[Ca^{2+}]_i$, noch konnte ein TRPC1-assoziiertes SOCE beobachtet werden.

TRPC1 erfüllt scheinbar eine wichtige Funktion in dem pulmonalarteriellen Gefäßumbau über

Modulation der Ca^{2+} -Homöostase, der Proliferation und der Migration von PASMC, was zu den typischen pathologischen Veränderungen in der *Tunica media* in der CHPH beiträgt.

4.6 Ausblick

Trotz der fortschreitenden Identifizierung von wichtigen Signalwegen in Tier- und Zellmodellen, kann der Gefäßumbauprozess, der die PH charakterisiert, im Menschen nicht rückgängig gemacht und die humane PH nicht geheilt werden. Lediglich ein Aufhalten des Krankheitsfortschreitens ist möglich. Die Diagnose der PH erfolgt meistens im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf¹²⁰, was das Einleiten von präventive Maßnahmen und das Therapieren zusätzlich erschwert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRPC1 in der Funktion von PASMC auf die Proliferation sowie die Migration Einfluss nimmt. Um die Erkenntnisse aus dieser und anderen Untersuchungen in Zukunft für therapeutische Ansätze beim Menschen nutzen zu können, muss die Wirkweise von TRPC1 jedoch noch näher untersucht werden und die Übertragbarkeit der eigenen Untersuchung auf den Menschen bestimmt werden. Von besonderer Wichtigkeit ist die Zusammensetzung der TRPC1-assoziierten Kationenkanälen, die bislang aufgrund fehlender spezifischer Antikörper nicht geklärt werden konnte. Die Komposition der heteromeren Kanäle ist für die Aktivierbarkeit dieser bedeutsam und kann Einblicke in die Aktivierungs- und Regulationsmechanismen bieten, die bisher nicht bekannt sind. So ist es durchaus denkbar, dass der Redoxstatus der Zelle für die Aktivierbarkeit von TRPC-Kanälen genauso wichtig sein kann⁷⁰, wie mechanosensitive Reize.

Bisher kann der therapeutische Nutzen einer TRPC1-Inhibition nicht abgeschätzt werden, da spezifische Inhibitoren fehlen. Es besteht lediglich die Möglichkeit TRPC1 mit spezifischen siRNAs auf direktem Weg der Zellen herunter zu regulieren, mit dem Ergebnis, dass die Hypoxie-induzierte Proliferation nicht vollständig gehemmt werden würde, da eine siRNA-Interaktion keinen vollständigen *knockdown* erzielt. Ob eine vollständige Inhibition von TRPC1 zur vollständigen Genesung führen würde, bleibt ebenfalls noch offen. Um den therapeutischen Nutzen der Inhibition von TRPC1 in der vollständigen Genesung abschätzen zu können, wäre die Kombination der CHPH der Maus und eines induzierbaren *knockouts* von TRPC1 notwendig. Die TRPC1-Defizienz könnte so nach Manifestation der CHPH induziert werden und der therapeutische Effekt untersucht werden.

Diskussion

Ein durchaus vielversprechender Ansatz könnte die Funktion von TRPC1 in der Migration der PASMC sein. Das Fehlen von TRPC1 inhibierte die Hypoxie-induzierte Migration der PASMC komplett. Um die Vorgänge in diesem Prozess besser verstehen zu können, sind jedoch auch hier weitere Untersuchungen nötig.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass TRPC1 eine Rolle in der Entwicklung von CHPH spielt. Ob TRPC1 zu therapeutischen Zwecken genutzt werden kann, muss in weiteren Studien untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Pulmonale Hypertonie (PH) ist ein Sammelbegriff für schwere Erkrankungen, welche durch einen pulmonalen Gefäßumbau und der damit verbundenen Erhöhung des Gefäßwiderstands sowie des pulmonalarteriellen Druck charakterisiert sind. Im Pathomechanismus der PH wird der Gefäßumbau unter anderem durch die erhöhte Proliferation und Migration sowie die verminderte Apoptose von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) verursacht. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration spielt in der Proliferation und der Migration der PASMC eine essentielle Rolle, die Bedeutung von Ca^{2+} -Kanälen an der PH sind bisher aber nur in Ansätzen untersucht worden. Insbesondere die nicht-selektiven Kationenkanäle der klassischen *transient receptor potential* (TRPC) -Subfamilie gelten hier als aussichtsreiche Kandidaten. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die TRPC-Proteinen im Pathomechanismus der chronisch Hypoxie-induzierten PH (CHPH) zu identifizieren und zu charakterisieren.

Es zeigte sich, dass die mRNA-Expression von TRPC1 in PASMC aus der Maus, der Ratte und des Menschen durch chronische Hypoxie induziert wurde. Die mRNA-Expression von TRPC3 und TRPC4 war in murinen PASMC vermindert, während TRPC5, TRPC6 und TRPC7 nicht reguliert waren. Unter Verwendung von TRPC1 *knockout* Mäusen im Modell der CHPH wurde gezeigt, dass der Verlust von TRPC1 zu einem verminderten pulmonalen Gefäßumbau führte und in einem reduzierten rechtsventrikulären systolischen Druck resultierte, wodurch TRPC1 *knockout* Mäuse partiell vor der Entstehung der CHPH geschützt sind. Im Modellsystem der isolierten, ventilierten und blutfrei-perfundierten Mauslunge, während akuter und anhaltender Hypoxie, zeigte sich hingegen, dass TRPC1 keine Relevanz an der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion hat. Auf Zellebene wurde der Einfluss von TRPC1 auf die Proliferation, die Migration und die Apoptose der murinen PASMC charakterisiert. Der *knockout* sowie der *knockdown* von TRPC1 führte zu einer verminderten Proliferation unter chronischer Hypoxie. Des Weiteren führte der *knockout* von TRPC1 zu einer vollständigen Inhibition der chronisch Hypoxie-induzierten Migration.

Bei der Untersuchung des *downstream*-Signalwegs wurde ein Anstieg in der Expression der Proliferations-assoziierten Proteine Ki67 und Cyclin D1 unter chronischer Hypoxie beobachtet. Außerdem wurde eine verminderte Expression von glattmuskulärem α -Aktin (α -SMA) festgestellt, welches mit einem Wechsel vom kontraktilen zum proliferativen Phänotyp assoziiert ist. Chronische Hypoxie führte zudem zur Phosphorylierung von p38, nicht jedoch von extrazelluläre signalregulierte Kinsase 1 und 2 (Erk1/2). Beide Proteine sind mit der Proliferation assoziiert. Es konnte jedoch kein Effekt des TRPC1 *knockouts* auf die durch chronische Hypoxie-induzierten Änderungen in der Expression von Ki67, Cyclin D1 und α -

Zusammenfassung

SMA sowie der Phosphorylierung von p38 und Erk1/2 beobachtet werden. Weiterführend wurde gezeigt, dass TRPC1 die Ca^{2+} -Homöostase unter chronischer Hypoxie als Rezeptor-aktivierter Kanal beeinflusst.

Im *upstream*-Signalweg wurde der hypoxie-induzierbare Faktor (HIF)-1 α als Schlüsselprotein in der Regulation der TRPC1-Expression identifiziert, indem der *knockdown* von HIF-1 α zu einer Inhibition der chronisch Hypoxie-induzierten TRPC1 mRNA-Expression führte. Des Weiteren wurde die Fähigkeit einiger Wachstumsfaktoren die Expression von TRPC1 zu induzieren untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der transformierende Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*, TGF)- β 1 die Expression von TRPC1 induziert, während der Tumornekrosefaktor α diese inhibiert. Schließlich konnte aufgeklärt werden, dass TGF- β 1 eine stabilisierende Wirkung auf HIF-1 α hatte und zu einer erhöhten TRPC1-Expression führte.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit TRPC1 durch *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen als bedeutendes Kationenkanal-bildendes Protein identifiziert werden, welches in dem pathophysiologischen Mechanismus der CHPH involviert ist, in dem es Einfluss auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der PASMC nimmt. Zukünftig könnte TRPC1 also als neues therapeutisches „*target*“ von Bedeutung sein.

6 Summary

Pulmonary hypertension (PH) is a collective term of severe diseases characterised by pulmonary vascular remodelling leading to elevated vascular resistance and pulmonary arterial pressure. The remodelling process is caused by an increased proliferation and migration as well as a reduced apoptosis of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC). The intracellular Ca^{2+} concentration is essential for PASMC proliferation and migration. However, the role of Ca^{2+} -channels in PH needs to be further investigated. The subfamily of classic transient receptor potential (TRPC) channels which belong to the family of non-selective cation channels are promising candidates. The aim of this scientific study was to identify and to characterise possible key TRPC proteins involved in the pathomechanism of chronic hypoxia-induced PH (CHPH).

The mRNA expression of TRPC1 was upregulated by chronic hypoxia in mouse, rat and human PASMC. The mRNA expression of TRPC3 and TRPC4 was reduced whereas the mRNA expression of TRPC5, TRPC6 and TRPC7 was unchanged. TRPC1 knockout mice kept under chronic hypoxia possessed reduced vascular remodelling and right ventricular systolic pressure suggesting that TRPC1 knockout mice were partly protected from CHPH development. However, the loss of TRPC1 showed no influence on hypoxic pulmonary vasoconstriction during acute and sustained hypoxia in the model of an isolated, ventilated and blood free perfused lung. Furthermore, the influence of TRPC1 on proliferation, migration and apoptosis of murine PASMC was characterised. The knockout and the knockdown of TRPC1 led to a reduced chronic hypoxia-induced proliferation. The knockout of TRPC1 caused a full inhibition of chronic hypoxia-induced migration. The analysis of the downstream signaling pathway revealed the induction of the proliferative markers ki67 and cyclin D1. Additionally, chronic hypoxia caused a reduced expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) which is associated with the change from the contractile phenotype to a proliferative phenotype. Moreover, chronic hypoxia led to phosphorylation of p38 but not extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (Erk1/2), both associated with proliferation. Interestingly, the TRPC1 knockout had no effect on the expression of ki67, cyclin D1 and α -SMA as well as on the phosphorylation of both kinases. Furthermore, TRPC1 influenced the Ca^{2+} homeostasis under chronic hypoxia and was identified as a receptor-activated channel.

In the upstream signaling pathway hypoxia-induced factor (HIF)-1 α was identified as a key protein in the regulation of TRPC1 expression. In this regard, the knockdown of HIF-1 α caused an inhibition of the chronic hypoxia-induced TRPC1 mRNA expression. The ability of different growth factors to induce TRPC1 mRNA expression was analysed, too. These data showed that

Summary

transforming growth factor (TGF)- β 1 was able to induce TRPC1 expression but tumor necrosis factor α inhibit TRPC1 expression. Finally, TGF- β 1 showed a stabilising effect on HIF-1 α and led to TRPC1 mRNA expression.

In summary, TRPC1 was identified as an outstanding cation channel forming protein which played an important functional role in the proliferation and the migration of murine PASM, contributing to the development of CHPH. In future, TRPC1 might be a potential new target for therapeutic approaches.

7 Promotersequenz

Folgende Promotersequenz 5000bp *upstream* von ATG (rot markert) von TRPC1 wurde untersucht. Gelb markiert ist die HRE-Bindesequenz ACGT, die neun Mal erfasst werden konnte.

5'-AATCTGTAGATTGGTTTCAGTTACATGACTATGACCAGAAGAGGCTG**ACGT**TTGTGAAAATTAAGGTAAGCTGTTCATGC
ATGTCATATCTTTATTTCCCTAGGATAAATCTATTAGTACAAGTTTGCTGTCTTAGATCTAATAGATGCCATTGCACCAAATGCA
GTCCGTCAAGAAATGATCAAGAGAGAGCACTTGACTGATGAGGACAACTGAACAATGCTAAGTAAGCCCTCTGGTCTCTG
AGACCACAGCGATCTGCTCGTGCCCTGCAGGGACACTCTTACCTTTTAAAGTACAATTTCTGTGGGAATATGGTTTTAA
AAGTCCTTAGCCCTTTTATTAAGTTAATCATATATATATATATATATATATAAAATCTGCTGTTAAAAAGAACAAATGGAAG
ATAACAGATGCTAAGATGCTTCTCTTTCTTTTAAAGATACGCCATTTACAGTTGCTCGGAAGATCGGTGCCCGGATATACGCGC
TGCCTGACGACCTCGTGAAGTGAAGCCGAAGATGGTGATGACTGTGTTTGCCTGCTTAATGGGGAAAGGATTGAACAGACT
GAAATAATGAAGCGTTTACTGTGATCTGCCACACTGTACGCACCAA**ACGT**CTCAGTTTACAGAAATTTGAAATGTAGTGGGTA
TAAAATCCGAATATCTGTATGCTCAAAATAGTTCTGTATCCAGCAATGAAGAATATCTTGCCATACCAGTTAGAATTTGTCA
ATCTTTTTTTTTTTTTTTGGATAACACAATTACCTTAACAATCAATACCAATGCAGGAATGTCTTATCAAGCTGCTATTTTATA
ATTAAATTATTTTATTTCTAAGAGTCTTAACCAAAATAAGACTAATCATTCTTTTTCATGGCTCAAAAAAGACCTGTATAAAG
TTTTGTCAGGTCCTTCTATTAAATGTGTTTGGATTTTTTTTTTTTGTATGTGTTGTTAAATTTTGATTAATAAAAAAATGTAC
CTAAAGTCATAATCTAATCCTTTTGGTTTTTCTCCCTTTACGTGTGTAAGTGATCTAAAATTTCTGTAAATTTCTATA
TGACATAAAAAATTAAGGGATAAATATAATCCATCAACATTAACATTTTAAATACGAGAACTAACTCTTGAATAACCCCC**A**
CGTCTACTCTCTTGTAAAGCTGTAGGAGATTTTACTTACAGTTTGTGTAGCTCCATTGTTACTTCACATGTGCTAGTCTGA
TAACACAGCTTTGTCTCCAGCATCACATGTGCTAGTCTGATAACACAGCTTTGTCTCCACCATCAAGCATAATACTATATGTTG
GTAGGATGTTACACATATGTATTTCTAAGTCATCTGAGTTACCCACCTTTCTAAAATGGTATGTATTAAGTGGTCAGCCAG
CCGTTAAGTATTTATTTTGGCCCCACAATGTGTGACACTTTTCAATTGTGGGATAATCTGATCTGTGGAGATCTGTTTTCGAA
ATATTAATCTGAATGTGAATATCGTTATTTTACCTAAGTCTTTCAAATACTTTTCAGCCAAACATTGGATAGAATGTCT
AAGTCACACCAATCTATCTGTAGATCACATCACACTTACTACTCTCAGGCTACAGGGAAACCTACATCACTGGACATGC
CCACCAAAATGGCTTCTGTAGAGATCTGTGATATAAAGCTAATGTCGCTGCTAGTTTTTCATGGTCTCCTGGAACAGATTGA
GGTTGTGTCTCTTTTCCCCAGAAGTTTAGCATAGAGAAATCTGCTCATAGTTGAAGCCAGGAATGAGCTCCCGG
CCCTCCACTTTAGTGCCAGTGAGCAATAGTGCTATGCAAGGAAAGTGCTGTACCTCTCTCCGTGTGAATGGGTTGTCCGCCT
CCTCCTTGTCCACTGATCAGAACATACAGCAGGAGGGAGAGTGCTGTGTGTTAGGGTAGACTTTTATAAATGAAGTACTGA
CAGGTGGGATTCTGAAATATATTCTTCTACATGAAATGTCTTCCGCTTTTATATTTGGTGATTGTTTTCTTATATGAAGACAC
AATGCTTCCGCTCCTTTCCGTGAGATTATTTAAATCAAAACCTCTCTGATTTTCCCGCTGTCTATATTCTAAAACAATCTGAAT
ACATGGAATTTAGCACTTTAAGGTGTCTTTTTCTCACGAAATATATTTAATAAAAAATGCTGTGTATGTAGAATTTGTGTTTAT
TTCATTTAAAGAATAGAGAACCTTCAATACTGATCTGTAGAAAGCTTATTTCCCTCACAAAAGACTGCAACTCCTATGTGAAGT
AACACAAAAGCTGTTTCTTTAGTGTTTTTCTTTTATAGAGAAAAAATTAATTTCTAAAATTTCTAGTGTTTTTATTATCATTTGT
ATGTATGGATACATATCATGTGTATGGCATGCTTACATGTGATGTGTAATGTCCCAATTTATGCCCCGTGAGCAGTTTGTCTGTA
ACACCTTCATGGGAATCGAACTCAGGGCTCAGGTTTGAACAACAGCACTCTTATCCACTAAGCCATCTCACCAGCCCTCAT
ATGAAGATTAATAAAAAAAAAAAGACAACTGCGTGATTGTTATAAACTTAGTTTGTGATGAAATCATTGTAGTGGATAAAA
TAATTAGCATTAATTTATTGTCTCCAGTGCCAAGTACCACAAGTAGATTCTTGACCTCAGCTAAGACAAGTAGAAACAGCC
TTTTGACTTACATCCTAGTAGAGACGGCCAGCCAATAAAGCAACAAGAAATGAAGCAGGGAAGAAACCGAGAGACCAT
TGGAGTGGGGGAGATTGCTGTCAGACTGACTGAAGCAGAGGGGAGGTTTCTGGGTAGCGAGGTACCGGCTCTGTGAGG
AAAAGCAATCGAGTGGGCGCCATGAAAAAGAGACAGATGTGCTCCTCGGGAGTAAAGGGAGGAGAACATGAAAAATATCAG
TAGCATCCTACTTGTAGGACTAGATCTAAATCTGAGTTCTTTCCCTCTCTGGCTGGAGTTGTGATTCTCTTTTGGTTTCTGT
TTTGTGTGCTGTGACTTGATGGAGTTGCTTAGAGTAATATGCCACTTTTGAAGTTTGTGAATACCATTGTTTCATCATAACTCCA
ATAGTATGATACATATCATGTATGTGTAAGTATGTAGTATGTTAGTAATGTCCCAATTTATGCCCCGTGAGCAGTTTGTCTGTA
TCGGAGACAATCCAAAAGCCTGCATTATAATTATCAGCTTGCTGAAGTAGGCTCTCTAGTGCTTTGGAAGGTCTCTTAAGAT
TACTACCAAAAGAGGGTTGGAATTCCTCCAGTCTTAGAAAAGTAATCCAGTCCCATAGTTCTTTGGATAAAGAACTGTGTATG
GCTGTGAGTCATTTGAGTTAACTTCAAATACTGAAATTTAGATAGCGCAGGATTAGATTTCTACTCTGGCTAAACATTTTGC
TGAGCAACAAAGAGGTGCATATACAAATGTATGGGCGCTCCTCTCCCACTGGCTTCACCTTGAGCCTCTTGGAATTTTCA
CCAAACTCATAAATTTGGAAGTGTATTAACATTACACGACAACGGGGAGATCATTTAGAAACAAAACTGGAGCAACTTGA
GATTATCATTTTACATCAAATACAGAAA**ACGT**TTGAAAAGATGACTTCGACATCAAAGACTTTTAGAGAATATCTAAAGAGAA
CATTTGATTTTAAAGAAATAGTAAGTTAAATGTTGAAAAGAGAACTAATGGGACAAAGTAGCCTGAATAGCAGAGGCAGTATT
CCCCTGAAATTTAAGTACATTTATCCATTGCTTTAAAGTAACTAATCTTAA**ACGT**AGAGTTTCAAGATTTTCCCTCTTGTGAC
TGCAGGAAGCAATTAATAATTATTGAAAAGATGCAGTTTTCAGATCGCATTTTGGTGG**ACGT**CAGACAATTGTTGTCTAAATA
GCGAATCTCTTAAATTAGATAGGATAAATAACGAATCCACTAAAAGGACTTGTATGGCGAGTAACCTCTAAACTGTGCTT
ATGCAACGGTTATAGGTGCGCTTTGACTTACATGCCAATACTTTTATAGTGACTTTGGAAATATCAGGAATGTTAGACCATAT
TAAATCACAAAGATTGTTTAAAAACGCCTTTAGGAACGAGGAACTGTAAACACAACTCCATAATCAGGTTGCTTTGGCCA
GGCTTTAGGACAATTCGTACAGGATTCAAGTAA**ACGT**TAATCCTTCAGAAAGCTCCTTGGCCCTTTTCTGTGCTGCAGTAGC
AGCAGCAGCACAAACAGGCAGCGGATAAAATTACCTGAAATCCGCCACCAAGCGGTTCCCATGCCCTCAGGTGCTCAAAGAT
GCTGCAGACGCGCCCAAGATGCTAGGCGACCGACAGAGAGCGCGTACAGCCTGGAGCCCCGCCCTACAAGCCCCGCCCT
TAGCCCCGCTTCGCTTAAAGCCCCGCCCGGTGCTGCGCTCCGCGGGGCTGAGGATG**ACGT**GAGGAGAAAGCCGCGAACCC
TCTGCTCCTGTGGGTGCTGCTGGGCCAGCGGTTCCACAGCCCCGGAGCCAG**ACGT**GCTGCGAAGCCGACCCCGAGCTCT
CCGGCCGGCGGCCCTCACTCCCTCCAGGCGGGCGCTCCTGTGCGGCCCTGCGGCTCCTGGCACGGCCCCGCGCTCG
GCTGCGGCCCTGGCGCGCTCCACTCTGTCTCCCGGACGGGCGCGGACAGCTCGACCGGGGCGCGCGGCTGGGCAGAG
GGCGCTGGCCCCGGGGCGGCCAGCGCGGCCACCAACCTGGGGCTGTCCGTGGAGGGCGAGTGCTGTTTTCGGGGCGAGGC
GACGCCCTTCGGGGCCACGGGCGCCAGCCGATGTGGCGGTGGGAACGACTACCCGTTTTCCAGCTCGGGGTCTGGGGTGC
GGGTCTGGCGCCC**ATG**GGGGCCCCGCCTCCGTCTCCTGGCCTGCCCCGTCGTGGGCCGCGA-3'

8 cDNA-Microarray-Analyse

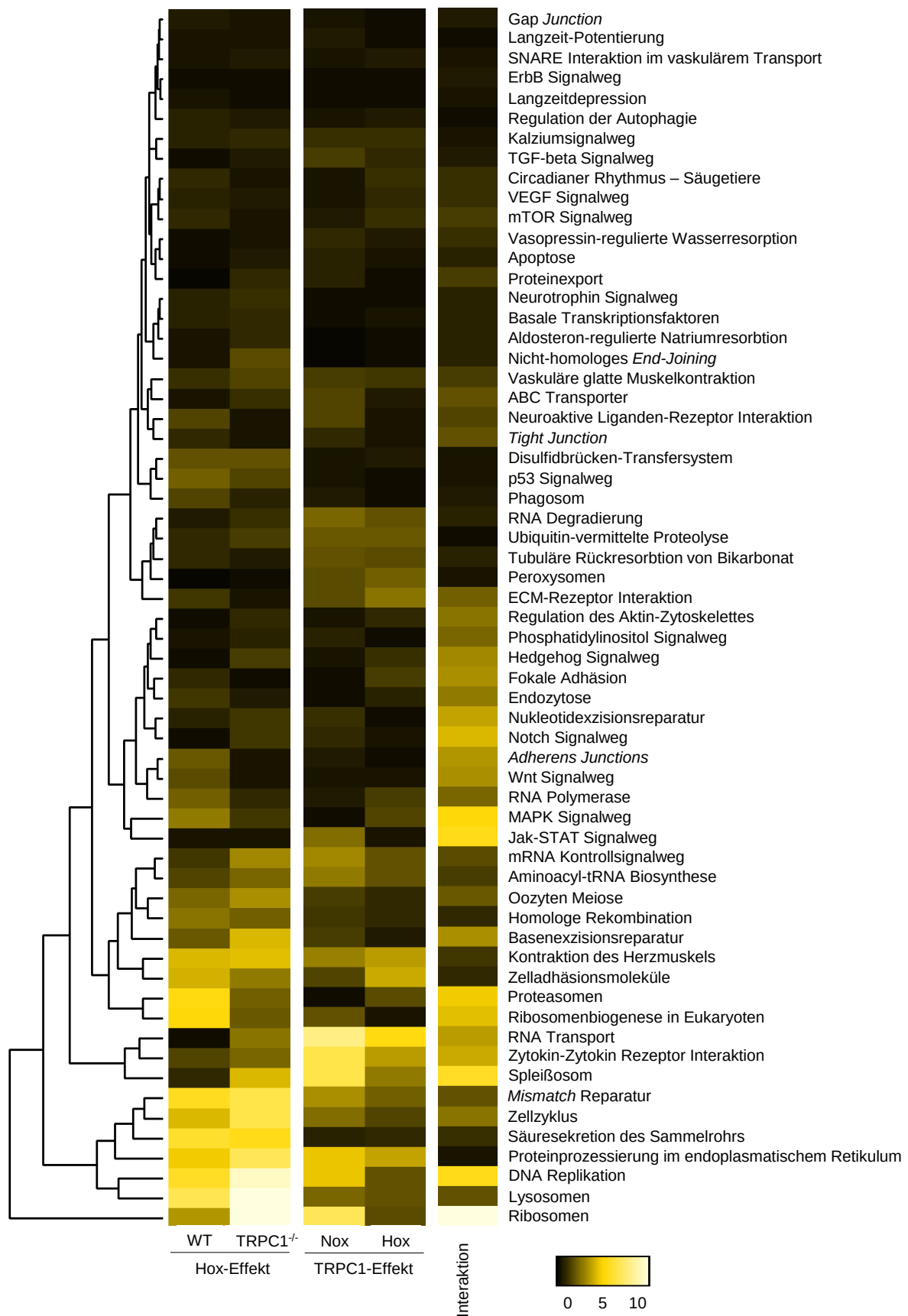


Abbildung 63: cDNA-Microarray Analyse dargestellt als Heatmap der 50 am stärksten regulierten Signalwege.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Diffusionsbarriere.	2
Abbildung 2: Schematischer Vergleich des Lungenaufbaues der Maus und des Menschen.	3
Abbildung 3: Aufbau von großen, kleinen und kapillaren Gefäßen.	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der HPV.	7
Abbildung 5: Einfluss von akuter Hypoxie auf die pulmonalen Arterien.	8
Abbildung 6: Einfluss von Hypoxie auf den pulmonalen vaskulären Widerstand.	8
Abbildung 7: Einfluss von chronischer Hypoxie auf pulmonale Arterien.	9
Abbildung 8: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Gefäßveränderung in der PH.	17
Abbildung 9: HIF-1 α im Zusammenhang mit CHPH.	18
Abbildung 10: Phylogenetischer Baum der TRP-Superfamilie.	23
Abbildung 11: Aufbau von TRPC- und TRPC-haltigen Kanälen.	25
Abbildung 12: Schematische Übersicht über die geplanten Versuche.	28
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Versuchstiergruppen und der Ablauf des Versuchs.	55
Abbildung 14: Isolierung von PASMC aus der Mauslunge.	60
Abbildung 15: Murine PASMC nach der Isolation.	61
Abbildung 16: Murine PAEC nach Isolation.	62
Abbildung 17: Experimenteller Aufbau des Migrationsassays.	65
Abbildung 18: Verlauf der Migration innerhalb von 12 Stunden.	66
Abbildung 19: Schematische Darstellung der chemischen Reaktion bei Verwendung von 5'-Ethynyl-2'-Desoxyuridin.	67
Abbildung 20: Schematische Darstellung der durchgeführten Proliferationsassays.	68
Abbildung 21: Hochauflösende Fotos zur Demonstration der Methode der Proliferationsuntersuchung.	69
Abbildung 22: Fluoreszenzintensitäts-Spektrum in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration.	72
Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf und erwartete Reaktion der mPASMC auf 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycrol.	73
Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf und erwartete Reaktion der mPASMC auf Cyklopiazonsäure.	74
Abbildung 25: TRPC mRNA-Expression in Mauslungen und kleinen Lungengefäßen in chronischer Hypoxie.	86
Abbildung 26: TRPC mRNA-Expression in mPASMC in chronische Hypoxie.	88
Abbildung 27: TRPC1-Antikörper Tests in murinen homogenisierten Lungen und isolierten mPASMC.	89
Abbildung 28: Einfluss von chronischer Hypoxie auf die TRPC1 mRNA-Expression in Ratten und in humanen PASMC.	90
Abbildung 29: PCR Analyse der verwendeten transgenen TRPC1 Mäuse.	90
Abbildung 30: Akute und anhaltende Phase der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion in isolierten, ventilerten und blutfrei-perfundierten Mauslungen.	91
Abbildung 31: Auswirkung von chronischer Hypoxie auf den RVSP und Rechtsherzhypertrophie.	92
Abbildung 32: Darstellung des Effekts von TRPC1 Verlust auf die Muskularisierung von kleinen, mittleren und großen Gefäßen unter chronischer Hypoxie.	93
Abbildung 33: Proliferation von WT und TRPC1 ^{-/-} mPASMC unter chronischer Hypoxie.	95
Abbildung 34: Proliferation von mPASMC nach knockdown von TRPC1 unter chronischer Hypoxie.	96
Abbildung 35: Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Migration von murinen PASMC.	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 36: Einfluss von TRPC1 in mPASC auf die Apoptoserate unter chronischer Hypoxie.....	98
Abbildung 37: Effekt der chronischen Hypoxie auf den Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom (ROCE) in mPASC unter chronische Hypoxie.	100
Abbildung 38: Einfluss von TRPC1 auf den ROCE in mPASC unter chronische Hypoxie.....	101
Abbildung 39: Effekt von chronischer Hypoxie auf Speicher-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom (SOCE).	103
Abbildung 40: Einfluss von TRPC1 auf SOCE in mPASC unter chronische Hypoxie.	104
Abbildung 41: Expression von Ki67 und Cyclin D1 in WT mPASC unter chronischer Hypoxie.	105
Abbildung 42: Der Effekt von chronischer Hypoxie auf die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 in WT mPASC.	105
Abbildung 43: Der Effekt von chronischer Hypoxie auf die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 in homogenisierten Mäusen.	106
Abbildung 44: Effekt der chronischen Hypoxie auf α -SMA Expression in mPASC.	107
Abbildung 45: Effekt von chronischer Hypoxie auf pro- und anti-apoptischen Protein in WT mPASC.	107
Abbildung 46: Einfluss von TRPC1 auf Ki67 und Cyclin D1 Expression unter chronischer Hypoxie.	108
Abbildung 47: Einfluss von TRPC1 auf die Phosphorylierung der pro-proliferativen Proteine Erk1/2 und p38 in mPASC unter chronischer Hypoxie.....	108
Abbildung 48: Einfluss von TRPC1 auf die Phosphorylierung der pro-proliferativen Proteine Erk1/2 und p38 sowie auf die Expression von Cyclin D1 in homogenisierten Mäusen unter chronischer Hypoxie.	109
Abbildung 49: Einfluss von TRPC1 auf die Expression von α -SMA in mPASC unter chronischer Hypoxie.	110
Abbildung 50: Einfluss von TRPC1 auf pro- und anti-apoptische Genexpression in mPASC unter chronischer Hypoxie.	110
Abbildung 51: Effekt von HIF-1 α auf die TRPC1-Expression unter chronischer Hypoxie.....	111
Abbildung 52: HRE-Bindestellen im TRPC1 Promotor.	111
Abbildung 53: Einfluss von VEGF, PDGF, EGF und IGF-1 auf die TRPC1-Expression in mPASC.	112
Abbildung 54: Einfluss von TGF- β 1 und TNF α auf die TRPC1-Expression in mPASC.....	112
Abbildung 55: TNF- α und TGF- β 1 Produktion unter chronischer Hypoxie.....	113
Abbildung 56: Einfluss von TGF- β 1 Stimulation auf die HIF-1 α Stabilität sowie Ki67- und Cyclin D1-Expression in mPASC unter chronischer Hypoxie.	114
Abbildung 57: Einfluss von HIF-1 α und TGF- β 1 auf die Proliferation von mPASC unter chronischer Hypoxie.	114
Abbildung 58: Einfluss von TGF- β 1 auf die Phosphorylierung von Smad2/3, p38 und Erk1/2 in isolierten mPASC unter chronischer Hypoxie.....	115
Abbildung 59: Effekt von chronischer Hypoxie sowie Einfluss von TRPC1 auf die Phosphorylierung von Smad2/3 in mPASC.....	116
Abbildung 60: Einfluss TRPC1 auf die Entstehung der CHPH.	122
Abbildung 61: TRPC1-assoziierte Kationenkanäle regulieren den Ca^{2+} -Haushalt über Rezeptor-aktivierte Signalwege unter chronischer Hypoxie.....	127
Abbildung 62: TGF- β 1 und der Hypoxie führen zur Stabilisierung von HIF-1 α und induzieren die TRPC1-Expression.....	134
Abbildung 63: cDNA-Microarray Analyse dargestellt als Heatmap der 50 am stärksten regulierten Signalwege.	146

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der PH (2013, Nizza, verändert nach Simonneau et al. ¹).....	11
Tabelle 2: Reaktionsprotokoll der PCR zur Genotypisierung von TRPC1 Mäusen.....	53
Tabelle 3: Aktenzeichen und Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen.	54
Tabelle 4: Protokoll der EdU-Färbung.....	69
Tabelle 5: Protokoll der BrdU-Färbung.	70
Tabelle 6: Protokoll der Doppelfärbung.....	75
Tabelle 7: Reaktionsprotokoll der Reverse Transkriptions-PCR.	78
Tabelle 8: Reaktionsprotokoll der RTqPCR.	79

11 Formelverzeichnis

Formel 1: Formel zur Berechnung des Fulton-Index als Maß für Rechtsherzhypertrophie.	57
Formel 2: Formel zur Berechnung der Zellmigration.	66
Formel 3: Berechnung der DNA-Syntheserate (Proliferationsrate).	70
Formel 4: Formel zur Berechnung der Ct-Werte.	79

12 Literaturverzeichnis

- 1) Simonneau, G.; Gatzoulis, M. A.; Adatia, I.; Celermajer, D.; Denton, C.; Ghofrani, A.; Gomez Sanchez, M. A.; Krishna Kumar, R.; Landzberg, M.; Machado, R. F.; Olschewski, H.; Robbins, I. M.; Souza, R. (2013): Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* (25), 34–41.
- 2) Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Wilkins, M. R.; Grimminger, F. (2011): Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews. Cardiology* (8), 443–455.
- 3) Pugliese, S. C.; Poth, J. M.; Fini, M. A.; Olschewski, A.; El Kasmi, K. C.; Stenmark, K. R. (2015): The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (3), 229–252.
- 4) Renz-Polster, H.; Krautzing, S.; Braun, J. (2004): Basislehrbuch Innere Medizin. 3. Aufl.: Urban und Fischer, S. 413–417.
- 5) Heldmaier, G.; Neuweiler, G. (2004): Vergleichende Tierphysiologie. Vegetative Physiologie: Springer, S. 187–193; 202; 272–277; 285; 292.
- 6) Greten, H.; Rinninger, F.; Greten, T. (2010): Innere Medizin. 13. Aufl.: Thieme Verlag, S. 404.
- 7) König, H. E.; Liebich, H.-G.; Bragulla, H. (2007): Veterinary anatomy of domestic mammals. Textbook and Colour Atlas. 3. Aufl.: Schattauer. Stuttgart, New York, S. 369–390.
- 8) Yu, Y.; Fantozzi, I.; Remillard, C. V.; Landsberg, J. W.; Kunichika, N.; Platoshyn, O.; Tigno, D. D.; Thistlethwaite, P. A.; Rubin, L. J.; Yuan, J. X. (2004): Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (38), 13861–13866.
- 9) Moudgil, R.; Michelakis, E. D.; Archer, S. L. (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* (8), 615–632.
- 10) Mandegar, M.; Yuan, J. (2002): Role of K⁺ channels in pulmonary hypertension. *Vascular Pharmacology* (1), 25–33.
- 11) Yuan, X. J.; Wang, J.; Juhaszova, M.; Gaine, S. P.; Rubin, L. J. (1998): Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet* (9104), 726–727.

Literaturverzeichnis

- 12) Weissmann, N.; Dietrich, A.; Fuchs, B.; Kalwa, H.; Ay, M.; Dumitrascu, R.; Olschewski, A.; Storch, U.; Mederos y Schnitzler, M.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Pinkenburg, O.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Gudermann, T. (2006): Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (50), 19093–19098.
- 13) Olschewski, A.; Weir, E. K. (2015): Redox regulation of ion channels in the pulmonary circulation. *Antioxidants and Redox Signaling* (6), 465–485.
- 14) Davidson, A.; Bossuyt, A.; Dab, I. (1989): Acute effects of oxygen, nifedipine, and diltiazem in patients with cystic fibrosis and mild pulmonary hypertension. *Pediatric Pulmonology* (1), 53–59.
- 15) Adamali, H.; Gaine, S. P.; Rubin, L. J. (2009): Medical treatment of pulmonary arterial hypertension. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* (4), 484–492.
- 16) Agostoni, P.; Doria, E.; Galli, C.; Tamborini, G.; Guazzi, M. D. (1989): Nifedipine reduces pulmonary pressure and vascular tone during short- but not long-term treatment of pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *The American Review of Respiratory Disease* (1), 120–125.
- 17) Baba, Y.; Kurosaki, T. (2009): Physiological function and molecular basis of STIM1-mediated calcium entry in immune cells. *Immunological Reviews* (1), 174–188.
- 18) Fox, J. G.; Barthold, S.; Davisson, M. (2006): The Mouse in Biomedical Research. Normative Biology, Husbandry, and Models. 2. Aufl.: Elsevier professional, S. 50.
- 19) Deng, X.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Soboloff, J.; Gill, D. L. (2009): STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. *The Journal of Biological Chemistry* (34), 22501–22505.
- 20) Perrin, W. F.; Wursig, B.; Thewissen, J. G. (2008): Encyclopedia of Marine Mammals. 2. Aufl.: Elsevier professional, S. 30.
- 21) Fernandez, R. A.; Sundivakkam, P.; Smith, K. A.; Zeifman, A. S.; Drennan, A. R.; Yuan, J. X. (2012): Pathogenic role of store-operated and receptor-operated Ca^{2+} channels in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Signal Transduction*, 1–16.
- 22) Lemmon, M. A.; Schlessinger, J. (2010): Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* (7), 1117–1134.
- 23) Seet, B. T.; Dikic, I.; Zhou, M.-M.; Pawson, T. (2006): Reading protein modifications with interaction domains. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* (7), 473–483.

Literaturverzeichnis

- 24) Rock, J. R.; Randell, S. H.; Hogan, B. (2010): Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Disease Models and Mechanisms* (9-10), 545–556.
- 25) Zheng, L.; Stathopulos, P. B.; Schindl, R.; Li, G.; Romanin, C.; Ikura, M. (2011): Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (4), 1337–1342.
- 26) Liou, J.; Kim, M. L.; Heo, W. D.; Jones, J. T.; Myers, J. W.; Ferrell, J. E., JR; Meyer, T. (2005): STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current Biology* (13), 1235–1241.
- 27) Larsen, R.; Ziegenfuß, T. (1999): *Beatmung. Grundlagen und Praxis*. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg.
- 28) Cahalan, M. D. (2009): STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nature Cell Biology* (6), 669–677.
- 29) Golovina, V. A.; Platoshyn, O.; Bailey, C. L.; Wang, J.; Limsuwan, A.; Sweeney, M.; Rubin, L. J.; Yuan, J. X. (2001): Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca(2+) entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* (2), 746–755.
- 30) Sweeney, H. L.; Yang, Z.; Zhi, G.; Stull, J. T.; Trybus, K. M. (1994): Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (4), 1490–1494.
- 31) Anderhuber, F.; Pera, F.; Streicher, J. (2003): *Waldeyer - Anatomie des Menschen*. 17. Aufl. Berlin/Boston: Walter De Gruyter GmbH & Co.KG, S. 52–56.
- 32) Schmidt, R. F.; Thews, G. (1997): *Physiologie des Menschen*. Siebenundzwanzigste, korrigierte und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg, S. 518–519.
- 33) Yuan, J. P.; Zeng, W.; Huang, G. N.; Worley, P. F.; Muallem, S. (2007): STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature Cell Biology* (6), 636–645.
- 34) Huang, G. N.; Zeng, W.; Kim, J. Y.; Yuan, J. P.; Han, L.; Muallem, S.; Worley, P. F. (2006): STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nature Cell Biology* (9), 1003–1010.

Literaturverzeichnis

- 35) Lopez, J. J.; Salido, G. M.; Pariente, J. A.; Rosado, J. A. (2006): Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *The Journal of Biological Chemistry* (38), 28254–28264.
- 36) Sundivakkam, P. C.; Freichel, M.; Singh, V.; Yuan, J. P.; Vogel, S. M.; Flockerzi, V.; Malik, A. B.; Tirupathi, C. (2012): The Ca^{2+} sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) is necessary and sufficient for the store-operated Ca^{2+} entry function of transient receptor potential canonical (TRPC) 1 and 4 channels in endothelial cells. *Molecular Pharmacology* (4), 510–526.
- 37) Kim, M. S.; Zeng, W.; Yuan, J. P.; Shin, D. M.; Worley, P. F.; Muallem, S. (2009): Native Store-operated Ca^{2+} Influx Requires the Channel Function of Orai1 and TRPC1. *The Journal of Biological Chemistry* (15), 9733–9741.
- 38) Liao, Y.; Erxleben, C.; Abramowitz, J.; Flockerzi, V.; Zhu, M. X.; Armstrong, D. L.; Birnbaumer, L. (2008): Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (8), 2895–2900.
- 39) Liao, Y.; Erxleben, C.; Yildirim, E.; Abramowitz, J.; Armstrong, D. L.; Birnbaumer, L. (2007): Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (11), 4682–4687.
- 40) Cheng, K. T.; Liu, X.; Ong, H. L.; Ambudkar, I. S. (2008): Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels. *The Journal of Biological Chemistry* (19), 12935–12940.
- 41) Junqueira, L. C.; Carneiro, J. (2005): Basic histology. Text & atlas. 11. Aufl. New York: McGraw-Hill Medical Publishing.
- 42) Loscalzo, J.; Harrison, T. R. (2010): Harrison's cardiovascular medicine. New York: McGraw-Hill Medical.
- 43) Sukriti, S.; Tauseef, M.; Yazbeck, P.; Mehta, D. (2014): Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulmonary Circulation* (4), 535–551.
- 44) Cleaver, O.; Melton, D. A. (2003): Endothelial signaling during development. *Nature Medicine* (6), 661–668.
- 45) Von Euler, U.; Liljestrand, G. (1946): Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiologica Scandinavica* (12), 301–320.

Literaturverzeichnis

- 46) Alicia, S.; Angelica, Z.; Carlos, S.; Alfonso, S.; Vaca, L. (2008): STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts. *Cell Calcium* (5), 479–491.
- 47) Jardin, I.; Lopez, J. J.; Salido, G. M.; Rosado, J. A. (2008): Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca²⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry* (37), 25296–25304.
- 48) Jardin, I.; Gomez, L. J.; Salido, G. M.; Rosado, J. A. (2009): Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca(2+) entry pathways. *The Biochemical Journal* (2), 267–276.
- 49) Yuan, J. P.; Zeng, W.; Dorwart, M. R.; Choi, Y.-J.; Worley, P. F.; Muallem, S. (2009): SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature Cell Biology* (3), 337–343.
- 50) Sylvester, J. T.; Harabin, A. L.; Peake, M. D.; Frank, R. S. (1980): Vasodilator and constrictor responses to hypoxia in isolated pig lungs. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology* (5), 820–825.
- 51) Weissmann, N.; Grimminger, F.; Walmrath, D.; Seeger, W. (1995): Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respiration Physiology* (2), 159–169.
- 52) Weissmann, N.; Akkayagil, E.; Quanz, K.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Fink, L.; Hänze, J.; Rose, F.; Seeger, W.; Grimminger, F. (2004): Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respiratory Physiology and Neurobiology* (2), 191–202.
- 53) Fedde, M. R. (1998): Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science* (8), 1130–1138.
- 54) Skovgaard, N.; Abe, A. S.; Andrade, D. V.; Wang, T. (2005): Hypoxic pulmonary vasoconstriction in reptiles: a comparative study of four species with different lung structures and pulmonary blood pressures. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (5), 1280–1288.
- 55) Lee, K. P.; Yuan, J. P.; Hong, J. H.; So, I.; Worley, P. F.; Muallem, S. (2010): An endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs. *FEBS Letters* (10), 2022–2027.
- 56) Liao, Y.; Plummer, N. W.; George, M. D.; Abramowitz, J.; Zhu, M. X.; Birnbaumer, L. (2009): A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (9), 3202–3206.

Literaturverzeichnis

- 57) Ong, H. L.; Cheng, K. T.; Liu, X.; Bandyopadhyay, B. C.; Paria, B. C.; Soboloff, J.; Pani, B.; Gwack, Y.; Srikanth, S.; Singh, B. B.; Gill, D. L.; Gill, D.; Ambudkar, I. S. (2007): Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *The Journal of Biological Chemistry* (12), 9105–9116.
- 58) Olson, K. R.; Russell, M. J.; Forster, M. E. (2001): Hypoxic vasoconstriction of cyclostome systemic vessels: the antecedent of hypoxic pulmonary vasoconstriction? *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (1), 198–206.
- 59) Nilsell, O. (1951): The influence of blood gases on the pulmonary vessels of the cat. *Acta Physiologica Scandinavica* (1), 85–90.
- 60) Sylvester, J. T.; Shimoda, L. A.; Aaronson, P. I.; Ward, J. P. (2012): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiological Reviews* (1), 367–520.
- 61) Bolotina, V. M.; Csutora, P. (2005): CIF and other mysteries of the store-operated Ca^{2+} -entry pathway. *Trends in Biochemical Sciences* (7), 378–387.
- 62) Ismail, H. M.; Dorchie, O. M.; Perozzo, R.; Strosova, M. K.; Scapozza, L.; Ruegg, U. T. (2013): Inhibition of iPLA2 beta and of stretch-activated channels by doxorubicin alters dystrophic muscle function. *British Journal of Pharmacology* (7), 1537–1550.
- 63) Park, K. M.; Trucillo, M.; Serban, N.; Cohen, R. A.; Bolotina, V. M. (2008): Role of iPLA2 and store-operated channels in agonist-induced Ca^{2+} influx and constriction in cerebral, mesenteric, and carotid arteries. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* (3), 1183–1187.
- 64) Clapham, D. E. (2003): TRP channels as cellular sensors. *Nature* (6966), 517–524.
- 65) Pan, Z.; Yang, D.; Nagaraj, R. Y.; Nosek, T. A.; Nishi, M.; Takeshima, H.; Cheng, H.; Ma, J. (2002): Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking $\text{mg}29$. *Nature Cell Biology* (5), 379–383.
- 66) Sommer, N.; Dietrich, A.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Gudermann, T.; Schulz, R.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Weissmann, N. (2008): Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *The European Respiratory Journal* (6), 1639–1651.
- 67) Audi, S. H.; Dawson, C. A.; Rickaby, D. A.; Linehan, J. H. (1991): Localization of the sites of pulmonary vasomotion by use of arterial and venous occlusion. *Journal of Applied Physiology* (5), 2126–2136.

Literaturverzeichnis

- 68) Hakim, T. S.; Michel, R. P.; Minami, H.; Chang, H. K. (1983): Site of pulmonary hypoxic vasoconstriction studied with arterial and venous occlusion. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology* (5), 1298–1302.
- 69) Bradford, J. R.; Dean, H. P. (1894): The Pulmonary Circulation. *The Journal of Physiology* (1-2), 34–158.
- 70) Malczyk, M.; Veith, C.; Schermuly, R. T.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Sommer, N.; Weissmann, N.; Pak, O. (2016): NADPH oxidases-do they play a role in TRPC regulation under hypoxia? *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* (1), 23–41.
- 71) Knock, G. A.; Snetkov, V. A.; Shaifta, Y.; Drndarski, S.; Ward, J. P.; Aaronson, P. I. (2008): Role of src-family kinases in hypoxic vasoconstriction of rat pulmonary artery. *Cardiovascular Research* (3), 453–462.
- 72) Ward, J. P.; Robertson, T. P. (1995): The role of the endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Experimental Physiology* (5), 793–801.
- 73) Leach, R. M.; Robertson, T. P.; Twort, C. H.; Ward, J. P. (1994): Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *The American Journal of Physiology* (3), 223–231.
- 74) Stuehr, D. J.; Fasehun, O. A.; Kwon, N. S.; Gross, S. S.; Gonzalez, J. A.; Levi, R.; Nathan, C. F. (1991): Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *Federation of American Societies for Experimental Biology* (1), 98–103.
- 75) Tang, C.; To, W. K.; Meng, F.; Wang, Y.; Gu, Y. (2010): A role for receptor-operated Ca^{2+} entry in human pulmonary artery smooth muscle cells in response to hypoxia. *Physiological Research/ Academia Scientiarum Bohemoslovaca* (6), 909–918.
- 76) Xia, Y.; Yang, X.-R.; Fu, Z.; Paudel, O.; Abramowitz, J.; Birnbaumer, L.; Sham, J. S. K. (2014): Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions. *Hypertension* (1), 173–180.
- 77) Ward, J. P.; McMurtry, I. F. (2009): Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. *Current Opinion in Pharmacology* (3), 287–296.
- 78) Stroud, R. C.; Rahn, H. (1953): Effect of O_2 and CO_2 tensions upon the resistance of pulmonary blood vessels. *The American Journal of Physiology* (1), 211–220.
- 79) Fishman, A. P.; Fritts, H. W.; Cournand, A. (1960): Effects of acute hypoxia and exercise on the pulmonary circulation. *Circulation*, 204–215.

Literaturverzeichnis

- 80) Dumas, J. P.; Bardou, M.; Goirand, F.; Dumas, M. (1999): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *General Pharmacology* (4), 289–297.
- 81) Nisbet, R. E.; Bland, J. M.; Kleinhenz, D. J.; Mitchell, P. O.; Walp, E. R.; Sutliff, R. L.; Hart, C. M. (2010): Rosiglitazone attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in a mouse model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (4), 482–490.
- 82) Weissmann, N.; Sommer, N.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Seeger, W.; Grimminger, F. (2006): Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovascular Research* (4), 620–629.
- 83) Dawson, C. A.; Grimm, D. J.; Linehan, J. H. (1978): Influence of hypoxia on the longitudinal distribution of pulmonary vascular resistance. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology* (4), 493–498.
- 84) Hillier, S. C.; Graham, J. A.; Hanger, C. C.; Godbey, P. S.; Glenny, R. W.; Wagner, W. W. (1997): Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *Journal of Applied Physiology* (4), 1084–1090.
- 85) Kato, M.; Staub, N. C. (1966): Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia. *Circulation Research* (2), 426–440.
- 86) Staub, N. C. (1985): Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* (4), 240–245.
- 87) Liu, J. Q.; Sham, J. S.K.; Shimoda, L. A.; Kuppusamy, P.; Sylvester, J. T. (2003): Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (2), 322–333.
- 88) Madden, J. A.; Vadula, M. S.; Kurup, V. P. (1992): Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *The American Journal of Physiology* (3), 384–393.
- 89) Murray, T. R.; Chen, L.; Marshall, B. E.; Macarak, E. J. (1990): Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (5), 457–465.
- 90) Waypa, G. B.; Marks, J. D.; Mack, M. M.; Boriboun, C.; Mungai, P. T.; Schumacker, P. T. (2002): Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circulation Research* (8), 719–726.
- 91) Michelakis, E. D.; Hampl, V.; Nsair, A.; Wu, X.; Harry, G.; Haromy, A.; Gurtu, R.; Archer, S. L. (2002): Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. *Circulation Research* (12), 1307–1315.

Literaturverzeichnis

- 92) Stenmark, K. R.; Fagan, K. A.; Frid, M. G. (2006): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circulation Research* (7), 675–691.
- 93) Mandegar, M.; Fung, Y.-C. B.; Huang, W.; Remillard, C. V.; Rubin, L. J.; Yuan, J. X. (2004): Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvascular Research* (2), 75–103.
- 94) Zhang, S.; Fantozzi, I.; Tigno, D. D.; Yi, E. S.; Platoshyn, O.; Thistlethwaite, P. A.; Kriett, J. M.; Yung, G.; Rubin, L. J.; Yuan, J. X. (2003): Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (3), 740–754.
- 95) Coppock, E. A.; Martens, J. R.; Tamkun, M. M. (2001): Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. Role of voltage-gated potassium channels. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (1), 1–12.
- 96) Cornfield, D. N.; Stevens, T.; McMurtry, I. F.; Abman, S. H.; Rodman, D. M. (1994): Acute hypoxia causes membrane depolarization and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *The American Journal of Physiology* (4), 469–475.
- 97) Olschewski, A.; Hong, Z.; Nelson, D. P.; Weir, E. K. (2002): Graded response of K⁺ current, membrane potential, and Ca²⁺ to hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (5), 1143–1150.
- 98) Harder, D. R.; Madden, J. A.; Dawson, C. (1985): Hypoxic induction of Ca²⁺-dependent action potentials in small pulmonary arteries of the cat. *Journal of Applied Physiology* (5), 1389–1393.
- 99) Savineau, J. P.; Gonzalez de la Fuente, P.; Marthan, R. (1995): Cellular mechanisms of hypoxia-induced contraction in human and rat pulmonary arteries. *Respiration Physiology* (2), 191–198.
- 100) Wheaton, W. W.; Chandel, N. S. (2011): Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (3), 385–393.
- 101) Roedding, A. S.; Tong, S. Y.; Au-Yeung, W.; Li, P. P.; Warsh, J. J. (2013): Chronic oxidative stress modulates TRPC3 and TRPM2 channel expression and function in rat primary cortical neurons: relevance to the pathophysiology of bipolar disorder. *Brain Research*, 16–27.
- 102) Robertson, T. P.; Hague, D.; Aaronson, P. I.; Ward, J. P. (2000): Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *The Journal of Physiology*, 669–680.

Literaturverzeichnis

- 103)** Touyz, R. M.; Briones, A. M.; Sedeek, M.; Burger, D.; Montezano, A. C. (2011): NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Molecular Interventions* (1), 27–35.
- 104)** Clapham, D. E.; Runnels, L. W.; Strubing, C. (2001): The TRP ion channel family. *Nature Reviews. Neuroscience* (6), 387–396.
- 105)** Montell, C.; Birnbaumer, L.; Flockerzi, V. (2002): The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* (5), 595–598.
- 106)** Liu, Q.; Sham, J. S.; Shimoda, L. A.; Sylvester, J. T. (2001): Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (5), 856–865.
- 107)** Aaronson, P. I.; Robertson, T. P.; Ward, J. P. (2002): Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respiratory Physiology and Neurobiology* (1), 107–120.
- 108)** Aaronson, P. I.; Robertson, T. P.; Knock, G. A.; Becker, S.; Lewis, T. H.; Snetkov, V.; Ward, J. P. (2006): Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. *The Journal of Physiology* (1), 53–58.
- 109)** Weigand, L.; Shimoda, L. A.; Sylvester, J. T. (2011): Enhancement of myofilament calcium sensitivity by acute hypoxia in rat distal pulmonary arteries. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (3), 380–387.
- 110)** Kizub, I. V.; Strielkov, I. V.; Shaifta, Y.; Becker, S.; Prieto-Lloret, J.; Snetkov, V. A.; Soloviev, A. I.; Aaronson, P. I.; Ward, J. P. (2013): Gap junctions support the sustained phase of hypoxic pulmonary vasoconstriction by facilitating calcium sensitization. *Cardiovascular Research* (3), 404–411.
- 111)** McNamara, P. J.; Murthy, P.; Kantores, C.; Teixeira, L.; Engelberts, D.; van Vliet, T.; Kavanagh, B. P.; Jankov, R. P. (2008): Acute vasodilator effects of Rho-kinase inhibitors in neonatal rats with pulmonary hypertension unresponsive to nitric oxide. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (2), 205–213.
- 112)** Oka, M.; Fagan, K. A.; Jones, P. L.; McMurtry, I. F. (2008): Therapeutic potential of RhoA/Rho kinase inhibitors in pulmonary hypertension. *British Journal of Pharmacology* (4), 444–454.
- 113)** Nagaoka, T.; Morio, Y.; Casanova, N.; Bauer, N.; Gebb, S.; McMurtry, I.; Oka, M. (2004): Rho/Rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (4), 665–672.

Literaturverzeichnis

- 114)** Robertson, T. P.; Aaronson, P. I.; Ward, J. P. (1995): Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca^{2+} in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca^{2+} sensitization. *The American Journal of Physiology* (1), 301–307.
- 115)** Voelkel, N. F.; Gomez-Arroyo, J.; Abbate, A.; Bogaard, H. J.; Nicolls, M. R. (2012): Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *The European Respiratory Journal* (6), 1555–1565.
- 116)** Peacock, A. J.; Murphy, N. F.; McMurray, J. J.; Caballero, L.; Stewart, S. (2007): An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *The European Respiratory Journal* (1), 104–109.
- 117)** Hachulla, E.; Gressin, V.; Guillemin, L.; Carpentier, P.; Diot, E.; Sibilia, J.; Kahan, A.; Cabane, J.; Francès, C.; Launay, D.; Mouthon, L.; Allanore, Y.; Tiev, K. P.; Clerson, P.; Groote, P. de; Humbert, M. (2005): Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis and Rheumatism* (12), 3792–3800.
- 118)** Mukerjee, D.; St George, D.; Coleiro, B.; Knight, C.; Denton, C. P.; Davar, J.; Black, C. M.; Coghlan, J. G. (2003): Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Annals of the Rheumatic Diseases* (11), 1088–1093.
- 119)** Galiè, N.; Hoeper, M. M.; Humbert, M.; Torbicki, A.; Vachiery, J.-L.; Barbera, J. A.; Beghetti, M.; Corris, P.; Gaine, S.; Gibbs, J. S.; Gomez-Sanchez, M. A.; Jondeau, G.; Klepetko, W.; Opitz, C.; Peacock, A.; Rubin, L.; Zellweger, M.; Simonneau, G. (2009): Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal* (6), 1219–1263.
- 120)** Humbert, M.; Sitbon, O.; Chaouat, A.; Bertocchi, M.; Habib, G.; Gressin, V.; Yaici, A.; Weitzenblum, E.; Cordier, J.-F.; Chabot, F.; Dromer, C.; Pison, C.; Reynaud-Gaubert, M.; Haloun, A.; Laurent, M.; Hachulla, E.; Simonneau, G. (2006): Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (9), 1023–1030.
- 121)** Tudor, R. M.; Abman, S. H.; Braun, T.; Capron, F.; Stevens, T.; Thistlethwaite, P. A.; Haworth, S. G. (2009): Development and pathology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* (1), 3–9.
- 122)** Pietra, G. G.; Capron, F.; Stewart, S.; Leone, O.; Humbert, M.; Robbins, I. M.; Reid, L. M.; Tudor, R. M. (2004): Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* (12), 25–32.

Literaturverzeichnis

- 123)** Humbert, M.; Morrell, N. W.; Archer, S. L.; Stenmark, K. R.; MacLean, M. R.; Lang, I. M.; Christman, B. W.; Weir, E. K.; Eickelberg, O.; Voelkel, N. F.; Rabinovitch, M. (2004): Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* (12), 13–24.
- 124)** Hassoun, P. M.; Mouthon, L.; Barbera, J. A.; Eddahibi, S.; Flores, S. C.; Grimminger, F.; Jones, P. L.; Maitland, M. L.; Michelakis, E. D.; Morrell, N. W.; Newman, J. H.; Rabinovitch, M.; Schermuly, R.; Stenmark, K. R.; Voelkel, N. F.; Yuan, J. X.; Humbert, M. (2009): Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* (1), 10–19.
- 125)** Morrell, N. W.; Adnot, S.; Archer, S. L.; Dupuis, J.; Jones, P. L.; MacLean, M. R.; McMurtry, I. F.; Stenmark, K. R.; Thistlethwaite, P. A.; Weissmann, N.; Yuan, J. X.; Weir, E. K. (2009): Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* (1), 20–31.
- 126)** Badesch, D. B.; Raskob, G. E.; Elliott, C. G.; Krichman, A. M.; Farber, H. W.; Frost, A. E.; Barst, R. J.; Benza, R. L.; Liou, T. G.; Turner, M.; Giles, S.; Feldkircher, K.; Miller, D. P.; McGoon, M. D. (2010): Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the reveal registry. *Chest* (2), 376–387.
- 127)** Davies, R. J.; Morrell, N. W. (2008): Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor. *Chest* (6), 1271–1277.
- 128)** Gaine, S. P.; Rubin, L. J. (1998): Primary pulmonary hypertension. *Lancet* (9129), 719–725.
- 129)** Machado, R. D.; Eickelberg, O.; Elliott, C. G.; Geraci, M. W.; Hanaoka, M.; Loyd, J. E.; Newman, J. H.; Phillips, J. A.; Soubrier, F.; Trembath, R. C.; Chung, W. K. (2009): Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* (1), 32–42.
- 130)** Harrison, R. E.; Flanagan, J. A.; Sankelo, M.; Abdalla, S. A.; Rowell, J.; Machado, R. D.; Elliott, C. G.; Robbins, I. M.; Olschewski, H.; McLaughlin, V.; Gruenig, E.; Kermeen, F.; Halme, M.; Räisänen-Sokolowski, A.; Laitinen, T.; Morrell, N. W.; Trembath, R. C. (2003): Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Journal of Medical Genetics* (12), 865–871.
- 131)** Chaouat, A.; Coulet, F.; Favre, C.; Simonneau, G.; Weitzenblum, E.; Soubrier, F.; Humbert, M. (2004): Endoglin germline mutation in a patient with hereditary

Literaturverzeichnis

- haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* (5), 446–448.
- 132)** Nasim, M. T.; Ogo, T.; Ahmed, M.; Randall, R.; Chowdhury, H. M.; Snape, K. M.; Bradshaw, T. Y.; Southgate, L.; Lee, G. J.; Jackson, I.; Lord, G. M.; Gibbs, J. S.; Wilkins, M. R.; Ohta-Ogo, K.; Nakamura, K.; Girerd, B.; Coulet, F.; Soubrier, F.; Humbert, M.; Morrell, N. W.; Trembath, R. C.; Machado, R. D. (2011): Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Human Mutation* (12), 1385–1389.
- 133)** Austin, E. D.; Ma, L.; LeDuc, C.; Berman Rosenzweig, E.; Borczuk, A.; Phillips, J. A.; Palomero, T.; Sumazin, P.; Kim, H. R.; Talati, M. H.; West, J.; Loyd, J. E.; Chung, W. K. (2012): Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circulation. Cardiovascular Genetics* (3), 336–343.
- 134)** Ma, L.; Roman-Campos, D.; Austin, E. D.; Eyries, M.; Sampson, K. S.; Soubrier, F.; Germain, M.; Trégouët, D.; Borczuk, A.; Rosenzweig, E. B.; Girerd, B.; Montani, D.; Humbert, M.; Loyd, J. E.; Kass, R. S.; Chung, W. K. (2013): A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine* (4), 351–361.
- 135)** Sitbon, O.; Lascoux-Combe, C.; Delfraissy, J.-F.; Yeni, P. G.; Raffi, F.; De Zuttere, D.; Gressin, V.; Clerson, P.; Sereni, D.; Simonneau, G. (2008): Prevalence of HIV-related pulmonary arterial hypertension in the current antiretroviral therapy era. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1), 108–113.
- 136)** Hadengue, A.; Benhayoun, M. K.; Lebrec, D.; Benhamou, J. P. (1991): Pulmonary hypertension complicating portal hypertension: prevalence and relation to splanchnic hemodynamics. *Gastroenterology* (2), 520–528.
- 137)** Colle, I. O.; Moreau, R.; Godinho, E.; Belghiti, J.; Ettori, F.; Cohen-Solal, A.; Mal, H.; Bernuau, J.; Marty, J.; Lebrec, D.; Valla, D.; Durand, F. (2003): Diagnosis of portopulmonary hypertension in candidates for liver transplantation: a prospective study. *Hepatology* (2), 401–409.
- 138)** Engelfriet, P. M.; Duffels, M. G.; Möller, T.; Boersma, E.; Tijssen, J. P.; Thaulow, E.; Gatzoulis, M. A.; Mulder, B. J. (2007): Pulmonary arterial hypertension in adults born with a heart septal defect: the Euro Heart Survey on adult congenital heart disease. *Heart* (6), 682–687.

Literaturverzeichnis

- 139)** Shimoda, L. A.; Semenza, G. L. (2011): HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2), 152–156.
- 140)** Stenmark, K. R.; Mecham, R. P. (1997): Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annual Review of Physiology*, 89–144.
- 141)** Stenmark, K. R.; Orton, E. C.; Reeves, J. T.; Voelkel, N. F.; Crouch, E. C.; Parks, W. C.; Mecham, R. P. (1988): Vascular remodeling in neonatal pulmonary hypertension. Role of the smooth muscle cell. *Chest* (3), 127–133.
- 142)** Mulvany, M. J. (2002): Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News in Physiological Sciences: an International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 105–109.
- 143)** Voelkel, N. F.; Tuder, R. M. (1997): Cellular and molecular biology of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* (5-6), 231–241.
- 144)** Seeger, W.; Adir, Y.; Barberà, J. A.; Champion, H.; Coghlan, J. G.; Cottin, V.; De Marco, T.; Galiè, N.; Ghio, S.; Gibbs, S.; Martinez, F. J.; Semigran, M. J.; Simonneau, G.; Wells, A. U.; Vachiéry, J.-L. (2013): Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *Journal of the American College of Cardiology* (25), 109–116.
- 145)** Chaouat, A.; Bugnet, A.-S.; Kadaoui, N.; Schott, R.; Enache, I.; Ducoloné, A.; Ehrhart, M.; Kessler, R.; Weitzenblum, E. (2005): Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2), 189–194.
- 146)** Stevens, D.; Sharma, K.; Szidon, P.; Rich, S.; McLaughlin, V.; Kesten, S. (2000): Severe pulmonary hypertension associated with COPD. *Annals of Transplantation* (3), 8–12.
- 147)** Chaouat, A.; Naeije, R.; Weitzenblum, E. (2008): Pulmonary hypertension in COPD. *The European Respiratory Journal* (5), 1371–1385.
- 148)** Carlsen, J.; Hasseriis Andersen, K.; Boesgaard, S.; Iversen, M.; Steinbrüchel, D.; Bøgelund Andersen, C. (2013): Pulmonary arterial lesions in explanted lungs after transplantation correlate with severity of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: the Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* (3), 347–354.
- 149)** Fedullo, P. F.; Auger, W. R.; Kerr, K. M.; Rubin, L. J. (2001): Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* (20), 1465–1472.

Literaturverzeichnis

- 150)** Lang, I. M. (2004): Chronic thromboembolic pulmonary hypertension--not so rare after all. *The New England Journal of Medicine* (22), 2236–2238.
- 151)** McLaughlin, V. V.; Archer, S. L.; Badesch, D. B.; Barst, R. J.; Farber, H. W.; Lindner, J. R.; Mathier, M. A.; McGoon, M. D.; Park, M. H.; Rosenson, R. S.; Rubin, L. J.; Tapson, V. F.; Varga, J. (2009): ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on expert consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *Journal of the American College of Cardiology* (17), 1573–1619.
- 152)** Jeffery, T. K.; Wanstall, J. C. (2001): Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacology and Therapeutics* (1), 1–20.
- 153)** Rabinovitch, M. (2012): Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of Clinical Investigation* (12), 4306–4313.
- 154)** Fourie, P. R.; Coetzee, A. R.; Bolliger, C. T. (1992): Pulmonary artery compliance: its role in right ventricular-arterial coupling. *Cardiovascular Research* (9), 839–844.
- 155)** Stenmark, K. R.; Meyrick, B.; Galie, N.; Mooi, W. J.; McMurtry, I. F. (2009): Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (6), 1013–1032.
- 156)** Sakao, S.; Voelkel, N. F.; Tatsumi, K. (2014): The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. *European Respiratory Review: an Official journal of the European Respiratory Society* (133), 350–355.
- 157)** Meyrick, B.; Reid, L. (1980): Endothelial and subintimal changes in rat hilar pulmonary artery during recovery from hypoxia. A quantitative ultrastructural study. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* (6), 603–615.
- 158)** Heath, D.; Williams, D.; Rios-Dalenz, J.; Calderon, M.; Gosney, J. (1990): Small pulmonary arterial vessels of Aymara Indians from the Bolivian Andes. *Histopathology* (6), 565–571.
- 159)** Heath, D.; Smith, P.; Rios Dalenz, J.; Williams, D.; Harris, P. (1981): Small pulmonary arteries in some natives of La Paz, Bolivia. *Thorax* (8), 599–604.

Literaturverzeichnis

- 160)** Sakao, S.; Tatsumi, K.; Voelkel, N. F. (2009): Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respiratory Research*, 95.
- 161)** Voelkel, N. F.; Cool, C. (2004): Pathology of pulmonary hypertension. *Cardiology Clinics* (3), 343–351.
- 162)** Sakao, S.; Taraseviciene-Stewart, L.; Lee, J. D.; Wood, K.; Cool, C. D.; Voelkel, N. F. (2005): Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology* (9), 1178–1180.
- 163)** Bogatcheva, N. V.; Garcia, J. G.; Verin, A. D. (2002): Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry. Biokhimiia* (1), 75–84.
- 164)** Eddahibi, S.; Humbert, M.; Sediame, S.; Chouaid, C.; Partovian, C.; Maître, B.; Teiger, E.; Rideau, D.; Simonneau, G.; Sitbon, O.; Adnot, S. (2000): Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension. Effect of prostacyclin therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (4), 1493–1499.
- 165)** Ruf, A.; Morgenstern, E. (1995): Ultrastructural aspects of platelet adhesion on subendothelial structures. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* (2), 119–122.
- 166)** Budhiraja, R.; Tuder, R. M.; Hassoun, P. M. (2004): Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* (2), 159–165.
- 167)** Rabinovitch, M. (2007): Pathobiology of pulmonary hypertension. *Annual Review of Pathology*, 369–399.
- 168)** Jeffery, T. K.; Morrell, N. W. (2002): Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases* (3), 173–202.
- 169)** Tozzi, C. A.; Poiani, G. J.; Harangozo, A. M.; Boyd, C. D.; Riley, D. J. (1989): Pressure-induced connective tissue synthesis in pulmonary artery segments is dependent on intact endothelium. *The Journal of Clinical Investigation* (3), 1005–1012.
- 170)** Rubin, L. J. (1997): Primary pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* (2), 111–117.
- 171)** Tuder, R. M.; Marecki, J. C.; Richter, A.; Fijalkowska, I.; Flores, S. (2007): Pathology of pulmonary hypertension. *Clinics in Chest Medicine* (1), 23–42.

Literaturverzeichnis

- 172)** Rabinovitch, M. (2008): Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of Clinical Investigation* (7), 2372–2379.
- 173)** Leggett, K.; Maylor, J.; Undem, C.; Lai, N.; Lu, W.; Schweitzer, K.; King, L. S.; Myers, A. C.; Sylvester, J. T.; Sidhaye, V.; Shimoda, L. A. (2012): Hypoxia-induced migration in pulmonary arterial smooth muscle cells requires calcium-dependent upregulation of aquaporin 1. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (4), 343–353.
- 174)** Yamagishi, S.; Imaizumi, T. (2005): Pericyte biology and diseases. *International Journal of Tissue Reactions* (3), 125–135.
- 175)** Reid, L. M. (1989): The Third Grover Conference on the pulmonary Circulation. The control of cellular proliferation in the pulmonary circulation. *The American Review of Respiratory Disease* (5), 1490–1493.
- 176)** Launay, J.-M.; Hervé, P.; Peoc'h, K.; Tournois, C.; Callebort, J.; Nebigil, C. G.; Etienne, N.; Drouet, L.; Humbert, M.; Simonneau, G.; Maroteaux, L. (2002): Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nature Medicine* (10), 1129–1135.
- 177)** Eddahibi, S.; Guignabert, C.; Barlier-Mur, A.-M.; Dewachter, L.; Fadel, E.; Darteville, P.; Humbert, M.; Simonneau, G.; Hanoun, N.; Saurini, F.; Hamon, M.; Adnot, S. (2006): Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* (15), 1857–1864.
- 178)** Davie, N.; Haleen, S. J.; Upton, P. D.; Polak, J. M.; Yacoub, M. H.; Morrell, N. W.; Wharton, J. (2002): ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (3), 398–405.
- 179)** Burg, E. D.; Remillard, C. V.; Yuan, J. X.-J. (2008): Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications. *British Journal of Pharmacology*, 99–111.
- 180)** Perros, F.; Montani, D.; Dorfmueller, P.; Durand-Gasselin, I.; Tcherakian, C.; Le Pavec, J.; Mazmanian, M.; Fadel, E.; Mussot, S.; Mercier, O.; Hervé, P.; Emilie, D.; Eddahibi, S.; Simonneau, G.; Souza, R.; Humbert, M. (2008): Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1), 81–88.

Literaturverzeichnis

- 181)** Geiger, R.; Berger, R. M.; Hess, J.; Bogers, A. J.; Sharma, H. S.; Mooi, W. J. (2000): Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. *The Journal of Pathology* (2), 202–207.
- 182)** Benisty, J. I.; McLaughlin, V. V.; Landzberg, M. J.; Rich, J. D.; Newburger, J. W.; Rich, S.; Folkman, J. (2004): Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* (4), 1255–1261.
- 183)** Le Cras, T. D.; Hardie, W. D.; Fagan, K.; Whitsett, J. A.; Korfhagen, T. R. (2003): Disrupted pulmonary vascular development and pulmonary hypertension in transgenic mice overexpressing transforming growth factor- α . *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (5), 1046–1054.
- 184)** De Man, F. S.; Tu, L.; Handoko, M. L.; Rain, S.; Ruiter, G.; François, C.; Schalij, I.; Dorfmueller, P.; Simonneau, G.; Fadel, E.; Perros, F.; Boonstra, A.; Postmus, P. E.; Van der Velden, J.; Vonk-Noordegraaf, A.; Humbert, M.; Eddahibi, S.; Guignabert, C. (2012): Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (8), 780–789.
- 185)** Ono, M.; Sawa, Y.; Mizuno, S.; Fukushima, N.; Ichikawa, H.; Bessho, K.; Nakamura, T.; Matsuda, H. (2004): Hepatocyte growth factor suppresses vascular medial hyperplasia and matrix accumulation in advanced pulmonary hypertension of rats. *Circulation* (18), 2896–2902.
- 186)** Farber, H. W.; Loscalzo, J. (2004): Pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine* (16), 1655–1665.
- 187)** Archer, S. L.; Weir, E. K.; Wilkins, M. R. (2010): Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation* (18), 2045–2066.
- 188)** Pak, O.; Aldashev, A.; Welsh, D.; Peacock, A. (2007): The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. *The European Respiratory Journal* (2), 364–372.
- 189)** Weir, E. K.; Archer, S. L. (2010): The role of redox changes in oxygen sensing. *Respiratory Physiology and Neurobiology* (3), 182–191.
- 190)** Chandel, N. S. (2010): Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 339–354.
- 191)** Fuchs, B.; Sommer, N.; Dietrich, A.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Gudermann, T.; Weissmann, N. (2010): Redox signaling and reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respiratory Physiology and Neurobiology* (3), 282–291.

Literaturverzeichnis

- 192)** Semenza, G. L. (2005): Pulmonary vascular responses to chronic hypoxia mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Proceedings of the American Thoracic Society* (1), 68–70.
- 193)** Prabhakar, N. R.; Semenza, G. L. (2012): Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiological Reviews* (3), 967–1003.
- 194)** Nabata, T.; Morimoto, S.; Koh, E.; Shiraishi, T.; Ogihara, T. (1990): Interleukin-6 stimulates c-myc expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Biochemistry International* (3), 445–453.
- 195)** Lendahl, U.; Lee, K. L.; Yang, H.; Poellinger, L. (2009): Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nature Reviews. Genetics* (12), 821–832.
- 196)** Ema, M.; Taya, S.; Yokotani, N.; Sogawa, K.; Matsuda, Y.; Fujii-Kuriyama, Y. (1997): A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (9), 4273–4278.
- 197)** Tang, N.; Wang, L.; Esko, J.; Giordano, F. J.; Huang, Y.; Gerber, H.-P.; Ferrara, N.; Johnson, R. S. (2004): Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* (5), 485–495.
- 198)** Shimoda, L. A. (2012): 55th Bowditch Lecture: Effects of chronic hypoxia on the pulmonary circulation: role of HIF-1. *Journal of Applied Physiology* (9), 1343–1352.
- 199)** Semenza, G. L. (2012): Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* (3), 399–408.
- 200)** McMahon, S.; Charbonneau, M.; Grandmont, S.; Richard, D. E.; Dubois, C. M. (2006): Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *The Journal of Biological Chemistry* (34), 24171–24181.
- 201)** Seshadri, V.; Fox, P. L.; Mukhopadhyay, C. K. (2002): Dual role of insulin in transcriptional regulation of the acute phase reactant ceruloplasmin. *The Journal of Biological Chemistry* (31), 27903–27911.
- 202)** Treins, C.; Giorgetti-Peraldi, S.; Murdaca, J.; Semenza, G. L.; van Obberghen, E. (2002): Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry* (31), 27975–27981.

Literaturverzeichnis

- 203)** Phillips, R. J.; Mestas, J.; Gharaee-Kermani, M.; Burdick, M. D.; Sica, A.; Belperio, J. A.; Keane, M. P.; Strieter, R. M. (2005): Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *The Journal of Biological Chemistry* (23), 22473–22481.
- 204)** Richard, D. E.; Berra, E.; Pouyssegur, J. (2000): Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry* (35), 26765–26771.
- 205)** Calvani, M.; Rapisarda, A.; Uranchimeg, B.; Shoemaker, R. H.; Melillo, G. (2006): Hypoxic induction of an HIF-1alpha-dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells. *Blood* (7), 2705–2712.
- 206)** Pisarcik, S.; Sylvester, J. T.; Semenza, G. L.; Shimoda, L. A. (2008): Endothelin-1 (ET-1) induces hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs). *Federation of American Societies for Experimental Biology* (22), 1209–1222.
- 207)** Veith, C.; Schermuly, R. T.; Brandes, R. P.; Weissmann, N. (2016): Molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor-induced pulmonary arterial smooth muscle cell alterations in pulmonary hypertension. *The Journal of Physiology* (5), 1167–1177.
- 208)** Yu, A. Y.; Shimoda, L. A.; Iyer, N. V.; Huso, D. L.; Sun, X.; McWilliams, R.; Beaty, T.; Sham, J. S.; Wiener, C. M.; Sylvester, J. T.; Semenza, G. L. (1999): Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *The Journal of Clinical Investigation* (5), 691–696.
- 209)** Abud, E. M.; Maylor, J.; Undem, C.; Punjabi, A.; Zaiman, A. L.; Myers, A. C.; Sylvester, J. T.; Semenza, G. L.; Shimoda, L. A. (2012): Digoxin inhibits development of hypoxic pulmonary hypertension in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (4), 1239–1244.
- 210)** Rios, E. J.; Fallon, M.; Wang, J.; Shimoda, L. A. (2005): Chronic hypoxia elevates intracellular pH and activates Na⁺/H⁺ exchange in pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (5), 867–874.
- 211)** Voelkel, N. F.; Mizuno, S.; Bogaard, H. J. (2013): The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (7), 457–465.

Literaturverzeichnis

- 212)** Christman, B. W.; McPherson, C. D.; Newman, J. H.; King, G. A.; Bernard, G. R.; Groves, B. M.; Loyd, J. E. (1992): An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* (2), 70–75.
- 213)** Kreyborg, K. g.; Uchida, S.; Gellert, P.; Schneider, A.; Boettger, T.; Voswinckel, R.; Wietelmann, A.; Szibor, M.; Weissmann, N.; Ghofrani, A. H.; Schermuly, R.; Schranz, D.; Seeger, W.; Braun, T. (2010): Identification of right heart-enriched genes in a murine model of chronic outflow tract obstruction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (4), 598–605.
- 214)** Shao, D.; Park, J. E.; Wort, S. J. (2011): The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Pharmacological Research* (6), 504–511.
- 215)** Li, M.; Li, Z.; Sun, X.; Yang, L.; Fang, P.; Liu, Y.; Li, W.; Xu, J.; Lu, J.; Xie, M.; Zhang, D. (2010): Heme oxygenase-1/p21WAF1 mediates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling inhibition of proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells. *The FEBS Journal* (6), 1543–1550.
- 216)** Lee, S. L.; Wang, W. W.; Moore, B. J.; Fanburg, B. L. (1991): Dual effect of serotonin on growth of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture. *Circulation Research* (5), 1362–1368.
- 217)** Gien, J.; Tseng, N.; Seedorf, G.; Roe, G.; Abman, S. H. (2013): Endothelin-1 impairs angiogenesis in vitro through Rho-kinase activation after chronic intrauterine pulmonary hypertension in fetal sheep. *Pediatric Research* (3), 252–262.
- 218)** Shimoda, L. A.; Sham, J. S. K.; Liu, Q.; Sylvester, J. T. (2002): Acute and chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction: a central role for endothelin-1? *Respiratory Physiology and Neurobiology* (1), 93–106.
- 219)** Undem, C.; Rios, E. J.; Maylor, J.; Shimoda, L. A. (2012): Endothelin-1 augments Na(+)/H(+) exchange activity in murine pulmonary arterial smooth muscle cells via Rho kinase. *PloS One* (9), e46303.
- 220)** Whitman, E. M.; Pisarcik, S.; Luke, T.; Fallon, M.; Wang, J.; Sylvester, J. T.; Semenza, G. L.; Shimoda, L. A. (2008): Endothelin-1 mediates hypoxia-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channel expression in pulmonary arterial myocytes. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (2), 309–318.
- 221)** Ruan, C.-H.; Dixon, R. A. F.; Willerson, J. T.; Ruan, K. (2010): Prostacyclin therapy for pulmonary arterial hypertension. *Texas Heart Institute Journal* (4), 391–399.

Literaturverzeichnis

- 222) Ghofrani, H. A.; Osterloh, I. H.; Grimminger, F. (2006): Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nature Reviews. Drug Discovery* (8), 689–702.
- 223) Wharton, J.; Strange, J. W.; Møller, G. M. O.; Growcott, E. J.; Ren, X.; Franklyn, A. P.; Phillips, S. C.; Wilkins, M. R. (2005): Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1), 105–113.
- 224) Xu, W.; Koeck, T.; Lara, A. R.; Neumann, D.; DiFilippo, F. P.; Koo, M.; Janocha, A. J.; Masri, F. A.; Arroliga, A. C.; Jennings, C.; Dweik, R. A.; Tuder, R. M.; Stuehr, D. J.; Erzurum, S. C. (2007): Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (4), 1342–1347.
- 225) Kaneko, F. T.; Arroliga, A. C.; Dweik, R. A.; Comhair, S. A.; Laskowski, D.; Oppedisano, R.; Thomassen, M. J.; Erzurum, S. C. (1998): Biochemical reaction products of nitric oxide as quantitative markers of primary pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (3), 917–923.
- 226) McCabe, T. J.; Fulton, D.; Roman, L. J.; Sessa, W. C. (2000): Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* (9), 6123–6128.
- 227) Tuder, R. M.; Cool, C. D.; Geraci, M. W.; Wang, J.; Abman, S. H.; Wright, L.; Badesch, D.; Voelkel, N. F. (1999): Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (6), 1925–1932.
- 228) Thomae, K. R.; Nakayama, D. K.; Billiar, T. R.; Simmons, R. L.; Pitt, B. R.; Davies, P. (1995): The effect of nitric oxide on fetal pulmonary artery smooth muscle growth. *The Journal of Surgical Research* (3), 337–343.
- 229) Ambalavanan, N.; Mariani, G.; Bulger, A.; Philips III, J. B. (1999): Role of nitric oxide in regulating neonatal porcine pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Biology of the Neonate* (5), 291–300.
- 230) Dinh-Xuan, A. T. (1992): Endothelial modulation of pulmonary vascular tone. *The European Respiratory Journal* (6), 757–762.
- 231) Kourembanas, S.; McQuillan, L. P.; Leung, G. K.; Faller, D. V. (1993): Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *The Journal of Clinical Investigation* (1), 99–104.

Literaturverzeichnis

- 232)** Wort, S. J.; Mitchell, J. A.; Woods, M.; Evans, T. W.; Warner, T. D. (2000): The prostacyclin-mimetic cicaprost inhibits endogenous endothelin-1 release from human pulmonary artery smooth muscle cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (5), 410–413.
- 233)** Smith, A. P. L.; Demoncheaux, E. A. G.; Higenbottam, T. W. (2002): Nitric oxide gas decreases endothelin-1 mRNA in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry/ Official Journal of the Nitric Oxide Society* (2), 153–159.
- 234)** Gore, B.; Izikki, M.; Mercier, O.; Dewachter, L.; Fadel, E.; Humbert, M.; Darteville, P.; Simonneau, G.; Naeije, R.; Lebrin, F.; Eddahibi, S. (2014): Key role of the endothelial TGF-beta/ALK1/endoglin signaling pathway in humans and rodents pulmonary hypertension. *PloS One* (6), 100310.
- 235)** Ma, W.; Han, W.; Greer, P. A.; Tudor, R. M.; Toque, H. A.; Wang, K. K. W.; Caldwell, R. W.; Su, Y. (2011): Calpain mediates pulmonary vascular remodeling in rodent models of pulmonary hypertension, and its inhibition attenuates pathologic features of disease. *The Journal of Clinical Investigation* (11), 4548–4566.
- 236)** Botney, M. D.; Bahadori, L.; Gold, L. I. (1994): Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta. *The American Journal of Pathology* (2), 286–295.
- 237)** Arcot, S. S.; Lipke, D. W.; Gillespie, M. N.; Olson, J. W. (1993): Alterations of growth factor transcripts in rat lungs during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Biochemical Pharmacology* (6), 1086–1091.
- 238)** Perkett, E. A.; Lyons, R. M.; Moses, H. L.; Brigham, K. L.; Meyrick, B. (1990): Transforming growth factor-beta activity in sheep lung lymph during the development of pulmonary hypertension. *The Journal of Clinical Investigation* (5), 1459–1464.
- 239)** Long, L.; Crosby, A.; Yang, X.; Southwood, M.; Upton, P. D.; Kim, D.-K.; Morrell, N. W. (2009): Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease. *Circulation* (4), 566–576.
- 240)** Yang, Q.; Sun, M.; Ramchandran, R.; Raj, J. U. (2015): IGF-1 signaling in neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension: Role of epigenetic regulation. *Vascular Pharmacology*, 20–31.
- 241)** Sartori-Cintra, A. R.; De Mara, C. S.; Argolo, D. L.; Coimbra, I. B. (2012): Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression by interleukin-1 β (IL-1 β), insulin-

Literaturverzeichnis

- like growth factors I (IGF-I) and II (IGF-II) in human osteoarthritic chondrocytes. *Clinics* (1), 35–40.
- 242)** Tudor, R. M.; Chacon, M.; Alger, L.; Wang, J.; Taraseviciene-Stewart, L.; Kasahara, Y.; Cool, C. D.; Bishop, A. E.; Geraci, M.; Semenza, G. L.; Yacoub, M.; Polak, J. M.; Voelkel, N. F. (2001): Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *The Journal of Pathology* (3), 367–374.
- 243)** Kasahara, Y.; Tudor, R. M.; Taraseviciene-Stewart, L.; Le Cras, T. D.; Abman, S.; Hirth, P. K.; Waltenberger, J.; Voelkel, N. F. (2000): Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *The Journal of Clinical Investigation* (11), 1311–1319.
- 244)** Taraseviciene-Stewart, L.; Kasahara, Y.; Alger, L.; Hirth, P.; Mc Mahon, G.; Waltenberger, J.; Voelkel, N. F.; Tudor, R. M. (2001): Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *Federation of American Societies for Experimental Biology* (2), 427–438.
- 245)** Tudor, R. M.; Zhen, L.; Cho, C. Y.; Taraseviciene-Stewart, L.; Kasahara, Y.; Salvemini, D.; Voelkel, N. F.; Flores, S. C. (2003): Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (1), 88–97.
- 246)** Taraseviciene-Stewart, L.; Scerbavicius, R.; Choe, K.-H.; Cool, C.; Wood, K.; Tudor, R. M.; Burns, N.; Kasper, M.; Voelkel, N. F. (2006): Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (4), 668–676.
- 247)** Asahara, T.; Bauters, C.; Pastore, C.; Kearney, M.; Rossow, S.; Bunting, S.; Ferrara, N.; Symes, J. F.; Isner, J. M. (1995): Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* (11), 2793–2801.
- 248)** Zhao, L.; al-Tubuly, R.; Sebkh, A.; Owji, A. A.; Nunez, D. J.; Wilkins, M. R. (1996): Angiotensin II receptor expression and inhibition in the chronically hypoxic rat lung. *British Journal of Pharmacology* (6), 1217–1222.
- 249)** Chassagne, C.; Eddahibi, S.; Adamy, C.; Rideau, D.; Marotte, F.; Dubois-Randé, J. L.; Adnot, S.; Samuel, J. L.; Teiger, E. (2000): Modulation of angiotensin II receptor expression during development and regression of hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (3), 323–332.

Literaturverzeichnis

- 250)** Grimminger, F.; Schermuly, R. T. (2010): PDGF receptor and its antagonists: role in treatment of PAH. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 435–446.
- 251)** Yu, Y.; Sweeney, M.; Zhang, S.; Platoshyn, O.; Landsberg, J.; Rothman, A.; Yuan, J. X. (2003): PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (2), 316–330.
- 252)** Dahal, B. K.; Cornitescu, T.; Tretyn, A.; Pullamsetti, S. S.; Kosanovic, D.; Dumitrascu, R.; Ghofrani, H. A.; Weissmann, N.; Voswinckel, R.; Banat, G.-A.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Schermuly, R. T. (2010): Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2), 158–167.
- 253)** Merklinger, S. L.; Jones, P. L.; Martinez, E. C.; Rabinovitch, M. (2005): Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation* (3), 423–431.
- 254)** Itoh, T.; Nagaya, N.; Ishibashi-Ueda, H.; Kyotani, S.; Oya, H.; Sakamaki, F.; Kimura, H.; Nakanishi, N. (2006): Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology* (2), 158–163.
- 255)** Humbert, M.; Monti, G.; Brenot, F.; Sitbon, O.; Portier, A.; Grangeot-Keros, L.; Duroux, P.; Galanaud, P.; Simonneau, G.; Emilie, D. (1995): Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (5), 1628–1631.
- 256)** Soon, E.; Holmes, A. M.; Treacy, C. M.; Doughty, N. J.; Southgate, L.; Machado, R. D.; Trembath, R. C.; Jennings, S.; Barker, L.; Nicklin, P.; Walker, C.; Budd, D. C.; Pepke-Zaba, J.; Morrell, N. W. (2010): Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* (9), 920–927.
- 257)** Li, A.; Varney, M. L.; Valasek, J.; Godfrey, M.; Dave, B. J.; Singh, R. K. (2005): Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis* (1), 63–71.
- 258)** Yue, T. L.; McKenna, P. J.; Gu, J. L.; Feuerstein, G. Z. (1993): Interleukin-8 is chemotactic for vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology* (1), 81–84.

Literaturverzeichnis

- 259)** Li, A.; Dubey, S.; Varney, M. L.; Dave, B. J.; Singh, R. K. (2003): IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *Journal of Immunology* (6), 3369–3376.
- 260)** Voelkel, N. F.; Tuder, R. M. (1995): Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal* (12), 2129–2138.
- 261)** Perros, F.; Dorfmüller, P.; Montani, D.; Hammad, H.; Waelput, W.; Girerd, B.; Raymond, N.; Mercier, O.; Mussot, S.; Cohen-Kaminsky, S.; Humbert, M.; Lambrecht, B. N. (2012): Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (3), 311–321.
- 262)** Tuder, R. M.; Voelkel, N. F. (1998): Pulmonary hypertension and inflammation. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* (1), 16–24.
- 263)** Banasova, A.; Maxova, H.; Hampl, V.; Vizek, M.; Povysilova, V.; Novotna, J.; Vajnerova, O.; Hnilickova, O.; Herget, J. (2008): Prevention of mast cell degranulation by disodium cromoglycate attenuates the development of hypoxic pulmonary hypertension in rats exposed to chronic hypoxia. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* (1), 102–107.
- 264)** Bartelds, B.; Van Loon, R. L. E.; Mohaupt, S.; Wijnberg, H.; Dickinson, M. G.; Boersma, B.; Takens, J.; van Albada, M.; Berger, R. M. F. (2012): Mast cell inhibition improves pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Chest* (3), 651–660.
- 265)** Dahal, B. K.; Kosanovic, D.; Kaulen, C.; Cornitescu, T.; Savai, R.; Hoffmann, J.; Reiss, I.; Ghofrani, H. A.; Weissmann, N.; Kuebler, W. M.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Schermuly, R. T. (2011): Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respiratory Research*, 60.
- 266)** Farha, S.; Sharp, J.; Asosingh, K.; Park, M.; Comhair, S. A. A.; Tang, W. H. W.; Thomas, J.; Farver, C.; Hsieh, F.; Loyd, J. E.; Erzurum, S. C. (2012): Mast cell number, phenotype, and function in human pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation* (2), 220–228.
- 267)** Hoffmann, J.; Yin, J.; Kukucka, M.; Yin, N.; Saarikko, I.; Sterner-Kock, A.; Fujii, H.; Leong-Poi, H.; Kuppe, H.; Schermuly, R. T.; Kuebler, W. M. (2011): Mast cells promote lung vascular remodelling in pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal* (6), 1400–1410.
- 268)** Tuder, R. M.; Archer, S. L.; Dorfmüller, P.; Erzurum, S. C.; Guignabert, C.; Michelakis, E.; Rabinovitch, M.; Schermuly, R.; Stenmark, K. R.; Morrell, N. W. (2014): Relevant

Literaturverzeichnis

- issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Türk Kardiyoloji Dernegi arsivi: Turk Kardiyoloji Derneginin yayin organidir*, 5–16.
- 269)** Xu, D.; Guo, H.; Xu, X.; Lu, Z.; Fassett, J.; Hu, X.; Xu, Y.; Tang, Q.; Hu, D.; Somani, A.; Geurts, A. M.; Ostertag, E.; Bache, R. J.; Weir, E. K.; Chen, Y. (2011): Exacerbated pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in animals with loss of function of extracellular superoxide dismutase. *Hypertension* (2), 303–309.
- 270)** Veit, F.; Pak, O.; Egemnazarov, B.; Roth, M.; Kosanovic, D.; Seimetz, M.; Sommer, N.; Ghofrani, H. A.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Brandes, R. P.; Schermuly, R. T.; Weissmann, N. (2013): Function of NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial smooth muscle cells after monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling. *Antioxidants and Redox Signaling* (18), 2213–2231.
- 271)** Pak, O.; Sommer, N.; Hoeres, T.; Bakr, A.; Waisbrod, S.; Sydykov, A.; Haag, D.; Esfandiary, A.; Kojonazarov, B.; Veit, F.; Fuchs, B.; Weisel, F. C.; Hecker, M.; Schermuly, R. T.; Grimminger, F.; Ghofrani, H. A.; Seeger, W.; Weissmann, N. (2013): Mitochondrial hyperpolarization in pulmonary vascular remodeling. Mitochondrial uncoupling protein deficiency as disease model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (3), 358–367.
- 272)** Waypa, G. B.; Marks, J. D.; Guzy, R.; Mungai, P. T.; Schriewer, J.; Dokic, D.; Schumacker, P. T. (2010): Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* (3), 526–535.
- 273)** Mittal, M.; Gu, X. Q.; Pak, O.; Pamenter, M. E.; Haag, D.; Fuchs, D. B.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Brandes, R. P.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Haddad, G. G.; Weissmann, N. (2012): Hypoxia induces Kv channel current inhibition by increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* (6), 1033–1042.
- 274)** Case, A. J.; Li, S.; Basu, U.; Tian, J.; Zimmerman, M. C. (2013): Mitochondrial-localized NADPH oxidase 4 is a source of superoxide in angiotensin II-stimulated neurons. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* (1), 19–28.
- 275)** Bonnet, S.; Michelakis, E. D.; Porter, C. J.; Andrade-Navarro, M. A.; Thebaud, B.; Bonnet, S.; Haromy, A.; Harry, G.; Moudgil, R.; McMurtry, M. S.; Weir, E. K.; Archer, S. L. (2006): An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* (22), 2630–2641.

Literaturverzeichnis

- 276) Archer, S. L.; Gomberg-Maitland, M.; Maitland, M. L.; Rich, S.; Garcia, J. G.N.; Weir, E. K. (2008): Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology* (2), 570–578.
- 277) Osipenko, O. N.; Tate, R. J.; Gurney, A. M. (2000): Potential role for kv3.1b channels as oxygen sensors. *Circulation Research* (5), 534–540.
- 278) Schumacker, P. T. (2011): Lung cell hypoxia: role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses. *Proceedings of the American Thoracic Society* (6), 477–484.
- 279) Green, D. E.; Murphy, T. C.; Kang, B.-Y.; Kleinhenz, J. M.; Szyndralewicz, C.; Page, P.; Sutliff, R. L.; Hart, C. M. (2012): The Nox4 inhibitor GKT137831 attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular cell proliferation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (5), 718–726.
- 280) Ali, M. H.; Schlidt, S. A.; Chandel, N. S.; Hynes, K. L.; Schumacker, P. T.; Gewertz, B. L. (1999): Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. *The American Journal of Physiology* (5), 1057–1065.
- 281) Chandel, N. S.; McClintock, D. S.; Feliciano, C. E.; Wood, T. M.; Melendez, J. A.; Rodriguez, A. M.; Schumacker, P. T. (2000): Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *The Journal of Biological Chemistry* (33), 25130–25138.
- 282) Schieber, M.; Chandel, N. S. (2014): ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* (10), 453–462.
- 283) Lee, H.; Lee, Y. J.; Choi, H.; Ko, E. H.; Kim, J.-W. (2009): Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *The Journal of Biological Chemistry* (16), 10601–10609.
- 284) Simon, H. U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Schaffer, F. (2000): Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis: an International Journal on Programmed Cell Death* (5), 415–418.
- 285) Schröder, K. (2014): NADPH oxidases in redox regulation of cell adhesion and migration. *Antioxidants and Redox Signaling* (13), 2043–2058.
- 286) Graciano, M. F. R.; Valle, M. M. R.; Kowluru, A.; Curi, R.; Carpinelli, A. R. (2011): Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets. *Islets* (5), 213–223.

Literaturverzeichnis

- 287)** Aggarwal, S.; Gross, C. M.; Sharma, S.; Fineman, J. R.; Black, S. M. (2013): Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology* (3), 1011–1034.
- 288)** Nozik-Grayck, E.; Stenmark, K. R. (2007): Role of reactive oxygen species in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 101–112.
- 289)** Song, S.; Yamamura, A.; Yamamura, H.; Ayon, R. J.; Smith, K. A.; Tang, H.; Makino, A.; Yuan, J. X. (2014): Flow shear stress enhances intracellular Ca²⁺ signaling in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (4), 373–383.
- 290)** Kolpakov, V.; Rekhter, M. D.; Gordon, D.; Wang, W. H.; Kulik, T. J. (1995): Effect of mechanical forces on growth and matrix protein synthesis in the in vitro pulmonary artery. Analysis of the role of individual cell types. *Circulation Research* (4), 823–831.
- 291)** Li, Y.-S. J.; Haga, J. H.; Chien, S. (2005): Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *Journal of Biomechanics* (10), 1949–1971.
- 292)** Conway, D. E.; Breckenridge, M. T.; Hinde, E.; Gratton, E.; Chen, C. S.; Schwartz, M. A. (2013): Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Current Biology* (11), 1024–1030.
- 293)** Chaqour, B.; Howard, P. S.; Macarak, E. J. (1999): Identification of stretch-responsive genes in pulmonary artery smooth muscle cells by a two arbitrary primer-based mRNA differential display approach. *Molecular and Cellular Biochemistry* (1-2), 87–96.
- 294)** Resnick, N.; Collins, T.; Atkinson, W.; Bonthron, D. T.; Dewey, C. F., JR; Gimbron, M. A., JR (1993): Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (16), 7908.
- 295)** Guibert, C.; Marthan, R.; Savineau, J.-P. (2007): Modulation of ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Current Pharmaceutical Design* (24), 2443–2455.
- 296)** Joseph, B. K.; Thakali, K. M.; Moore, C. L.; Rhee, S. W. (2013): Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: Implications for novel therapeutic approaches. *Pharmacological Research* (1), 126–138.
- 297)** Bonnet, S.; Rochefort, G.; Sutendra, G.; Archer, S. L.; Haromy, A.; Webster, L.; Hashimoto, K.; Bonnet, S. N.; Michelakis, E. D. (2007): The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (27), 11418–11423.

Literaturverzeichnis

- 298)** Michelakis, E. D.; McMurtry, M. S.; Wu, X.; Dyck, J. R. B.; Moudgil, R.; Hopkins, T. A.; Lopaschuk, G. D.; Puttagunta, L.; Waite, R.; Archer, S. L. (2002): Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation* (2), 244–250.
- 299)** Shimoda, L. A.; Polak, J. (2011): Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (5), 951–967.
- 300)** Shimoda, L. A.; Sham, J. S.; Shimoda, T. H.; Sylvester, J. T. (2000): L-type Ca^{2+} channels, resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and ET-1-induced responses in chronically hypoxic pulmonary myocytes. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (5), 884–894.
- 301)** Mandegar, M.; Remillard, C. V.; Yuan, J. X. (2002): Ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases* (2), 81–114.
- 302)** Zhang, S. L.; Yu, Y.; Roos, J.; Kozak, J. A.; Deerinck, T. J.; Ellisman, M. H.; Stauderman, K. A.; Cahalan, M. D. (2005): STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* (7060), 902–905.
- 303)** Lin, M.; Leung, G.; Zhang, W.; Yang, X.; Yip, K.; Tse, C.; Sham, J. S. K. (2004): Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca^{2+} channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation Research* (5), 496–505.
- 304)** Remillard, C. V.; Yuan, J. X. (2006): TRP channels, CCE, and the pulmonary vascular smooth muscle. *Microcirculation* (8), 671–692.
- 305)** Peacock, A. J.; Scott, P.; Plevin, R.; Wadsworth, R.; Welsh, D. (1998): Hypoxia enhances proliferation and generation of IP3 in pulmonary artery fibroblasts but not in those from the mesenteric circulation. *Chest* (1), 24.
- 306)** Rose, F.; Grimminger, F.; Appel, J.; Heller, M.; Pies, V.; Weissmann, N.; Fink, L.; Schmidt, S.; Krick, S.; Camenisch, G.; Gassmann, M.; Seeger, W.; Hänze, J. (2002): Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors. *Federation of American Societies for Experimental Biology* (12), 1660–1661.
- 307)** Olschewski, A.; Papp, R.; Nagaraj, C.; Olschewski, H. (2014): Ion channels and transporters as therapeutic targets in the pulmonary circulation. *Pharmacology and Therapeutics* (3), 349–368.

Literaturverzeichnis

- 308)** Kuhr, F. K.; Smith, K. A.; Song, M. Y.; Levitan, I.; Yuan, J. X. (2012): New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca^{2+} signaling. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* (8), 1546–1562.
- 309)** Hardingham, G. E.; Chawla, S.; Johnson, C. M.; Bading, H. (1997): Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* (6613), 260–265.
- 310)** Liu, X.-R.; Zhang, M.-F.; Yang, N.; Liu, Q.; Wang, R.-X.; Cao, Y.-N.; Yang, X.-R.; Sham, J. S. K.; Lin, M.-J. (2012): Enhanced store-operated Ca^{2+} entry and TRPC channel expression in pulmonary arteries of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (1), 77–87.
- 311)** Song, M. Y.; Makino, A.; Yuan, J. X. (2011): STIM2 Contributes to Enhanced Store-operated Ca Entry in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulmonary Circulation* (1), 84–94.
- 312)** Quinn, D. A.; Dahlberg, C. G.; Bonventre, J. P.; Scheid, C. R.; Honeyman, T.; Joseph, P. M.; Thompson, B. T.; Hales, C. A. (1996): The role of Na^+/H^+ exchange and growth factors in pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (2), 139–145.
- 313)** Quinn, D. A.; Honeyman, T. W.; Joseph, P. M.; Thompson, B. T.; Hales, C. A.; Scheid, C. R. (1991): Contribution of Na^+/H^+ exchange to pH regulation in pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (6), 586–591.
- 314)** Quinn, D. A.; Du, H. K.; Thompson, B. T.; Hales, C. A. (1998): Amiloride analogs inhibit chronic hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (4), 1263–1268.
- 315)** Yu, L.; Quinn, D. A.; Garg, H. G.; Hales, C. A. (2008): Deficiency of the NHE1 gene prevents hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (11), 1276–1284.
- 316)** Yu, L.; Hales, C. A. (2011): Silencing of sodium-hydrogen exchanger 1 attenuates the proliferation, hypertrophy, and migration of pulmonary artery smooth muscle cells via E2F1. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (5), 923–930.
- 317)** Hotta, Y.; Benzer, S. (1969): Abnormal electroretinograms in visual mutants of *Drosophila*. *Nature* (5191), 354–356.
- 318)** Minke, B.; Cook, B. (2002): TRP channel proteins and signal transduction. *Physiological Reviews* (2), 429–472.

Literaturverzeichnis

- 319)** Clapham, D. E. (1995): Calcium signaling. *Cell* (2), 259–268.
- 320)** 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. *Journal of Cellular Physiology* (6), 1163–1169.
- 321)** Adapala, R. K.; Thoppil, R. J.; Luther, D. J.; Paruchuri, S.; Meszaros, J. G.; Chilian, W. M.; Thodeti, C. K. (2013): TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45–52.
- 322)** Yang, D.; Luo, Z.; Ma, S.; Wong, W. T.; Ma, L.; Zhong, J.; He, H.; Zhao, Z.; Cao, T.; Yan, Z.; Liu, D.; Arendshorst, W. J.; Huang, Y.; Tepel, M.; Zhu, Z. (2010): Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. *Cell Metabolism* (2), 130–141.
- 323)** Vassort, G.; Alvarez, J. (2009): Transient receptor potential: a large family of new channels of which several are involved in cardiac arrhythmia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (2), 100–107.
- 324)** Thorneloe, K. S.; Cheung, M.; Bao, W.; Alsaid, H.; Lenhard, S.; Jian, M.-Y.; Costell, M.; Maniscalco-Hauk, K.; Krawiec, J. A.; Olzinski, A.; Gordon, E.; Lozinskaya, I.; Elefante, L.; Qin, P.; Matasic, D. S.; James, C.; Tunstead, J.; Donovan, B.; Kallal, L.; Waszkiewicz, A.; Vaidya, K.; Davenport, E. A.; Larkin, J.; Burgert, M.; Casillas, L. N.; Marquis, R. W.; Ye, G.; Eidam, H. S.; Goodman, K. B.; Toomey, J. R.; Roethke, T. J.; Jucker, B. M.; Schnackenberg, C. G.; Townsley, M. I.; Lepore, J. J.; Willette, R. N. (2012): An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure. *Science Translational Medicine* (159), 148.
- 325)** Diebold, I.; Petry, A.; Hess, J.; Görlach, A. (2010): The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1. *Molecular Biology of the Cell* (12), 2087–2096.
- 326)** Dietrich, A.; Kalwa, H.; Fuchs, B.; Grimminger, F.; Weissmann, N.; Gudermann, T. (2007): In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium* (2), 233–244.
- 327)** Nilius, B.; Owsianik, G.; Voets, T.; Peters, J. A. (2007): Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews* (1), 165–217.
- 328)** Earley, S.; Brayden, J. E. (2015): Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiological Reviews* (2), 645–690.

Literaturverzeichnis

- 329)** Pan, Z.; Yang, H.; Reinach, P. S. (2011): Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels. *Human Genomics* (2), 108–116.
- 330)** Rohacs, T.; Lopes, C. M.B.; Michailidis, I.; Logothetis, D. E. (2005): PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nature Neuroscience* (5), 626–634.
- 331)** Garcia-Sanz, N.; Fernandez-Carvajal, A.; Morenilla-Palao, C.; Planells-Cases, R.; Fajardo-Sanchez, E.; Fernandez-Ballester, G.; Ferrer-Montiel, A. (2004): Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* (23), 5307–5314.
- 332)** Dietrich, A.; Fahlbusch, M.; Gudermann, T. (2014): Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator? *Cells* (4), 939–962.
- 333)** Choi, S.-I.; Yoo, S.; Lim, J. Y.; Hwang, S. W. (2014): Are sensory TRP channels biological alarms for lipid peroxidation? *International Journal of Molecular Sciences* (9), 16430–16457.
- 334)** Eder, P.; Molkentin, J. D. (2011): TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circulation Research* (2), 265–272.
- 335)** Gaudet, R. (2008): A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Molecular Biosystems* (5), 372–379.
- 336)** Walker, R. L.; Hume, J. R.; Horowitz, B. (2001): Differential expression and alternative splicing of TRP channel genes in smooth muscles. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (5), 1184–1192.
- 337)** Fischer, M. J. M.; Balasuriya, D.; Jeggle, P.; Goetze, T. A.; McNaughton, P. A.; Reeh, P. W.; Edwardson, J. M. (2014): Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* (12), 2229–2241.
- 338)** Park, J.-Y.; Hwang, E. M.; Yarishkin, O.; Seo, J.-H.; Kim, E.; Yoo, J.; Yi, G.-S.; Kim, D.-G.; Park, N.; Ha, C. M.; La, J.-H.; Kang, D.; Han, J.; Oh, U.; Hong, S.-G. (2008): TRPM4b channel suppresses store-operated Ca²⁺ entry by a novel protein-protein interaction with the TRPC3 channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (3), 677–683.
- 339)** Clapham, D. E.; Julius, D.; Montell, C.; Schultz, G. (2005): International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacological Reviews* (4), 427–450.

Literaturverzeichnis

- 340)** Stowers, L.; Holy, T. E.; Meister, M.; Dulac, C.; Koentges, G. (2002): Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* (5559), 1493–1500.
- 341)** Hofmann, T.; Schaefer, M.; Schultz, G.; Gudermann, T. (2000): Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *Journal of Molecular Medicine* (1), 14–25.
- 342)** Hofmann, T.; Schaefer, M.; Schultz, G.; Gudermann, T. (2002): Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (11), 7461–7466.
- 343)** Watanabe, H.; Vriens, J.; Prenen, J.; Droogmans, G.; Voets, T.; Nilius, B. (2003): Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* (6947), 434–438.
- 344)** Storch, U.; Forst, A.-L.; Philipp, M.; Gudermann, T.; Mederos y Schnitzler, M. (2012): Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *The Journal of Biological Chemistry* (5), 3530–3540.
- 345)** Ng, L. C.; Gurney, A. M. (2001): Store-operated channels mediate Ca(2+) influx and contraction in rat pulmonary artery. *Circulation Research* (10), 923–929.
- 346)** Wang, J.; Shimoda, L. A.; Weigand, L.; Wang, W.; Sun, D.; Sylvester, J. T. (2005): Acute hypoxia increases intracellular [Ca²⁺] in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative Ca²⁺ entry. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (6), 1059–1069.
- 347)** Goel, M.; Sinkins, W. G.; Schilling, W. P. (2002): Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *The Journal of Biological Chemistry* (50), 48303–48310.
- 348)** Liu, X.; Bandyopadhyay, B. C.; Singh, B. B.; Groschner, K.; Ambudkar, I. S. (2005): Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *The Journal of Biological Chemistry* (22), 21600–21606.
- 349)** Strübing, C.; Krapivinsky, G.; Krapivinsky, L.; Clapham, D. E. (2001): TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* (3), 645–655.
- 350)** Tsiokas, L.; Arnould, T.; Zhu, C.; Kim, E.; Walz, G.; Sukhatme, V. P. (1999): Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (7), 3934–3939.

Literaturverzeichnis

- 351)** Du, J.; Ma, X.; Shen, B.; Huang, Y.; Birnbaumer, L.; Yao, X. (2014): TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel. *Federation of American Societies for Experimental Biology* (11), 4677–4685.
- 352)** Schindl, R.; Fritsch, R.; Jardin, I.; Frischauf, I.; Kahr, H.; Muik, M.; Riedl, M. C.; Groschner, K.; Romanin, C. (2012): Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca^{2+} influx. *The Journal of Biological Chemistry* (42), 35612–35620.
- 353)** Ma, X.; Cheng, K.-T.; Wong, C.-O.; O'Neil, R. G.; Birnbaumer, L.; Ambudkar, I. S.; Yao, X. (2011): Heteromeric TRPV4-C1 channels contribute to store-operated Ca^{2+} entry in vascular endothelial cells. *Cell Calcium* (6), 502–509.
- 354)** Ma, X.; Qiu, S.; Luo, J.; Ma, Y.; Ngai, C.-Y.; Shen, B.; Wong, C.-O.; Huang, Y.; Yao, X. (2010): Functional role of vanilloid transient receptor potential 4-canonical transient receptor potential 1 complex in flow-induced Ca^{2+} influx. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (4), 851–858.
- 355)** Pan, Z.; Damron, D.; Nieminen, A. L.; Bhat, M. B.; Ma, J. (2000): Depletion of intracellular Ca^{2+} by caffeine and ryanodine induces apoptosis of chinese hamster ovary cells transfected with ryanodine receptor. *The Journal of Biological Chemistry* (26), 19978–19984.
- 356)** Pani, B.; Liu, X.; Bollimuntha, S.; Cheng, K. T.; Niesman, I. R.; Zheng, C.; Achen, V. R.; Patel, H. H.; Ambudkar, I. S.; Singh, B. B. (2013): Impairment of TRPC1-STIM1 channel assembly and AQP5 translocation compromise agonist-stimulated fluid secretion in mice lacking caveolin1. *Journal of Cell Science* (2), 667–675.
- 357)** Pani, B.; Ong, H. L.; Brazer, S.-C. W.; Liu, X.; Rauser, K.; Singh, B. B.; Ambudkar, I. S. (2009): Activation of TRPC1 by STIM1 in ER-PM microdomains involves release of the channel from its scaffold caveolin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (47), 20087–20092.
- 358)** Remillard, C. V.; Yuan, J. X. (2006): Transient receptor potential channels and caveolin-1: good friends in tight spaces. *Molecular Pharmacology* (4), 1151–1154.
- 359)** Sundivakkam, P. C.; Kwiatek, A. M.; Sharma, T. T.; Minshall, R. D.; Malik, A. B.; Tiruppathi, C. (2009): Caveolin-1 scaffold domain interacts with TRPC1 and IP3R3 to regulate Ca^{2+} store release-induced Ca^{2+} entry in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (3), 403–413.

Literaturverzeichnis

- 360)** Wang, Y.; Deng, X.; Hewavitharana, T.; Soboloff, J.; Gill, D. L. (2008): Stim, ORAI and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (9), 1127–1133.
- 361)** Beech, D. J.; Xu, S. Z.; McHugh, D.; Flemming, R. (2003): TRPC1 store-operated cationic channel subunit. *Cell Calcium* (5-6), 433–440.
- 362)** Freichel, M.; Suh, S. H.; Pfeifer, A.; Schweig, U.; Trost, C.; Weissgerber, P.; Biel, M.; Philipp, S.; Freise, D.; Droogmans, G.; Hofmann, F.; Flockerzi, V.; Nilius, B. (2001): Lack of an endothelial store-operated Ca^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4-/- mice. *Nature Cell Biology* (2), 121–127.
- 363)** Liu, X.; Wang, W.; Singh, B. B.; Lockwich, T.; Jadowiec, J.; O'Connell, B.; Wellner, R.; Zhu, M. X.; Ambudkar, I. S. (2000): Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca^{2+} influx mechanism in salivary gland cells. *The Journal of Biological Chemistry* (5), 3403–3411.
- 364)** Dietrich, A.; Mederos y Schnitzler, M.; Emmel, J.; Kalwa, H.; Hofmann, T.; Gudermann, T. (2003): N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *The Journal of Biological Chemistry* (48), 47842–47852.
- 365)** Hofmann, T.; Obukhov, A. G.; Schaefer, M.; Harteneck, C.; Gudermann, T.; Schultz, G. (1999): Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* (6716), 259–263.
- 366)** Ng, L. C.; Wilson, S. M.; McAllister, C. E.; Hume, J. R. (2007): Role of InsP_3 and ryanodine receptors in the activation of capacitative Ca^{2+} entry by store depletion or hypoxia in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* (1), 101–111.
- 367)** Ng, L. C.; Kyle, B. D.; Lennox, A. R.; Shen, X.-M.; Hatton, W. J.; Hume, J. R. (2008): Cell culture alters Ca^{2+} entry pathways activated by store-depletion or hypoxia in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (1), 313–323.
- 368)** DeHaven, W. I.; Jones, B. F.; Petranka, J. G.; Smyth, J. T.; Tomita, T.; Bird, G. S.; Putney, J. W. (2009): TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *The Journal of Physiology* (10), 2275–2298.
- 369)** Bergdahl, A.; Gomez, M. F.; Dreja, K.; Xu, S.-Z.; Adner, M.; Beech, D. J.; Broman, J.; Hellstrand, P.; Sward, K. (2003): Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca^{2+} entry dependent on TRPC1. *Circulation Research* (9), 839–847.

Literaturverzeichnis

- 370)** Dietrich, A.; Kalwa, H.; Storch, U.; Mederos y Schnitzler, M.; Salanova, B.; Pinkenburg, O.; Dubrovskaja, G.; Essin, K.; Gollasch, M.; Birnbaumer, L.; Gudermann, T. (2007): Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* (3), 465–477.
- 371)** Inoue, R.; Jensen, L. J.; Shi, J.; Morita, H.; Nishida, M.; Honda, A.; Ito, Y. (2006): Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circulation Research* (2), 119–131.
- 372)** Potier, M.; Gonzalez, J. C.; Motiani, R. K.; Abdullaev, I. F.; Bisailon, J. M.; Singer, H. A.; Trebak, M. (2009): Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *Federation of American Societies for Experimental Biology* (8), 2425–2437.
- 373)** Li, S.; Ran, Y.; Zheng, X.; Pang, X.; Wang, Z.; Zhang, R.; Zhu, D. (2010): 15-HETE mediates sub-acute hypoxia-induced TRPC1 expression and enhanced capacitative calcium entry in rat distal pulmonary arterial myocytes. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* (1-2), 60–74.
- 374)** Lu, W.; Wang, J.; Shimoda, L. A.; Sylvester, J. T. (2008): Differences in STIM1 and TRPC expression in proximal and distal pulmonary arterial smooth muscle are associated with differences in Ca²⁺ responses to hypoxia. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (1), 104–113.
- 375)** Wang, J.; Weigand, L.; Lu, W.; Sylvester, J. T.; Semenza, G. L.; Shimoda, L. A. (2006): Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circulation Research* (12), 1528–1537.
- 376)** Fuchs, B.; Rupp, M.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Weissmann, N. (2011): Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respiratory Research*, 20.
- 377)** Schermuly, R. T.; Dony, E.; Ghofrani, H. A.; Pullamsetti, S.; Savai, R.; Roth, M.; Sydykov, A.; Lai, Y. J.; Weissmann, N.; Seeger, W.; Grimminger, F. (2005): Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *The Journal of Clinical Investigation* (10), 2811–2821.
- 378)** Shimoda, L. A.; Laurie, S. S. (2013): Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Journal of Molecular Medicine* (3), 297–309.

Literaturverzeichnis

- 379)** Waypa, G. B.; Chandel, N. S.; Schumacker, P. T. (2001): Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circulation Research* (12), 1259–1266.
- 380)** Weissmann, N.; Sydykov, A.; Kalwa, H.; Storch, U.; Fuchs, B.; Mederos y Schnitzler, M.; Brandes, R. P.; Grimminger, F.; Meissner, M.; Freichel, M.; Offermanns, S.; Veit, F.; Pak, O.; Krause, K.-H.; Schermuly, R. T.; Brewer, A. C.; Schmidt, H. H. H. W.; Seeger, W.; Shah, A. M.; Gudermann, T.; Ghofrani, H. A.; Dietrich, A. (2012): Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice. *Nature Communications*, 649.
- 381)** Zhang, X.; Goncalves, R.; Mosser, D. M. (2008): The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology*.
- 382)** Fattman, C. L.; Schaefer, L. M.; Oury, T. D. (2003): Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine* (3), 236–256.
- 383)** Malczyk, M.; Veith, C.; Fuchs, B.; Hofmann, K.; Storch, U.; Schermuly, R. T.; Witzernath, M.; Ahlbrecht, K.; Fecher-Trost, C.; Flockerzi, V.; Ghofrani, H. A.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Weissmann, N. (2013): Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (12), 1451–1459.
- 384)** Diermeier-Daucher, S.; Clarke, S. T.; Hill, D.; Vollmann-Zwerenz, A.; Bradford, J. A.; Brockhoff, G. (2009): Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry. *Cytometry. Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology* (6), 535–546.
- 385)** Fuchs, B. (2007): Die essentielle Bedeutung des "Classical Transient Receptor Potential 6" (TRPC6)-Ionenkanals für die akute vaskuläre Hypoxiereaktion der Lunge. Untersuchungen an isolierten pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen. Gießen: VVB Laufersweiler Verl.
- 386)** Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry* (6), 3440–3450.
- 387)** Gentleman, R. (2005): Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor: Springer. New York NY.
- 388)** Gentleman, R. C.; Carey, V. J.; Bates, D. M. (2004): Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.

Literaturverzeichnis

- 389)** Smyth, G. K.; Speed, T. (2003): Normalization of cDNA microarray data. *Methods* (4), 265–273.
- 390)** Smyth, G. K. (2004): Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*.
- 391)** Walker, J.; Udem, C.; Yun, X.; Lade, J.; Jiang, H.; Shimoda, L. A. (2016): Role of Rho kinase and Na⁺/H⁺ exchange in hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and migration. *Physiological Reports* (6), 12702.
- 392)** Preston, I. R.; Hill, N. S.; Warburton, R. R.; Fanburg, B. L. (2006): Role of 12-lipoxygenase in hypoxia-induced rat pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (2), 367–374.
- 393)** Du, L.-L.; Wang, L.; Yang, X.-F.; Wang, P.; Li, X.-H.; Chai, D.-M.; Liu, B.-J.; Cao, Y.; Xu, W.-Q.; Liu, R.; Tian, Q.; Wang, J.-Z.; Zhou, X.-W. (2016): Transient receptor potential-canonical 1 is essential for environmental enrichment-induced cognitive enhancement and neurogenesis. *Molecular Neurobiology*, 1–11.
- 394)** Zhou, X.; Ye, Y.; Sun, Y.; Li, X.; Wang, W.; Privratsky, B.; Tan, S.; Zhou, Z.; Huang, C.; Wei, Y.-Q.; Birnbaumer, L.; Singh, B. B.; Wu, M. (2015): Transient Receptor Potential Channel 1 Deficiency Impairs Host Defense and Proinflammatory Responses to Bacterial Infection by Regulating Protein Kinase Calpha Signaling. *Molecular and cellular biology* (16), 2729–2739.
- 395)** Zhang, Y.; Lu, W.; Yang, K.; Xu, L.; Lai, N.; Tian, L.; Jiang, Q.; Duan, X.; Chen, M.; Wang, J. (2013): Bone morphogenetic protein 2 decreases TRPC expression, store-operated Ca(2+) entry, and basal Ca(2+)i in rat distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (9), 833–843.
- 396)** Williams, I. A.; Allen, D. G. (2007): Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* (2), 846–855.
- 397)** Formigli, L.; Sassoli, C.; Squecco, R.; Bini, F.; Martinesi, M.; Chellini, F.; Luciani, G.; Sbrana, F.; Zecchi-Orlandini, S.; Francini, F.; Meacci, E. (2009): Regulation of transient receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) by sphingosine 1-phosphate in C2C12 myoblasts and its relevance for a role of mechanotransduction in skeletal muscle differentiation. *Journal of Cell Science* (9), 1322–1333.
- 398)** Pullen, N. A.; Barnstein, B. O.; Falanga, Y. T.; Wang, Z.; Suzuki, R.; Tamang, T. D. L.; Khurana, M. C.; Harry, E. A.; Draber, P.; Bunting, K. D.; Mizuno, K.; Wilson, B. S.;

Literaturverzeichnis

- Ryan, J. J. (2012): Novel mechanism for Fc{epsilon}RI-mediated signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) tyrosine phosphorylation and the selective influence of STAT5B over mast cell cytokine production. *The Journal of Biological Chemistry* (3), 2045–2054.
- 399)** Sheikh, A. Q.; Lighthouse, J. K.; Greif, D. M. (2014): Recapitulation of developing artery muscularization in pulmonary hypertension. *Cell Reports* (5), 809–817.
- 400)** MacLennan, D. H. (1970): Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* (17), 4508–4518.
- 401)** Yu, Y.; Keller, S. H.; Remillard, C. V.; Safrina, O.; Nicholson, A.; Zhang, S. L.; Jiang, W.; Vangala, N.; Landsberg, J. W.; Wang, J.-Y.; Thistlethwaite, P. A.; Channick, R. N.; Robbins, I. M.; Loyd, J. E.; Ghofrani, H. A.; Grimminger, F.; Schermuly, R. T.; Cahalan, M. D.; Rubin, L. J.; Yuan, J. X.-J. (2009): A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* (17), 2313–2322.
- 402)** Smith, K. A.; Voiriot, G.; Tang, H.; Fraidenburg, D. R.; Song, S.; Yamamura, H.; Yamamura, A.; Guo, Q.; Wan, J.; Pohl, N. M.; Tauseef, M.; Bodmer, R.; Ocorr, K.; Thistlethwaite, P. A.; Haddad, G. G.; Powell, F. L.; Makino, A.; Mehta, D.; Yuan, J. X. (2015): Notch Activation of Ca(2+) Signaling in the Development of Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (3), 355–367.
- 403)** Wang, Q.; Wang, D.; Yan, G.; Sun, L.; Tang, C. (2016): TRPC6 is required for hypoxia-induced basal intracellular calcium concentration elevation, and for the proliferation and migration of rat distal pulmonary venous smooth muscle cells. *Molecular Medicine Reports* (2), 1577–1585.
- 404)** Wang, J.; Jiang, Q.; Wan, L.; Yang, K.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Wang, E.; Lai, N.; Zhao, L.; Jiang, H.; Sun, Y.; Zhong, N.; Ran, P.; Lu, W. (2013): Sodium tanshinone IIA sulfonate inhibits canonical transient receptor potential expression in pulmonary arterial smooth muscle from pulmonary hypertensive rats. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (1), 125–134.
- 405)** Li, X.; Lu, W.; Fu, X.; Zhang, Y.; Yang, K.; Zhong, N.; Ran, P.; Wang, J. (2013): BMP4 increases canonical transient receptor potential protein expression by activating p38 MAPK and ERK1/2 signaling pathways in pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (2), 212–220.
- 406)** Kerr, J. B. (1999): Atlas of functional histology. 2. Aufl. London u.a.: Mosby.

Literaturverzeichnis

- 407)** Durmowicz, A. G.; Stenmark, K. R. (1999): Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Pediatrics in Review/ American Academy of Pediatrics* (11), 91–102.
- 408)** Sweeney, M.; Yuan, J. X. (2000): Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated potassium channels. *Respiratory Research* (1), 40–48.
- 409)** Jiang, Q.; Fu, X.; Tian, L.; Chen, Y.; Yang, K.; Chen, X.; Zhang, J.; Lu, W.; Wang, J. (2014): NOX4 mediates BMP4-induced upregulation of TRPC1 and 6 protein expressions in distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *PLoS One* (9), 107135.
- 410)** Wang, J.; Fu, X.; Yang, K.; Jiang, Q.; Chen, Y.; Jia, J.; Duan, X.; Wang, E. W.; He, J.; Ran, P.; Zhong, N.; Semenza, G. L.; Lu, W. (2015): Hypoxia inducible factor-1-dependent up-regulation of BMP4 mediates hypoxia-induced increase of TRPC expression in PASMCs. *Cardiovascular Research* (1), 108–118.
- 411)** 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. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (3), 498–507.
- 412)** Seth, M.; Zhang, Z.-S.; Mao, L.; Graham, V.; Burch, J.; Stiber, J.; Tsiokas, L.; Winn, M.; Abramowitz, J.; Rockman, H. A.; Birnbaumer, L.; Rosenberg, P. (2009): TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circulation Research* (10), 1023–1030.
- 413)** Sanchez, O.; Marie, E.; Lerolle, U.; Wermert, D.; Israel-Biet, D.; Meyer, G. (2010): Pulmonary arterial hypertension in women. *Revue des Maladies Respiratoires* (8), 79–87.
- 414)** Rich, S.; Dantzker, D. R.; Ayres, S. M.; Bergofsky, E. H.; Brundage, B. H.; Detre, K. M.; Fishman, A. P.; Goldring, R. M.; Groves, B. M.; Koerner, S. K. (1987): Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Annals of Internal Medicine* (2), 216–223.
- 415)** Pousada, G.; Balloira, A.; Valverde, D. (2015): Molecular and clinical analysis of TRPC6 and AGTR1 genes in patients with pulmonary arterial hypertension. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1.
- 416)** Dhennin-Duthille, I.; Gautier, M.; Faouzi, M.; Guilbert, A.; Brevet, M.; Vaudry, D.; Ahidouch, A.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. (2011): High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cellular Physiology and Biochemistry: International*

Literaturverzeichnis

- Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (5), 813–822.
- 417)** Zeng, B.; Yuan, C.; Yang, X.; Atkin, S. L.; Xu, S.-Z. (2013): TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Current Cancer Drug Targets* (1), 103–116.
- 418)** Sweeney, M.; Yu, Y.; Platoshyn, O.; Zhang, S.; McDaniel, S. S.; Yuan, J. X. (2002): Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (1), 144–155.
- 419)** Kuang, C.-y.; Yu, Y.; Guo, R.-w.; Qian, D.-h.; Wang, K.; Den, M.-y.; Shi, Y.-k.; Huang, L. (2010): Silencing stromal interaction molecule 1 by RNA interference inhibits the proliferation and migration of endothelial progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2), 315–320.
- 420)** Louis, M.; Zanou, N.; van Schoor, M.; Gailly, P. (2008): TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *Journal of Cell Science* (Pt 23), 3951–3959.
- 421)** Fabian, A.; Fortmann, T.; Dieterich, P.; Riethmuller, C.; Schon, P.; Mally, S.; Nilius, B.; Schwab, A. (2008): TRPC1 channels regulate directionality of migrating cells. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* (2), 475–484.
- 422)** Bujo, H.; Saito, Y. (2006): Modulation of smooth muscle cell migration by members of the low-density lipoprotein receptor family. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (6), 1246–1252.
- 423)** Donatis, A. de; Comito, G.; Buricchi, F.; Vinci, M. C.; Parenti, A.; Caselli, A.; Camici, G.; Manao, G.; Ramponi, G.; Cirri, P. (2008): Proliferation versus migration in platelet-derived growth factor signaling: the key role of endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* (29), 19948–19956.
- 424)** Li, C.; Wernig, F.; Leitges, M.; Hu, Y.; Xu, Q. (2003): Mechanical stress-activated PKCdelta regulates smooth muscle cell migration. *Federation of American Societies for Experimental Biology* (14), 2106–2108.
- 425)** Louis, S. F.; Zahradka, P. (2010): Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Experimental and Clinical Cardiology* (4), 75–85.
- 426)** Redmond, E. M.; Cahill, P. A.; Hirsch, M.; Wang, Y. N.; Sitzmann, J. V.; Okada, S. S. (1999): Effect of pulse pressure on vascular smooth muscle cell migration: the role of urokinase and matrix metalloproteinase. *Thrombosis and Haemostasis* (2), 293–300.

Literaturverzeichnis

- 427) Garanich, J. S.; Pahakis, M.; Tarbell, J. M. (2005): Shear stress inhibits smooth muscle cell migration via nitric oxide-mediated downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* (5), 2244–2252.
- 428) Wang, H. Q.; Huang, L. X.; Qu, M. J.; Yan, Z. Q.; Liu, B.; Shen, B. R.; Jiang, Z. L. (2006): Shear stress protects against endothelial regulation of vascular smooth muscle cell migration in a coculture system. *Endothelium: journal of Endothelial Cell Research* (3), 171–180.
- 429) Rensen, S. S. M.; Doevendans, P. A. F. M.; Van Eys, G. J. J. M. (2007): Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal: Monthly Journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* (3), 100–108.
- 430) Lee, S. H.; Hungerford, J. E.; Little, C. D.; Iruela-Arispe, M. L. (1997): Proliferation and differentiation of smooth muscle cell precursors occurs simultaneously during the development of the vessel wall. *Developmental Dynamics: an official Publication of the American Association of Anatomists* (4), 342–352.
- 431) Fernandez, R. A.; Wan, J.; Song, S.; Smith, K. A.; Gu, Y.; Tauseef, M.; Tang, H.; Makino, A.; Mehta, D.; Yuan, J. X. (2015): Upregulated expression of STIM2, TRPC6, and Orai2 contributes to the transition of pulmonary arterial smooth muscle cells from a contractile to proliferative phenotype. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (8), 581–593.
- 432) Beamish, J. A.; He, P.; Kottke-Marchant, K.; Marchant, R. E. (2010): Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* (5), 467–491.
- 433) Hedin, U.; Bottger, B. A.; Luthman, J.; Johansson, S.; Thyberg, J. (1989): A substrate of the cell-attachment sequence of fibronectin (Arg-Gly-Asp-Ser) is sufficient to promote transition of arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Developmental Biology* (2), 489–501.
- 434) Thyberg, J.; Hultgardh-Nilsson, A. (1994): Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell and Tissue Research* (2), 263–271.
- 435) Corjay, M. H.; Thompson, M. M.; Lynch, K. R.; Owens, G. K. (1989): Differential effect of platelet-derived growth factor- versus serum-induced growth on smooth muscle alpha-

Literaturverzeichnis

- actin and nonmuscle beta-actin mRNA expression in cultured rat aortic smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry* (18), 10501–10506.
- 436)** Hautmann, M. B.; Madsen, C. S.; Owens, G. K. (1997): A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *The Journal of Biological Chemistry* (16), 10948–10956.
- 437)** Reusch, P.; Wagdy, H.; Reusch, R.; Wilson, E.; Ives, H. E. (1996): Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* (5), 1046–1053.
- 438)** Su, B.; Mitra, S.; Gregg, H.; Flavahan, S.; Chotani, M. A.; Clark, K. R.; Goldschmidt-Clermont, P. J.; Flavahan, N. A. (2001): Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Circulation Research* (1), 39–46.
- 439)** Vrancken Peeters, M. P.; Gittenberger-de Groot, A. C.; Mentink, M. M.; Poelmann, R. E. (1999): Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anatomy and Embryology* (4), 367–378.
- 440)** Frid, M. G.; Aldashev, A. A.; Dempsey, E. C.; Stenmark, K. R. (1997): Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circulation Research* (6), 940–952.
- 441)** Ang, A. H.; Tachas, G.; Campbell, J. H.; Bateman, J. F.; Campbell, G. R. (1990): Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *The Biochemical Journal* (2), 461–469.
- 442)** Perez-Reyes, E. (2003): Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Reviews* (1), 117–161.
- 443)** House, S. J.; Potier, M.; Bisaillon, J.; Singer, H. A.; Trebak, M. (2008): The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* (5), 769–785.
- 444)** Rodman, D. M.; Reese, K.; Harral, J.; Fouty, B.; Wu, S.; West, J.; Hoedt-Miller, M.; Tada, Y.; Li, K.-X.; Cool, C.; Fagan, K.; Cribbs, L. (2005): Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circulation Research* (8), 864–872.
- 445)** Wan, J.; Yamamura, A.; Zimnicka, A. M.; Voiriot, G.; Smith, K. A.; Tang, H.; Ayon, R. J.; Choudhury, M. S. R.; Ko, E. A.; Wang, J.; Wang, C.; Makino, A.; Yuan, J. X. (2013): Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca²⁺ channel

Literaturverzeichnis

- activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (2), 154–164.
- 446)** Xia, Y.; Fu, Z.; Hu, J.; Huang, C.; Paudel, O.; Cai, S.; Liedtke, W.; Sham, J. S. K. (2013): TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (7), 704–715.
- 447)** Pozeg, Z. I.; Michelakis, E. D.; McMurtry, M. S.; Thebaud, B.; Wu, X.; Dyck, J. R. B.; Hashimoto, K.; Wang, S.; Moudgil, R.; Harry, G.; Sultanian, R.; Koshal, A.; Archer, S. L. (2003): In vivo gene transfer of the O₂-sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Circulation* (15), 2037–2044.
- 448)** Weir, E. K.; Olschewski, A. (2006): Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia. *Cardiovascular Research* (4), 630–641.
- 449)** Short, A. D.; Bian, J.; Ghosh, T. K.; Waldron, R. T.; Rybak, S. L.; Gill, D. L. (1993): Intracellular Ca²⁺ pool content is linked to control of cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (11), 4986–4990.
- 450)** Means, A. R.; Rasmussen, C. D. (1988): Calcium, calmodulin and cell proliferation. *Cell Calcium* (5-6), 313–319.
- 451)** Takahashi, Y.; Watanabe, H.; Murakami, M.; Ohba, T.; Radovanovic, M.; Ono, K.; Iijima, T.; Ito, H. (2007): Involvement of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Atherosclerosis* (2), 287–296.
- 452)** Tajeddine, N.; Gailly, P. (2012): TRPC1 protein channel is major regulator of epidermal growth factor receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry* (20), 16146–16157.
- 453)** Asghar, M. Y.; Magnusson, M.; Kemppainen, K.; Sukumaran, P.; Lof, C.; Pulli, I.; Kalhori, V.; Tornquist, K. (2015): Transient Receptor Potential Canonical 1 (TRPC1) Channels as Regulators of Sphingolipid and VEGF Receptor Expression: Implications for thyroid cancer cell migration and proliferation. *The Journal of Biological Chemistry* (26), 16116–16131.
- 454)** Beech, D. J.; Muraki, K.; Flemming, R. (2004): Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. *The Journal of Physiology* (3), 685–706.

Literaturverzeichnis

- 455) Lu, W.; Ran, P.; Zhang, D.; Peng, G.; Li, B.; Zhong, N.; Wang, J. (2010): Sildenafil inhibits chronically hypoxic upregulation of canonical transient receptor potential expression in rat pulmonary arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (1), 114–123.
- 456) Premkumar, D. R.; Mishra, R. R.; Overholt, J. L.; Simonson, M. S.; Cherniack, N. S.; Prabhakar, N. R. (2000): L-type Ca^{2+} channel activation regulates induction of c-fos transcription by hypoxia. *Journal of Applied Physiology* (5), 1898–1906.
- 457) Pottorf, W. J.; Duckles, S. P.; Buchholz, J. N. (2000): Mechanisms of calcium buffering in adrenergic neurones and effects of ageing: testing the limits of homeostasis. *Journal of Autonomic Pharmacology* (2), 63–75.
- 458) Kapur, N. K.; Qiao, X.; Paruchuri, V.; Mackey, E. E.; Daly, G. H.; Ughreja, K.; Morine, K. J.; Levine, J.; Aronovitz, M. J.; Hill, N. S.; Jaffe, I. Z.; Letarte, M.; Karas, R. H. (2014): Reducing endoglin activity limits calcineurin and TRPC-6 expression and improves survival in a mouse model of right ventricular pressure overload. *Journal of the American Heart Association* (4).
- 459) Wang, C.; Li, J.-F.; Zhao, L.; Liu, J.; Wan, J.; Wang, Y. X.; Wang, J.; Wang, C. (2009): Inhibition of SOC/ Ca^{2+} /NFAT pathway is involved in the anti-proliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells. *Respiratory Research*, 123.
- 460) Jernigan, N. L.; Broughton, B. R. S.; Walker, B. R.; Resta, T. C. (2006): Impaired NO-dependent inhibition of store- and receptor-operated calcium entry in pulmonary vascular smooth muscle after chronic hypoxia. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (3), 517–525.
- 461) Robin, P.; Boulven, I.; Desmyter, C.; Harbon, S.; Leiber, D. (2002): ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (1), 251–260.
- 462) Higuchi, S.; Ohtsu, H.; Suzuki, H.; Shirai, H.; Frank, G. D.; Eguchi, S. (2007): Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clinical Science* (8), 417–428.
- 463) Reisenberg, M.; Singh, P. K.; Williams, G.; Doherty, P. (2012): The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* (1607), 3264–3275.
- 464) Pisarcik, S.; Maylor, J.; Lu, W.; Yun, X.; Undem, C.; Sylvester, J. T.; Semenza, G. L.; Shimoda, L. A. (2013): Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial

Literaturverzeichnis

- smooth muscle cells by endothelin-1. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (8), 549–561.
- 465)** Zheng, X.; Xu, J.; Chen, X. I.; Li, W.; Wang, T. (2015): Attenuation of oxygen fluctuation-induced endoplasmic reticulum stress in human lens epithelial cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* (5), 1883–1887.
- 466)** Rao, G. K.; Kaminski, N. E. (2006): Induction of intracellular calcium elevation by Delta9-tetrahydrocannabinol in T cells involves TRPC1 channels. *Journal of Leukocyte Biology* (1), 202–213.
- 467)** Vazquez, G.; Wedel, B. J.; Trebak, M.; St John Bird, G.; Putney, J. W. (2003): Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation. *The Journal of Biological Chemistry* (24), 21649–21654.
- 468)** Pani, B.; Ong, H. L.; Liu, X.; Rauser, K.; Ambudkar, I. S.; Singh, B. B. (2008): Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). *The Journal of Biological Chemistry* (25), 17333–17340.
- 469)** Patel, H. H.; Zhang, S.; Murray, F.; Suda, R. Y.S.; Head, B. P.; Yokoyama, U.; Swaney, J. S.; Niesman, I. R.; Schermuly, R. T.; Pullamsetti, S. S.; Thistlethwaite, P. A.; Miyanochara, A.; Farquhar, M. G.; Yuan, J. X.-J.; Insel, P. A. (2007): Increased smooth muscle cell expression of caveolin-1 and caveolae contribute to the pathophysiology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* (11), 2970–2979.
- 470)** Stiebellehner, L.; Frid, M. G.; Reeves, J. T.; Low, R. B.; Gnanasekharan, M.; Stenmark, K. R. (2003): Bovine distal pulmonary arterial media is composed of a uniform population of well-differentiated smooth muscle cells with low proliferative capabilities. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (4), 819–828.
- 471)** Belknap, J. K.; Orton, E. C.; Ensley, B.; Tucker, A.; Stenmark, K. R. (1997): Hypoxia increases bromodeoxyuridine labeling indices in bovine neonatal pulmonary arteries. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (4), 366–371.
- 472)** Golovina, V. A. (1999): Cell proliferation is associated with enhanced capacitative Ca^{2+} entry in human arterial myocytes. *The American Journal of Physiology* (2), 343–349.
- 473)** Das, M.; Bouche, D. M.; Moore, M. J.; Hopkins, D. C.; Nemenoff, R. A.; Stenmark, K. R. (2001): Hypoxia-induced proliferative response of vascular adventitial fibroblasts is

Literaturverzeichnis

- dependent on g protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry* (19), 15631–15640.
- 474)** Welsh, D. J.; Scott, P. H.; Peacock, A. J. (2006): p38 MAP kinase isoform activity and cell cycle regulators in the proliferative response of pulmonary and systemic artery fibroblasts to acute hypoxia. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* (2), 128–138.
- 475)** El Hiani, Y.; Ahidouch, A.; Lehen'kyi, V.; Hague, F.; Gouilleux, F.; Mentaverri, R.; Kamel, S.; Lassoued, K.; Brule, G.; Ouadid-Ahidouch, H. (2009): Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and TRPC1 channels are required for calcium-sensing receptor-stimulated MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (4-6), 335–346.
- 476)** El Hiani, Y.; Lehen'kyi, V.; Ouadid-Ahidouch, H.; Ahidouch, A. (2009): Activation of the calcium-sensing receptor by high calcium induced breast cancer cell proliferation and TRPC1 cation channel over-expression potentially through EGFR pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1), 58–63.
- 477)** Toledano-Katchalski, H.; Kraut, J.; Sines, T.; Granot-Attas, S.; Shohat, G.; Gil-Henn, H.; Yung, Y.; Elson, A. (2003): Protein tyrosine phosphatase epsilon inhibits signaling by mitogen-activated protein kinases. *Molecular Cancer Research: MCR* (7), 541–550.
- 478)** Paul, S.; Nairn, A. C.; Wang, P.; Lombroso, P. J. (2003): NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling. *Nature Neuroscience* (1), 34–42.
- 479)** Shields, K. M.; Panzhinskiy, E.; Burns, N.; Zawada, W. M.; Das, M. (2011): Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a key regulator of hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and vessel density in lung. *The American Journal of Pathology* (1), 98–109.
- 480)** Yang, Y.; Zhou, J.-Y.; Zhao, L.-J.; Gao, B.-R.; Wan, X.-P.; Wang, J.-L. (2016): Dual-specificity Phosphatase 1 Deficiency Induces Endometrioid Adenocarcinoma Progression via Activation of Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *Chinese Medical Journal* (10), 1154–1160.
- 481)** Trollmann, R.; Rehrauer, H.; Schneider, C.; Krischke, G.; Huemmler, N.; Keller, S.; Rascher, W.; Gassmann, M. (2010): Late-gestational systemic hypoxia leads to a similar early gene response in mouse placenta and developing brain. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (6), 1489–1499.

Literaturverzeichnis

- 482)** Liu, Y.-X.; Wang, J.; Guo, J.; Wu, J.; Lieberman, H. B.; Yin, Y. (2008): DUSP1 is controlled by p53 during the cellular response to oxidative stress. *Molecular Cancer Research: MCR* (4), 624–633.
- 483)** Osorio-Fuentealba, C.; Valdes, J. A.; Riquelme, D.; Hidalgo, J.; Hidalgo, C.; Carrasco, M. A. (2009): Hypoxia stimulates via separate pathways ERK phosphorylation and NF-kappaB activation in skeletal muscle cells in primary culture. *Journal of Applied Physiology* (4), 1301–1310.
- 484)** Weisel, F. C.; Kloepping, C.; Pichl, A.; Sydykov, A.; Kojonazarov, B.; Wilhelm, J.; Roth, M.; Ridge, K. M.; Igarashi, K.; Nishimura, K.; Maison, W.; Wackendorff, C.; Klepetko, W.; Jaksch, P.; Ghofrani, H. A.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Schermuly, R. T.; Weissmann, N.; Kwapiszewska, G. (2014): Impact of S-adenosylmethionine decarboxylase 1 on pulmonary vascular remodeling. *Circulation* (14), 1510–1523.
- 485)** Autheman, D.; Sheldon, R. A.; Chaudhuri, N.; Von Arx, S.; Siegenthaler, C.; Ferriero, D. M.; Christen, S. (2012): Glutathione peroxidase overexpression causes aberrant ERK activation in neonatal mouse cortex after hypoxic preconditioning. *Pediatric Research* (6), 568–575.
- 486)** Xu, L.; Pathak, P. S.; Fukumura, D. (2004): Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* (2), 701–707.
- 487)** Jiang, Y.; Dai, A.; Li, Q.; Hu, R. (2007): Hypoxia induces transforming growth factor-beta1 gene expression in the pulmonary artery of rats via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (1), 73–80.
- 488)** Sheares, K. K. K.; Jeffery, T. K.; Long, L.; Yang, X.; Morrell, N. W. (2004): Differential effects of TGF-beta1 and BMP-4 on the hypoxic induction of cyclooxygenase-2 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (5), 919–927.
- 489)** Schultz, K.; Fanburg, B. L.; Beasley, D. (2006): Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* (6), 2528–2534.
- 490)** Faller, D. V. (1999): Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (1), 74–84.

Literaturverzeichnis

- 491)** Gillespie, M. N.; Olson, J. W. (2010): Polyamine regulatory pathways as pharmacologic targets in pulmonary arterial hypertension. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 375–389.
- 492)** Kourembanas, S.; Hannan, R. L.; Faller, D. V. (1990): Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* (2), 670–674.
- 493)** Kremer, C.; Breier, G.; Risau, W.; Plate, K. H. (1997): Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Research* (17), 3852–3859.
- 494)** Joung, Y.-H.; Lee, M.-Y.; Lim, E.-J.; Kim, M.-S.; Hwang, T. S.; Kim, S.-Y.; Ye, S.-K.; Lee, J.-D.; Park, T.; Woo, Y.-S.; Chung, I.-M.; Yang, Y. M. (2007): Hypoxia activates the IGF-1 expression through STAT5b in human HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (3), 733–738.
- 495)** Paria, B. C.; Vogel, S. M.; Ahmmed, G. U.; Alamgir, S.; Shroff, J.; Malik, A. B.; Tirupathi, C. (2004): Tumor necrosis factor-alpha-induced TRPC1 expression amplifies store-operated Ca²⁺ influx and endothelial permeability. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (6), 1303–1313.
- 496)** Paria, B. C.; Malik, A. B.; Kwiatek, A. M.; Rahman, A.; May, M. J.; Ghosh, S.; Tirupathi, C. (2003): Tumor necrosis factor-alpha induces nuclear factor-kappaB-dependent TRPC1 expression in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* (39), 37195–37203.
- 497)** Hai, L.; Kawarabayashi, Y.; Imai, Y.; Honda, A.; Inoue, R. (2011): Counteracting effect of TRPC1-associated Ca²⁺ influx on TNF-alpha-induced COX-2-dependent prostaglandin E2 production in human colonic myofibroblasts. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* (2), 356–367.
- 498)** Nakao, S.; Ogtata, Y.; Shimizu, E.; Yamazaki, M.; Furuyama, S.; Sugiya, H. (2002): Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry* (1-2), 11–18.
- 499)** Groth, A. M. (2014): Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension. Zürich.
- 500)** Li, J.; Rao, J.; Liu, Y.; Cao, Y.; Zhang, Y.; Zhang, Q.; Zhu, D. (2013): 15-Lipoxygenase promotes chronic hypoxia-induced pulmonary artery inflammation via positive interaction with nuclear factor-kappaB. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (5), 971–979.

Literaturverzeichnis

- 501)** Huang, J.; Kaminski, P. M.; Edwards, J. G.; Yeh, A.; Wolin, M. S.; Frishman, W. H.; Gewitz, M. H.; Mathew, R. (2008): Pyrrolidine dithiocarbamate restores endothelial cell membrane integrity and attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (6), 1250–1259.
- 502)** Sawada, H.; Mitani, Y.; Maruyama, J.; Jiang, B. H.; Ikeyama, Y.; Dida, F. A.; Yamamoto, H.; Imanaka-Yoshida, K.; Shimpō, H.; Mizoguchi, A.; Maruyama, K.; Komada, Y. (2007): A nuclear factor-kappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Chest* (4), 1265–1274.
- 503)** Sarada, S. K. S.; Veeramohan; P, H.; Mathew, T.; Saumya, S.; Chitharanjan, M. (2012): Nifedipine inhibits hypoxia induced transvascular leakage through down regulation of NFkB. *Respiratory Physiology and Neurobiology* (1), 26–34.
- 504)** Buckley, C. D.; Pilling, D.; Lord, J. M.; Akbar, A. N.; Scheel-Toellner, D.; Salmon, M. (2001): Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends in Immunology* (4), 199–204.
- 505)** Deng, X.; Xu, M.; Yuan, C.; Yin, L.; Chen, X.; Zhou, X.; Li, G.; Fu, Y.; Feghali-Bostwick, C. A.; Pang, L. (2013): Transcriptional regulation of increased CCL2 expression in pulmonary fibrosis involves nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (7), 1366–1376.
- 506)** Sutendra, G.; Dromparis, P.; Bonnet, S.; Haromy, A.; McMurtry, M. S.; Bleackley, R. C.; Michelakis, E. D. (2011): Pyruvate dehydrogenase inhibition by the inflammatory cytokine TNFalpha contributes to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Journal of Molecular Medicine* (8), 771–783.
- 507)** Chen, C.; Chou, C.; Sun, Y.; Huang, W. (2001): Tumor necrosis factor alpha-induced activation of downstream NF-kappaB site of the promoter mediates epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of PKCalpha, tyrosine kinase, and IKK2, but not MAPKs, pathway. *Cellular Signalling* (8), 543–553.
- 508)** Price, L. C.; Caramori, G.; Perros, F.; Meng, C.; Gambaryan, N.; Dorfmueller, P.; Montani, D.; Casolari, P.; Zhu, J.; Dimopoulos, K.; Shao, D.; Girerd, B.; Mumby, S.; Proudfoot, A.; Griffiths, M.; Papi, A.; Humbert, M.; Adcock, I. M.; Wort, S. J. (2013): Nuclear factor kappa-B is activated in the pulmonary vessels of patients with end-stage idiopathic pulmonary arterial hypertension. *PloS One* (10), 75415.

Literaturverzeichnis

- 509)** Stenmark, K. R.; Yeager, M. E.; El Kasmi, K. C.; Nozik-Grayck, E.; Gerasimovskaya, E. V.; Li, M.; Riddle, S. R.; Frid, M. G. (2013): The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annual Review of Physiology*, 23–47.
- 510)** Euler-Taimor, G.; Heger, J. (2006): The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* (1), 15–25.
- 511)** Massague, J.; Seoane, J.; Wotton, D. (2005): Smad transcription factors. *Genes and Development* (23), 2783–2810.
- 512)** Massague, J. (2008): TGFbeta in Cancer. *Cell* (2), 215–230.
- 513)** Dijke, P. ten; Miyazono, K.; Heldin, C. H. (2000): Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends in Biochemical Sciences* (2), 64–70.
- 514)** Dennler, S.; Itoh, S.; Vivien, D.; Dijke, P. ten; Huet, S.; Gauthier, J. M. (1998): Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *The EMBO Journal* (11), 3091–3100.
- 515)** Shi, Y.; Massague, J. (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* (6), 685–700.
- 516)** Bujak, M.; Frangogiannis, N. G. (2007): The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovascular Research* (2), 184–195.
- 517)** Semenza, G. L. (2009): Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology*, 97–106.
- 518)** Ueno, M.; Maeno, T.; Nomura, M.; Aoyagi-Ikeda, K.; Matsui, H.; Hara, K.; Tanaka, T.; Iso, T.; Suga, T.; Kurabayashi, M. (2011): Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates TGF-beta-induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (5), 740–752.
- 519)** Hellwig-Burgel, T.; Rutkowski, K.; Metzen, E.; Fandrey, J.; Jelkmann, W. (1999): Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* (5), 1561–1567.
- 520)** Laughner, E.; Taghavi, P.; Chiles, K.; Mahon, P. C.; Semenza, G. L. (2001): HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and cellular biology* (12), 3995–4004.
- 521)** Fukuda, R.; Hirota, K.; Fan, F.; Jung, Y. D.; Ellis, L. M.; Semenza, G. L. (2002): Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol

Literaturverzeichnis

- 3-kinase signaling in colon cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* (41), 38205–38211.
- 522) Sanders, K. A.; Hoidal, J. R. (2007): The NOX on pulmonary hypertension. *Circulation Research* (3), 224–226.
- 523) Sturrock, A.; Cahill, B.; Norman, K.; Huecksteadt, T. P.; Hill, K.; Sanders, K.; Karwande, S. V.; Stringham, J. C.; Bull, D. A.; Gleich, M.; Kennedy, T. P.; Hoidal, J. R. (2006): Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (4), 661–673.
- 524) Djordjevic, T.; BelAiba, R. S.; Bonello, S.; Pfeilschifter, J.; Hess, J.; Gorlach, A. (2005): Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (3), 519–525.
- 525) Diebold, I.; Petry, A.; Burger, M.; Hess, J.; Gorlach, A. (2011): NOX4 mediates activation of FoxO3a and matrix metalloproteinase-2 expression by urotensin-II. *Molecular Biology of the Cell* (22), 4424–4434.
- 526) Frank, D. B.; Abtahi, A.; Yamaguchi, D. J.; Manning, S.; Shyr, Y.; Pozzi, A.; Baldwin, H. S.; Johnson, J. E.; Caestecker, M. P. de (2005): Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation Research* (5), 496–504.
- 527) Weaver, M.; Yingling, J. M.; Dunn, N. R.; Bellusci, S.; Hogan, B. L. (1999): Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development* (18), 4005–4015.
- 528) Weaver, M.; Dunn, N. R.; Hogan, B. L. (2000): Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development* (12), 2695–2704.
- 529) Jiang, F.; Zhang, Y.; Dusting, G. J. (2011): NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacological Reviews* (1), 218–242.
- 530) Shimoda, L. A.; Wang, J.; Sylvester, J. T. (2006): Ca²⁺ channels and chronic hypoxia. *Microcirculation* (8), 657–670.
- 531) Page, E. L.; Robitaille, G. A.; Pouyssegur, J.; Richard, D. E. (2002): Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* (50), 48403–48409.

Literaturverzeichnis

- 532) Morrell, N. W.; Danilov, S. M.; Satyan, K. B.; Morris, K. G.; Stenmark, K. R. (1997): Right ventricular angiotensin converting enzyme activity and expression is increased during hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovascular Research* (2), 393–403.
- 533) Orte, C.; Polak, J. M.; Haworth, S. G.; Yacoub, M. H.; Morrell, N. W. (2000): Expression of pulmonary vascular angiotensin-converting enzyme in primary and secondary plexiform pulmonary hypertension. *The Journal of Pathology* (3), 379–384.
- 534) Zhang, X.; Ji, J.; Yan, G.; Wu, J.; Sun, X.; Shen, J.; Jiang, H.; Wang, H. (2010): Sildenafil promotes adipogenesis through a PKG pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (4), 1054–1059.
- 535) Wang, J.; Yang, K.; Xu, L.; Zhang, Y.; Lai, N.; Jiang, H.; Zhang, Y.; Zhong, N.; Ran, P.; Lu, W. (2013): Sildenafil inhibits hypoxia-induced transient receptor potential canonical protein expression in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-PKG-PPARgamma axis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (2), 231–240.
- 536) Hill-Eubanks, D. C.; Gomez, M. F.; Stevenson, A. S.; Nelson, M. T. (2003): NFAT regulation in smooth muscle. *Trends in Cardiovascular Medicine* (2), 56–62.
- 537) Ikeda, F.; Nishimura, R.; Matsubara, T.; Hata, K.; Reddy, S. V.; Yoneda, T. (2006): Activation of NFAT signal in vivo leads to osteopenia associated with increased osteoclastogenesis and bone-resorbing activity. *Journal of Immunology* (4), 2384–2390.
- 538) Heit, J. J.; Apelqvist, A. A.; Gu, X.; Winslow, M. M.; Neilson, J. R.; Crabtree, G. R.; Kim, S. K. (2006): Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* (7109), 345–349.
- 539) Nilsson, L. M.; Sun, Z.-W.; Nilsson, J.; Nordstrom, I.; Chen, Y.-W.; Molkentin, J. D.; Wide-Svensson, D.; Hellstrand, P.; Lydrup, M.-L.; Gomez, M. F. (2007): Novel blocker of NFAT activation inhibits IL-6 production in human myometrial arteries and reduces vascular smooth muscle cell proliferation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (3), 1167–1178.
- 540) Jabr, R. I.; Wilson, A. J.; Riddervold, M. H.; Jenkins, A. H.; Perrino, B. A.; Clapp, L. H. (2007): Nuclear translocation of calcineurin Abeta but not calcineurin Aalpha by platelet-derived growth factor in rat aortic smooth muscle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* (6), 2213–2225.
- 541) Nishida, M.; Onohara, N.; Sato, Y.; Suda, R.; Ogushi, M.; Tanabe, S.; Inoue, R.; Mori, Y.; Kurose, H. (2007): Galpha12/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis

Literaturverzeichnis

- through nuclear factor of activated T cells activation. *The Journal of Biological Chemistry* (32), 23117–23128.
- 542)** Friday, B. B.; Pavlath, G. K. (2001): A calcineurin- and NFAT-dependent pathway regulates Myf5 gene expression in skeletal muscle reserve cells. *Journal of Cell Science* (2), 303–310.
- 543)** De Frutos, S.; Spangler, R.; Alo, D.; Bosc, L. V. G. (2007): NFATc3 mediates chronic hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling with alpha-actin up-regulation. *The Journal of Biological Chemistry* (20), 15081–15089.
- 544)** Yiu, G. K.; Toker, A. (2006): NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *The Journal of Biological Chemistry* (18), 12210–12217.
- 545)** Yuan, J. X.-J.; Garcia, J. G. N.; Hales, C. A.; Rich, S.; Archer, S. L.; West, J. B. (2011): Textbook of pulmonary vascular disease. 1. Aufl.: Springer US. New York, NY, S. 453–458.
- 546)** Gomez-Arroyo, J.; Saleem, S. J.; Mizuno, S.; Syed, A. A.; Bogaard, H. J.; Abbate, A.; Taraseviciene-Stewart, L.; Sung, Y.; Kraskauskas, D.; Farkas, D.; Conrad, D. H.; Nicolls, M. R.; Voelkel, N. F. (2012): A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (10), 977–991.
- 547)** Voelkel, N. F.; Gomez-Arroyo, J.; Mizuno, S. (2011): COPD/emphysema: The vascular story. *Pulmonary Circulation* (3), 320–326.
- 548)** Ciuculan, L.; Bonneau, O.; Hussey, M.; Duggan, N.; Holmes, A. M.; Good, R.; Stringer, R.; Jones, P.; Morrell, N. W.; Jarai, G.; Walker, C.; Westwick, J.; Thomas, M. (2011): A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (10), 1171–1182.
- 549)** Vitali, S. H.; Hansmann, G.; Rose, C.; Fernandez-Gonzalez, A.; Scheid, A.; Mitsialis, S. A.; Kourembanas, S. (2014): The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up. *Pulmonary Circulation* (4), 619–629.
- 550)** Frid, M. G.; Moiseeva, E. P.; Stenmark, K. R. (1994): Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo. *Circulation Research* (4), 669–681.
- 551)** Wohrley, J. D.; Frid, M. G.; Moiseeva, E. P.; Orton, E. C.; Belknap, J. K.; Stenmark, K. R. (1995): Hypoxia selectively induces proliferation in a specific subpopulation of smooth muscle cells in the bovine neonatal pulmonary arterial media. *The Journal of Clinical Investigation* (1), 273–281.

Literaturverzeichnis

- 552) Dempsey, E. C.; Frid, M. G.; Aldashev, A. A.; Das, M.; Stenmark, K. R. (1997): Heterogeneity in the proliferative response of bovine pulmonary artery smooth muscle cells to mitogens and hypoxia: importance of protein kinase C. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (7), 936–944.
- 553) Dempsey, E. C.; McMurtry, I. F.; O'Brien, R. F. (1991): Protein kinase C activation allows pulmonary artery smooth muscle cells to proliferate to hypoxia. *The American Journal of Physiology* (2), 136–145.
- 554) Frid, M. G.; Li, M.; Gnanasekharan, M.; Burke, D. L.; Fragoso, M.; Strassheim, D.; Sylman, J. L.; Stenmark, K. R. (2009): Sustained hypoxia leads to the emergence of cells with enhanced growth, migratory, and promitogenic potentials within the distal pulmonary artery wall. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* (6), 1059–1072.
- 555) Howard, L. S.; Crosby, A.; Vaughan, P.; Sobolewski, A.; Southwood, M.; Foster, M. L.; Chilvers, E. R.; Morrell, N. W. (2012): Distinct responses to hypoxia in subpopulations of distal pulmonary artery cells contribute to pulmonary vascular remodeling in emphysema. *Pulmonary Circulation* (2), 241–249.
- 556) Worth, N. F.; Rolfe, B. E.; Song, J.; Campbell, G. R. (2001): Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton* (3), 130–145.

13 Eigenständigkeitserklärung

„Ich, Monika Malczyk, erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten“.

Datum:

Unterschrift:

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Doktorarbeit begleitet haben.

Zuerst gebührt mein Dank besonders Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann für die Bereitstellung des von mir bearbeiteten Themas, für den Arbeitsplatz und die notwendigen Materialien sowie für die Unterstützung und Finanzierung.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Alexander Dietrich für die Kooperationsarbeit, die Bereitstellung der transgenen Mauslinie sowie die vielen fachlichen Gespräche und Herrn Prof. Dr. med. Veit Flockerzi für die Bereitstellung des TRPC1-Antikörpers 9F2-E4. Ich danke außerdem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Lakes-Harlan für die Betreuung im Fachbereich Biologie.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Christine Veith-Berger für die persönliche Betreuung während der Dissertation und Hilfestellung bei Versuchsdurchführungen bedanken. Ich danke außerdem Frau Dr. hum. biol. Beate Fuchs für die Betreuung im ersten halben Jahr meiner Dissertation. Außerdem möchte ich meinen Dank auch an Frau Dr. rer. nat. Dorothea Peters, Herrn Dr. rer. nat. Florian Veith und Frau Frederike Weisel, PhD für die Unterstützung in der Anfangszeit meiner Doktorarbeit bedanken. Frau Dr. vet. med. Simone Kraut danke ich für die Beratung bei der Durchführung der Tierversuche.

Ein großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Weißmann, insbesondere den technischen Assistenten Frau Karin Quanz (Physiologie), Frau Ingrid Breitenborn-Müller (Molekularbiologie), Frau Elisabeth Kappes, Frau Carmen Homberger, Frau Miriam Schmidt und Herrn Nils Schub (Zellkultur), Frau Lisa Fröhlich (Histologie) und Frau Sabine Hurka (Tierzucht) für die hervorragende Organisation im Labor und die Unterstützung bei verschiedenen Versuchen. Ferner danke ich meinen Kolleginnen Frau Azadeh Esfandiary, Frau Mariola Bednorz, Frau Alexandra Erb und Frau Susan Scheibe für die tolle Zeit im Doktorandenbüro, die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen sowie für die Zeit auf diversen Konferenzen und Fortbildungen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Anna Fiedler, Frau Alexandra Erb und Herrn Frederik Brosien für die Unterstützung während der Schreibphase meiner Doktorarbeit bedanken. Außerdem danke ich Frau Anna Fiedler ganz besonders für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt vor Herrn Frederik Brosien. Ich danke ihm für seine Unterstützung, Geduld, Ausdauer im privaten Lebensbereich und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für meine Sorgen hatte.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern für die Geduld und Unterstützung während meines gesamten Studiums sowie der Promotion bedanken. Ich danke ihnen, dass sie mir ermöglicht haben zu studieren und dass sie immer an mich geglaubt haben.

15 Anhang

15.1 Veröffentlichungen

- Malczyk, M.; Veith, C.; Schermuly, R. T.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Sommer, N.; Weissmann, N.; Pak, O. (2016): NADPH oxidases - do they play a role in TRPC regulation under hypoxia? *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* (1), 23–41.
- Malczyk, M.; Veith, C.; Fuchs, B.; Hofmann, K.; Storch, U.; Schermuly, R. T.; Witzenrath, M.; Ahlbrecht, K.; Fecher-Trost, C.; Flockerzi, V.; Ghofrani, H. A.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Weissmann, N. (2013): Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (12), 1451–1459.

15.2 Vorträge

- Malczyk M.; Fuchs B.; Schermuly R. T.; Ahlbrecht K.; Seeger W.; Gudermann T.; Dietrich A.; Weissmann N. and Veith C.: Molecular mechanisms of classical transient receptor potential 1 (TRPC1) dysregulation in chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. ATS 2016, San Fransisco, USA
- Malczyk M.: Role of Classical Transient Receptor Potential (TRPC) 1 in murine pulmonary arterial smooth muscle cell function in pulmonary hypertension. MBML Retreat 2014, Rauischholzhausen, Deutschland
- Malczyk M.: The role of transient receptor potential channels in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. MBML Retreat 2013, Rauischholzhausen, Deutschland

15.3 Posterpräsentation

- Malczyk M.; Fuchs B.; Schermuly R. T.; Ahlbrecht K.; Seeger W.; Gudermann T.; Dietrich A.; Weissmann N. and Veith C.: Cellular and molecular relevance of classical transient receptor potential 1 in chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. DPG 2016, Lübeck, Deutschland

Anhang

- Malczyk M.; Veith C.; Fuchs B.; Seeger W.; Gudermann T.; Dietrich A. and Weissmann N.: Classical transient receptor potential (TRPC) proteins in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension: importance of TRPC1. DZL 2015, Hamburg, Deutschland
- Malczyk M.; Veith C.; Fuchs B.; Schermuly R. T.; Witzentrath M.; Ahlbrecht K.; Ghofrani H. A.; Grimminger F.; Seeger W.; Gudermann T.; Dietrich A. and Weissmann N.: Role of classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. PVRI 2014, Bad Nauheim, Deutschland
- Malczyk M.; Veith C.; Fuchs B.; Schermuly R. T.; Witzentrath M.; Ahlbrecht K.; Ghofrani H. A.; Grimminger F.; Seeger W.; Gudermann T.; Dietrich A. and Weissmann N.: Classical Transient Receptor Potential (TRPC) 1 protein has a functional role in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. DZL 2014, Heidelberg, Deutschland
- Malczyk M.; Veith C.; Fuchs B.; Hofmann K.; Storch U.; Schermuly R. T.; Witzentrath M.; Ahlbrecht K.; Ghofrani H. A.; Grimminger F.; Seeger W.; Gudermann T.; Dietrich A. and Weissmann N.: Classical transient receptor potential 1 (TRPC1) channel is crucial for hypoxia-induced pulmonary hypertension. ATS 2014, San Diego, USA
- Malczyk M.; Dietrich A.; Fuchs B.; Grimminger F.; Seeger W.; Ghofrani H. A.; Schermuly R. T.; Gudermann T. and Weissmann N.: Expression of the classical transient receptor potential (TRPC)-channels in the pulmonary artery under chronic hypoxia. GGL Annual Conference 2014, Gießen, Deutschland
- Malczyk M.; Veith C.; Dietrich A.; Fuchs B.; Grimminger F.; Seeger W.; Ghofrani H. A.; Schermuly R. T.; Gudermann T. and Weissmann N.: The role of Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1) protein in pulmonary arterial smooth muscle cells (PAMSC) in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. GGL Annual Conference 2013, Gießen, Deutschland
- Malczyk M.; Dietrich A.; Fuchs B.; Grimminger F.; Seeger W.; Ghofrani H. A.; Schermuly R. T.; Gudermann T. and Weissmann N.: Expression of the classical transient receptor potential (TRPC)-channels in the pulmonary artery under chronic hypoxia. GGL Annual Conference 2012, Gießen, Deutschland

15.4 Awards

- 2015: Travel Award, MBML für erfolgreichen Abschluss
- 2014: GGL Best First Author Paper Award
- 2012: Travel Award, MBML First Place in Student Examination, Second Exam

15.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.