

**Sauerstoffsensoren und Signaltransduktionswege
der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion –
die Rolle von Diacylglycerol,
spannungsabhängigem Ca^{2+} -aktiviertem Kaliumkanal (B_K)
und
Hämoxygenase 2**

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

vorgelegt von
Markus Rupp
aus Nidderau-Erbstadt

Gießen 2010

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik II

Direktor: Prof. Dr. W. Seeger

des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Herr Prof. Dr. N. Weißmann

Gutachter: Herr Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation: 06. Juli 2010

Meinen lieben Eltern

Horst und Ute

“Discovery requires curiosity, cognition and courage.

In order to get ahead, you must get along.”

Denton A. Cooley M.D.

(22.08.1920, US-amerikanischer Pionier der Herzchirurgie)*

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN VIII

1 EINLEITUNG 1

1.1 Der pulmonale Kreislauf..... 1

1.2 Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion – HPV 2

1.3 Klinische Bedeutung der HPV 4

1.4 Sauerstoffsensorik und Signaltransduktion der HPV 5

1.5 Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) als Schlüsselstelle der akuten HPV 10

1.6 Hämoxxygenase 2 (HO-2) und spannungsabhängiger Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanal (B_K) als möglicher O_2 -Sensorkomplex..... 12

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation 14

2. MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 Mäuse..... 15

2.2 Geräte und Materialien für die physiologischen Untersuchungen..... 16

2.2.1 Geräte..... 16

2.2.2 Verbrauchsmaterialien 16

2.2.3 Präparationsmaterialien 17

2.2.4 Pharmaka, Gase und Chemikalien 17

2.3 Geräte und Materialien für die histologischen Untersuchungen 18

2.3.1 Geräte..... 18

2.3.2 Materialien..... 19

2.4 Geräte und Materialien für die Genotypisierung der $\text{HO-2}^{-/-}$ und $\text{HO-2}^{+/+}$ Mäuse 20

2.4.1 Geräte..... 20

2.4.2	Materialien.....	20
2.5	Isolierte, perfundierte und ventilierte Mauslunge.....	22
2.5.1	Einführung.....	22
2.5.2	Versuchsaufbau.....	22
2.5.3	Reinigung des Systems.....	24
2.5.4	Präparation der Mauslunge.....	24
2.5.5	Versuchsmodus.....	26
2.5.6	Verwendete Substanzen und Applikationsmodi.....	28
2.6	Invasive Bestimmung des rechtsventrikulären Blutdrucks.....	30
2.6.1	Einführung.....	30
2.6.2	Präparation und Bestimmung des RVSP.....	30
2.6.3	Bestimmung des Hämatokrit.....	31
2.7	Bestimmung des Verhältnisses der Masse des rechten Ventrikels zur Masse des linken Ventrikels plus Septum ($RV/(LV+S)$) als Maß der Rechtsherzhypertrophie.....	31
2.7.1	Einführung.....	31
2.7.2	Präparation der Herzen.....	32
2.8	Histologische und immunhistochemische Methoden.....	32
2.8.1	Einführung.....	32
2.8.2	Präparation der Lungen und Anfertigung der Schnittpräparate.....	32
2.8.3	Morphometrische Analyse der Lungengefäße - Muskularisierungsgrad.....	35
2.9	Genotypisierung der HO-2 ^{-/-} und HO-2 ^{+/+} Mäuse.....	36
2.9.1	Gewinnung von DNA.....	36
2.9.2	PCR – Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction).....	36
2.9.3	Gelelektrophorese.....	38
2.10	Statistische Auswertung.....	38
3.	ERGEBNISSE	39
3.1	Ergebnisse pharmakologischer Untersuchungen zum Einfluss des TRPC6- Aktivators DAG auf die akute Phase der HPV.....	39
3.1.1	R59949.....	39
3.1.2	OAG.....	42
3.1.3	U73122 und U73343.....	45

3.2	Ergebnisse pharmakologischer Untersuchungen zum Einfluss des TRPC6-Aktivators DAG auf die protrahierte Phase der HPV	50
3.2.1	R59949.....	50
3.3	HO-2 und spannungsabhängiger Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanal (B_K) als möglicher O_2 -Sensorkomplex	54
3.3.1	Akute und protrahierte Phase der HPV im Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge	54
3.3.2	Vasoreaktion auf Hypoxie und Thromboxananalogon U46619	56
3.3.3	Invasive Bestimmung des rechtsventrikulären Blutdrucks	57
3.3.4	Bestimmung des Hämatokrit	59
3.3.5	Bestimmung des Verhältnisses der Masse des rechten Ventrikels zur Masse des linken Ventrikels plus Septum ($\text{RV}/(\text{LV}+\text{S})$) als Maß der Rechtsherzhypertrophie.....	60
3.3.6	Morphometrische Analyse der Lungengefäße – Muskularisierungsgrad.....	64
3.3.6.1	Immunhistochemische Doppelfärbung.....	64
3.3.6.2	Prozentualer Anteil voll, partiell und nicht muskularisierter Gefäße	65
4.	DISKUSSION	68
4.1	Pharmakologische Untersuchungen zum Einfluss des TRPC6-Aktivators DAG auf die akute Phase der HPV am Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge.....	68
4.1.1	R59949.....	68
4.1.2	OAG	70
4.1.3	U73122 und U73343.....	72
4.1.4	Konzept der Signaltransduktion der akuten HPV	75
4.2	Pharmakologische Untersuchungen zum Einfluss des TRPC6-Aktivators DAG auf die protrahierte Phase der HPV am Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge	76
4.2.1	R59949.....	77
4.3	HO-2 und spannungsabhängiger Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanal (B_K) als möglicher O_2 -Sensorkomplex	79
4.3.1	Akute und protrahierte Phase der HPV.....	80
4.3.2	Rolle von B_K -Kanal und HO-2 in chronischer Hypoxie	82
5.	ZUSAMMENFASSUNG	84

6. SUMMARY	86
7. LITERATURVERZEICHNIS	88
VERÖFFENTLICHUNGEN DES AUTORS	106
CURRICULUM VITAE	108
DANKSAGUNG	110
ERKLÄRUNG	111

Abkürzungen

μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
A.	lat. arteria (Arterie)
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ARDS	adult respiratory distress syndrome = akutes Atemnotsyndrom des Erwachsenen
ATP	Adenosintriphosphat
B_K	Kaliumkanal, auch Maxi-K oder slo abgekürzt, spannungsabhängiger Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanal (B_K)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
$[\text{Ca}]_\text{i}$	intrazelluläre Calciumkonzentration
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CML	chronisch myeloische Leukämie
CVP	central venous pressure (zentraler Venendruck)
D	lat. dies (Tag)
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EET	Epoxyeicosatriensäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET-1	Endothelin-1
ETC	Elektronentransportkette, electron transport chain
Fe^{3+}	Eisenionen (Eisen: lat. ferrum)
g	Gramm
G	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/sec}^2$)

°C	Grad Celsius
GSH/ GSSG	Quotient aus reduziertem Glutathion und oxidiertem Glutathion
h	lat. hora (Stunde)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Helazellen	immortale Zelllinie aus Cervixcarcinomzellen der Patientin Henrietta Lacks, die 1951 verstarb
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HO	Hämoxygenase
HO-2	Hämoxygenase 2, Isoenzym der Hämoxygenasen
I.E.	Internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IHC	Immunhistochemie
IP ₃	Inositoltrisphosphat
K.O.	Knock out
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Kv-Kanal	voltage-dependent (spannungsabhängiger) Kaliumkanal
LA	linkes Atrium
LV	linker Ventrikel
M	molar
<i>M.</i>	lat. musculus (Muskel)
Maxi-K	Kaliumkanal, siehe B _K
mg	Milligramm
mm	Millimeter
ml	Milliliter
MLCK	Myosin light chain kinase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	mittlerer pulmonaler arterieller Druck
MW	Mittelwert
n	lat. numerus (Zahl)

N.	lat. nervus (Nerv)
NaCl	NaCl-Lösung 0,9 %, isotonische Kochsalzlösung
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
O ₂ ⁻	Superoxidradikal
O ₂	Sauerstoff
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
p.	lat. post (nach)
PA	Phosphatidsäure
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck, pulmonary arterial pressure
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzelle, pulmonary artery smooth muscle cell
PBS	Phosphatpufferlösung
PC	Personal Computer
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PDE	Phosphodiesterase
PEEP	positiver-endexpiratorischer Druck, positive end-expiratory pressure
PH	pulmonale Hypertonie
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PLC	Phospholipase C
RA	rechtes Atrium
resp.	respektive
ROC	Rezeptor-gesteuerter Kanal, receptor operated channel
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffverbindungen)
rpm	rounds per minute
RV	rechter Ventrikel
RV/(LV+S)	Ratio aus Masse des rechten Ventrikels zur Masse des linken Ventrikels plus Septum
RVP	right ventricular pressure (rechtsventrikulärer Druck)
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Druck, right ventricular systolic pressure

s.	siehe
s.c.	subkutan
SAP	systemischer arterieller Druck, systemic arterial pressure
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
siRNA	small interfering RNA
sma	smooth muscle actin (glattmuskuläres Aktin)
Slo	Kaliumkanal, siehe B _K
SOCC	Speicher-gesteuerter Calciumkanal, store-operated calcium channel
SOCE	Speicher-gesteuerter Calciumeinstrom, store-operated calcium entry
TRP	transient receptor potential
TRPC6	transient receptor potential channel 6
V.	lat. vena (Vene)
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VOCC	spannungsgesteuerter Calciumkanal, voltage-operated calcium channel
VOCE	spannungsgesteuerter Calciumeinstrom, voltage-operated calcium entry
VP	Beatmungsdruck, ventilation pressure
vs.	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor (Faktor VIII)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der pulmonale Kreislauf

Hauptaufgabe der Lunge ist der Gasaustausch. Sauerstoff wird aus der Umgebung aufgenommen und Kohlendioxid wird in der Lunge aus dem Blut an die Umgebung abgegeben. Damit leistet das Organ einen wesentlichen Beitrag zur Versorgung des Gesamtorganismus mit Sauerstoff – in Ruhe und bei körperlicher Anstrengung.

Um diese zentrale Aufgabe adäquat zu gewährleisten, hat die Natur mit der Lunge ein sowohl einzigartiges als auch hocheffizientes Organ geschaffen.

Der pulmonale Kreislauf, ein Niederdrucksystem mit einem hohen Fluss, gewährleistet den Gasaustausch und verhindert gleichzeitig den Übertritt von Flüssigkeit aus pulmonalen Gefäßen in den interstitiellen Raum. Der große Gesamtquerschnitt des pulmonalen Gefäßbettes führt zu niedrigen pulmonalen Drücken (mPAP ~ 14 mmHg), welche es dem im Kreislaufsystem davor geschalteten rechten Ventrikel wiederum ermöglichen mit geringem Energieverbrauch die Zirkulation des Blutes durch die Lungen mit ihrer besonderen Anatomie aufrecht zu erhalten. Allerdings ist durch die niedrigen Drücke innerhalb des Lungenkreislaufs der rechte Ventrikel dünnwandig angelegt und dadurch für akute aber auch chronische Nachlasterhöhungen, wie sie im Rahmen der pulmonalen Hypertonie vorkommen, nicht vorbereitet. Wird diese nicht optimal behandelt, kommt es bald zum Rechtsherzversagen (cor pulmonale) und damit meist zum Tod des Patienten^{13, 80}.

Die niedrigen Druckverhältnisse im pulmonalen Gefäßgebiet führen auch dazu, dass die Durchblutung des Organs lageabhängige Inhomogenitäten aufweist und die Lungendurchblutung wesentlich stärker als der Hochdruckabschnitt des systemischen Kreislaufs von hydrostatischen Einflüssen abhängt. In Ruhe werden beim erwachsenen Menschen in aufrechter Körperhaltung apikale Gebiete der Lunge, welche etwa 15 cm über dem Ursprung der A. pulmonalis liegen, nur noch zum Zeitpunkt der systolischen Druckspitzen perfundiert, während sie in der Diastole kollabieren, da hier dann der intraalveoläre Druck den Perfusionsdruck überschreitet. Entsprechend dem ansteigenden intravasalen Druck nimmt die Perfusion der Lungen von apikal nach basal zu, so dass die Durchblutung der apikalen Abschnitte nur $\frac{1}{10}$

der basalen Abschnitte beträgt. Diese ungleiche Perfusion erschwert die Hauptaufgabe der Lunge, nämlich die Oxygenierung des venösen Blutes. Es kommt durch die schwerkraftabhängige Verteilung des Blutflusses zu einer ungleichen Anpassung der Ventilation der Lunge an die Perfusion^{13, 73}. Es gibt allerdings einen aktiven intrapulmonalen Kontrollmechanismus, der – bis zu einem gewissen Grade – die Perfusion der jeweiligen alveolären Ventilation anpasst, den Blutfluss also in gut ventilierte, sauerstoffreiche Gebiete leitet – die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV).

Die Verminderung des Gefäßdurchmessers pulmonalarterieller Gefäße bei Hypoxie ist ein wesentlicher Unterschied des Lungenkreislaufs gegenüber dem systemischen Kreislauf, in dem Hypoxie eine Vasodilatation provoziert, wodurch so eine bessere Sauerstoffversorgung des Gewebes in der Peripherie bewerkstelligt werden kann^{80, 144}.

1.2 Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion – HPV

Die Anpassung der Perfusion an die Ventilation der Lunge ist ein wichtiger und effizienter Mechanismus beim Erwachsenen, um eine optimale Oxygenierung des venösen Blutes zu bewerkstelligen. Schon beim Feten spielt die hypoxische Vasokonstriktion innerhalb der Lunge eine bedeutende Rolle. Während der fetalen Entwicklung findet der Gasaustausch noch in der Plazenta statt. In dieser Phase hilft die HPV einen hohen pulmonalen Gefäßdruck aufrecht zu erhalten und so das Blut weg von der Lunge durch den Ductus arteriosus des fetalen Kreislaufs zu leiten. Bei der Geburt und der Belüftung der Lunge sinkt der pulmonale Gefäßwiderstand durch die Abnahme der HPV und die Entfaltung der pulmonalen Gefäße. Damit beginnt der Gasaustausch über die Lungen des Neugeborenen^{14, 60}.

Die HPV wurde erstmals 1946 durch von Euler und Liljestrand auf der Basis von Untersuchungen an Katzen genauer beschrieben¹²¹, nachdem schon 1894 die Briten Bradford und Dean im Tierversuch an Hunden einen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (PAP) unter Asphyxie beobachteten¹².

1947 entdeckte eine Arbeitsgruppe um Motley und den späteren Nobelpreisträger für Physiologie oder Medizin Cournard mittels Rechtsherzkatheter beim Menschen die Erhöhung des PAP unter anoxischen Bedingungen⁷¹. Weiterhin wurde der nach den

Entdeckern benannte Euler-Liljestrand-Mechanismus bei Säugetieren wie Mäusen¹³⁶, Kaninchen¹³⁹, Ratten, Frettchen und Schweinen⁸⁷, bei Reptilien mit Unterschieden im Aufbau von Lunge und Herz¹¹¹, Vögeln²⁸ und sogar bei Fischen⁸² beschrieben.

Bei den für Tiermodelle geeigneten Spezies wie Ratten und Mäusen kann in den meisten Untersuchungen, ähnlich wie beim Menschen, zwischen zwei Phasen der HPV unterschieden werden. Innerhalb der ersten 10 min hypoxischer Beatmung kommt es zu einer akuten Vasokonstriktion und einem Anstieg des PAP. Nach einem Abfall dieses initialen Anstieges kommt es bei anhaltender Hypoxie zu einer zweiten verzögerten oder protrahierten Phase pulmonaler Druckerhöhung^{10, 23, 55}. An Katzen wurde festgestellt, dass die HPV vor allem in Arterien mit einem Gefäßdurchmesser kleiner als 500 µm¹¹⁰, innerhalb weniger Sekunden normobarer Beatmung eines isolierten Organs unterhalb einer Schwelle von 10 % O₂⁴⁶ und unabhängig vom pO₂ des gemischt venösen Rückstromes auftritt¹³⁹. In isolierten pulmonaler glatten Muskelzellen (PASMC) und an endothelfreien pulmonaler Ringen konnte die HPV nachgewiesen werden, wodurch der Mechanismus der akuten Phase der HPV, von der Sauerstoffsensorik bis hin zur Vasokonstriktion, in den PASMC lokalisiert werden konnte^{62, 152}. Die zweite, protrahierte Phase der HPV war dagegen bei untersuchten pulmonaler Ringen von Ratten endothelabhängig^{47, 55, 95}. Gerade die protrahierte Phase der HPV ist jedoch wenig untersucht, obwohl bei Erkrankungen, die zur chronischer Hypoxie und der damit verbundenen pulmonaler Hypertonie führen, diese verzögerte Phase als Übergang in den chronisch erhöhten und vor allem fixierten Gefäßwiderstand angenommen wird. Aus therapeutischer Sicht scheint deshalb die protrahierte Phase der HPV besonders interessant zu sein¹⁴⁰.

Obwohl die HPV in den rund 60 Jahren intensiver Forschung relativ gut charakterisiert worden ist, sind bis heute der genaue molekulare Mechanismus der Sauerstoffsensorik und die Übersetzung dieser in Signale auf zellulärer Ebene noch nicht vollständig verstanden. Die Aufklärung der Sauerstoffsensorik und der Signalkaskade, die letztlich zur HPV führt, stellt hinsichtlich der Behandlung pulmonaler Erkrankungen eine Herausforderung dar, deren Gelingen zur Verbesserung bestehender und zur Etablierung neuer Therapiestrategien beitragen könnte.

1.3 Klinische Bedeutung der HPV

Unter physiologischen Bedingungen stellt die HPV einen wichtigen Mechanismus dar, der eine Anpassung der pulmonalen Durchblutung an die Ventilation gewährleistet. Im klinischen Alltag ermöglicht die HPV bei kardio- und thoraxchirurgischen Eingriffen sogar den Extremfall der Ein-Lungen-Beatmung^{68, 74}. Unter pathophysiologischen Gegebenheiten kann es allerdings zur Störung des Euler-Liljestrand-Mechanismus kommen, die für den Patienten durchaus eine vitale Bedrohung darstellen kann. Einerseits kann es durch globale pulmonale Hypoxie, wie sie in großer Höhe oder bei chronischen Lungenerkrankungen, wie z.B. der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, zu einer in der gesamten Lunge stattfindenden HPV kommen. Hieraus resultieren ein PAP-Anstieg und ein pulmonalarterieller, nur teilweise reversibles „Gefäß-remodelling“ in Form einer Hypertrophie und Hyperplasie der Media der pulmonalarteriellen Gefäße²⁵. Da der rechte Ventrikel des Herzens eine dauerhafte, fixierte Hypertonie im pulmonalarteriellen Kreislaufabschnitt nicht kompensieren kann, kommt es zu einem chronischen Rechtsherzversagen (cor pulmonale chronicum)^{64, 155}.

Andererseits kann es zur Störung der HPV kommen. Fällt die HPV aus, kommt es zu einer Fehlanpassung der Perfusion an die Ventilation. Es entsteht ein pulmonaler Shuntfluss, gemischt-venöses Blut fließt durch nicht ventilierte Lungenabschnitte und kann deshalb nicht ausreichend oxygeniert werden. Vor allem bei Pneumoniepatienten kann es im entzündeten Lungenareal zum Shuntfluss kommen. Drastischer kann ein Ausfall des Euler-Liljestrand-Mechanismus bei Sepsispatienten verlaufen. Die shuntflussbedingte arterielle Hypoxämie ist für betroffenen Patienten in jedem Fall lebensbedrohlich^{105, 106, 119}.

Auch in der Pathophysiologie des ARDS (adult respiratory distress syndrome) spielen Störungen der pulmonalen Vasomotion die Hauptrolle für Gasaustauschstörungen. Surfactantmangel im Zuge eines alveolären Ödems führt zu Atelektasenbildung. Shuntfluss durch ödematöse/atelektatische Areale ist hier die wesentliche Ursache schwerer Gasaustauschstörungen^{37, 48, 104}.

Bei Patienten mit Leberzirrhose kommt es in ca. 15-20 % der Fälle zu einer zentralen arteriellen Hypoxämie. Die genauen Pathomechanismen, die zu pulmonaler Vasodilatation und einem Perfusion-Ventilation-Ungleichgewicht führen sind beim

sogenannten hepato-pulmonalen Syndrom nicht genau bekannt. Sowohl eine Überproduktion von NO als auch eine Störung der HPV werden diskutiert^{7, 32}.

Aufgrund der zentralen physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung der HPV für den Lungenkreislauf birgt die HPV auch therapeutisch ein nicht zu unterschätzendes Potential für die Behandlung pulmonaler Erkrankungen. So könnte die Signalkaskade und eventuell auch der Sauerstoffsensor der HPV selbst direkt medikamentös beeinflusst werden.

Zum einen könnte die generalisiert auftretende HPV, wie sie bei chronischen Lungenerkrankungen durch im gesamten Alveolarraum auftretende Hypoxie hervorgerufen wird und letztlich zur pulmonalen Hypertonie (PH) führt, therapeutisch gezielt inhibiert werden. Die derzeit bestehenden Behandlungskonzepte der PH, welche sowohl auf der Beeinflussung der Modulatoren der pulmonalen Hämodynamik durch Prostaglandinderivate, PDE-5-Inhibitoren und Endothelinrezeptorantagonisten als auch auf der O₂-Langzeittherapie basieren und therapeutisch häufig unbefriedigend sind, könnten entscheidend verbessert werden^{33, 34}.

Zum anderen könnte bei einem insuffizient arbeitenden Euler-Liljestrand-Mechanismus, wie er bei ARDS etc. vorkommt, dieser medikamentös aktiviert werden. Ein besseres Perfusion-Ventilation-Verhältnis wäre die Folge. Weniger Shuntfluss durch nicht belüftete Lungenareale könnte so eine arterielle Hypoxämie vermeiden.

1.4 Sauerstoffsensorik und Signaltransduktion der HPV

Die akute Phase der HPV konnte neben den schon beschriebenen Versuchen am Tier und an isolierten Lungen auch an isolierten Pulmonalarterien^{49, 61}, endothelfreien Pulmonalarterienringen^{47, 152} und isolierten pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC)⁶² nachgewiesen werden, so dass der eigentliche Mechanismus der akuten HPV von der Sauerstoffsensorik bis hin zur Vasokonstriktion in PASMC lokalisiert werden konnte. PASMC stellen somit die Sensor- als auch die Effektorzellen der akuten HPV dar^{15, 16, 113, 138}.

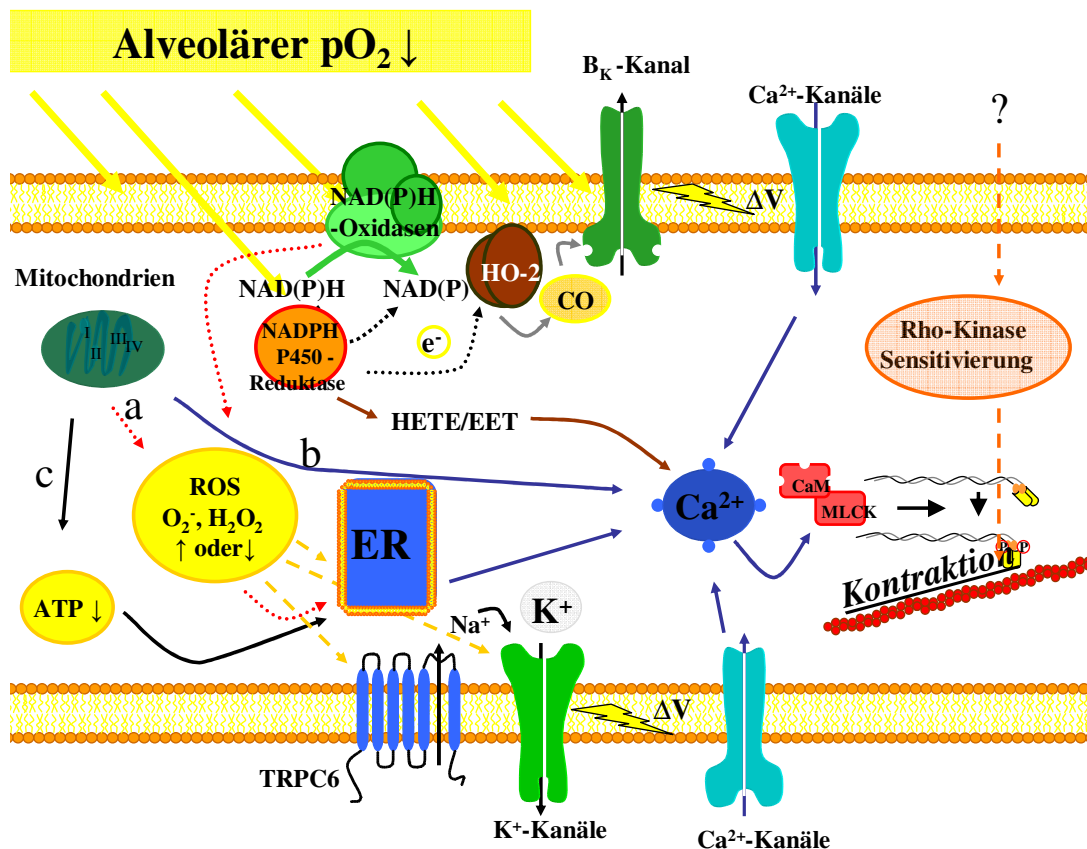


Abb. 1.1: Ein aktuelles Konzept der O₂-Sensorik und Signaltransduktion der akuten HPV. Mögliche O₂-Sensoren: Mitochondrien, NAD(P)H-Oxidase, HO-2 (Hämoxygenase 2). Mediatoren der Signaltransduktion sind in gelb dargestellt. Details sind dem unteren Text zu entnehmen. ATP = Adenosintriphosphat, CaM: Calmodulin, CO: Kohlenstoffmonoxid, e⁻: Elektronen, EET: Epoxyeicosatriensäure, ER: Endoplasmatisches Retikulum, HETE: Hydroxyeicosatetraensäure, MLCK: myosin light chain kinase, TRPC6: transient receptor potential channel 6, ΔV: Membranpotential. a, b und c geben mögliche Funktionen der Mitochondrien an.

Es ist allgemein anerkannt, dass ein zytosolischer Anstieg der Calciumkonzentration zur Konstriktion der PASMOC führt^{101, 122}. Allerdings ist die Herkunft des Calciums noch unklar. Einerseits wird ein Einstrom des Calciums aus dem extrazellulären Raum über spannungsabhängige L-Typ Calcium-Kanäle (VOCE) oder über „store-operated calcium channels“ (SOCE)^{15, 55, 67, 137} andererseits ein Einstrom aus intrazellulären Calciumspeichern, wie das sarkoplasmatische Retikulum oder Mitochondrien, postuliert^{22, 44, 97}. In neueren Veröffentlichungen wird eine Beteiligung von SOCE und VOCE in Erwägung gezogen^{127, 129}. Beispielsweise wird diskutiert, dass der zytosolische Calciumanstieg möglicherweise durch einen VOCE zustande kommt, welcher selbst durch eine SOCE-getriggerte Depolarisation ausgelöst wird¹³². Weitere Überlegungen werden hinsichtlich beider Phasen der

HPV gemacht. So wird ein SOCE in neueren Untersuchungen eher für die protrahierte Phase der HPV verantwortlich gemacht ²⁴. Aber auch eine endothelabhängige Sensitivierung der PASMC gegenüber Calcium über den Rho-Kinase-Signalweg scheint während der protrahierten Phase der HPV möglich, da hier nur ein geringer $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg beobachtet wurde ^{2, 79, 96, 135}.

Außer der Tatsache, dass Calciumkanäle, seien es spannungsabhängige L-Typ Kanäle oder sogenannte „store-operated calcium channels“ (SOCC), eine wichtige Rolle bei der HPV spielen, wurde nachgewiesen, dass Hypoxie zu einer Inhibition von Kaliumkanälen führt, die Zellmembran dadurch depolarisiert wird und schließlich L-Typ Calciumkanäle geöffnet werden ^{89, 151}. Es wurden bisher mindestens vier Klassen von Kaliumkanälen, wie spannungsabhängige (K_v), calciumabhängige (K_{Ca}), ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}) und zweiporigen Kaliumkanälen (K_{2P}) identifiziert und deren Bedeutung für die HPV nachgewiesen ^{5, 9, 76, 81, 88, 89, 135, 150}. Dabei scheinen die K_v -Kanäle eine besondere Bedeutung für die HPV zu haben ^{8, 43}.

Neben Calcium- und Kaliumkanälen spielen auch nicht-selektive Ionenkanäle der TRP-Familie zumindest für die akute Phase der HPV eine essenzielle Rolle (siehe Abschnitt 1.5) ¹³⁷.

Als direkte Sauerstoffsensoren werden jedoch weder TRP-, Calcium- noch Kaliumkanäle angesehen. In mesenterialarteriellen und renalen glatten Muskelzellen konnte – anders als in PASMC – keine Abnahme des Kaliumstroms unter Hypoxie gemessen werden, so dass die Abnahme des Kaliumstroms in PASMC durch einen speziellen pulmonalen Sauerstoffsensormechanismus ausgelöst werden muss ^{89, 133, 151}. Auch der transient receptor channel 6 (TRPC6), ein Mitglied der TRP-Familie (siehe Abschnitt 1.5) und essenzieller Ionenkanal der akuten HPV, kann nicht als primärer O_2 -Sensor angenommen werden. Sowohl in PASMC von TRPC6^{+/+}- und TRPC6^{-/-}-Mäusen konnte eine Akkumulation von DAG beobachtet werden, welches für die direkte oder indirekte Steuerung des TRPC6-Kanals während der akuten Phase der HPV in Frage kommt ¹³⁷.

Daher werden die Sauerstoffsensoren als diejenigen vermutet, die an der Steuerung der Kalium- und Calciumkanäle und an der Kontrolle der TRP-Kanäle beteiligt sind. Besonders Mitochondrien als das O_2 verbrauchende Zellorganell und NADPH-Oxidasen werden als mögliche Sauerstoffsensoren für die akute und protrahierte

Phase der HPV intensiv diskutiert^{133, 134, 140, 141, 143}. Über eine Änderung des Redox-Status innerhalb der Zelle, so die Annahme, könnten diese möglichen O₂-Sensoren Ionenkanäle in der Zellmembran, im sarkoplasmatischen Retikulum oder in Mitochondrien beeinflussen. Als potenzielle Vermittler zwischen Sensoren und den Ionenkanälen wird einerseits ein direkter Anstieg oder Abfall der Konzentration reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) betrachtet, andererseits steht eine sekundäre Änderung der Redoxpaare NAD(P)H/NAD(P)⁺ und GSH/GSSG zur Diskussion^{130, 131, 138}.

Auch Cytochrom P450 Enzyme, die Sauerstoff und NADPH als Substrate benötigen, werden als mögliche Sauerstoffsensoren diskutiert. Hydroxyeicosatetraensäure (HETE) und Epoxyeicosatriensäure (EET), Metabolite, die aus Arachnoidonsäure durch Cytochrom P450 Enzyme entstehen, werden als Verbindung zwischen Redox-Status und Gefäßtonus diskutiert^{45, 140, 153, 157}.

Ein weiteres Konzept der Sauerstoffsensorik verbindet Cytochrom P450 Enzyme mit einem weiteren Hämprotein, der Hämoxigenase 2 (HO-2). Das in Verbindung mit Cytochrom P450 durch die Hämoxigenase freigesetzte Kohlenmonoxid (CO) aktiviert, so die Annahme, einen spannungs- und calciumabhängigen Kaliumkanal, spannungsabhängiger Ca²⁺-aktivierter Kaliumkanal (B_K), unter Normoxie. Bei hypoxischen Bedingungen wird in Glomuszellen eine Inaktivierung dieses Kanals beschrieben, der zur Depolarisation der Zellmembran und zum Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels führt (siehe Abb. 1.2)^{3, 50, 145}.

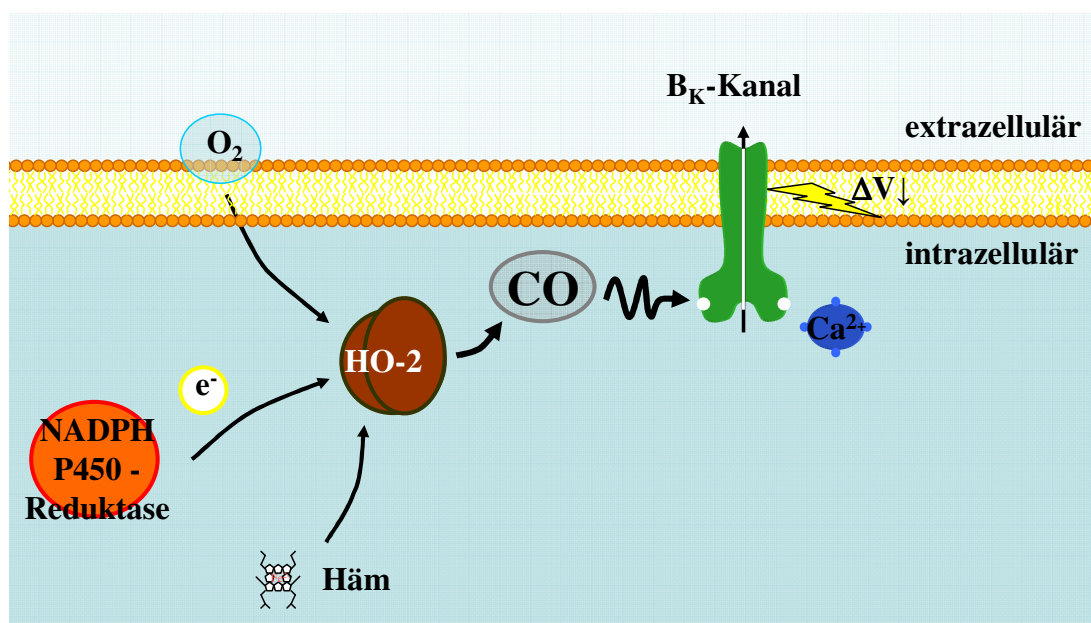


Abb. 1.2: Modell der O₂-Sensorik in Glomuszellen. Bei Hypoxie wird die B_K-Kanal-Aktivität blockiert, der Kaliumkanal schließt, was zu einer Depolarisation in Zellen des

Glomus caroticum führt. Die O₂-Sensorik hängt von dem Zusammenspiel des B_K-Kanals mit der Hämoxxygenase 2 (HO-2) ab. In Gegenwart von O₂ verbraucht HO-2 Elektronen (e⁻), welche von NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase produziert werden, und intrazelluläres Häm, um Kohlenstoffmonoxid (CO) zu generieren, welches den B_K-Kanal offen hält. Hypoxie unterbricht die CO Produktion und inhibiert dadurch den B_K-Kanal. 2 Ca²⁺ Bindungsstellen des B_K-Kanals sind gezeigt. Der hellblaue Hintergrund steht für eine hohe intrazelluläre K⁺-Konzentration (140 mM) resp. für eine geringe extrazelluläre K⁺-Konzentration (4 mM). ΔV (Membranpotential) symbolisiert die durch den B_K-Kanal hervorgerufene Änderung des Membranpotentials (Depolarisation).

Für chronische Hypoxie wird eine Modulation von Transkriptionsfaktoren über Proteinphosphorylierung angenommen. HIF-1α, eine der beiden Untereinheiten des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Hypoxie induzierbarer Faktor-1), die unter Normoxie beinahe vollständig fehlt, wird unter chronischer Hypoxie induziert¹⁰⁸. So konnte an heterozygoten HIF-1^{+/-} Mäusen gezeigt werden, dass nach dreiwöchiger Hypoxie pulmonalarteriell Gefäß-remodelling eingeschränkt war¹⁴⁷. Eine Vielzahl von Genen wird durch HIF-1 reguliert. Darunter sind beispielsweise vascular endothelial growth factor (VEGF) und Endothelin-1 (ET-1), dessen Bedeutung für die Entwicklung einer durch chronische Hypoxie induzierte pulmonale Hypertonie im Tiermodell gezeigt werden konnte⁴. Ob die unter chronischer Hypoxie abnehmende Kaliumkanaldichte auch durch HIF-1 vermittelt ist, scheint bisher allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Andere Transkriptionsfaktoren, wie die der c-jun-Familie, werden hier diskutiert^{98, 126, 149}.

Mögliche Bedeutung für akute Sauerstoffsensorik durch Proteinhydroxylierung, wie sie bei HIF-1 und chronischer Hypoxie vorkommt, konnte zumindest in Glomuszellen nicht beobachtet werden^{59, 83}.

Unterschiedliche Ansätze, Konzepte möglicher Sauerstoffsensoren und Signaltransduktoren und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse in einer Reihe von Untersuchungen erschweren das Verständnis des für jede einzelne Zelle eines Organismus wichtigen Prozesses der Sauerstoffsensorik. Ein Grund für diese Vielfalt möglicher Mechanismen, die zur Sauerstoffsensorik beitragen, dürfte sein, dass Zellen sich bei diesem für das Überleben fundamentalen Mechanismus der Sauerstoffsensorik nicht auf einen einzelnen verlassen, sondern komplexe, schwierig zu untersuchende Interaktionen zwischen einzelnen Sensoren und Effektoren vorzufinden sind⁵¹.

1.5 Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) als Schlüsselstelle der akuten HPV

TRPC6 ist ein Mitglied der TRP-Familie, die eine Gruppe von nicht-selektiven Kationenkanälen repräsentiert, die sowohl in ihrer Struktur als auch aus evolutionsbiologischer Sicht in enger Beziehung stehen. TRP-Kanäle werden in beinahe allen Zelltypen von wirbellosen Tieren und Vertebraten exprimiert. Neben der Vielfalt der Aktivierungsmechanismen der insgesamt 7 Subfamilien, ist hervorzuheben, dass TRP-Kanäle eine besondere Bedeutung für die Sinnesphysiologie haben. Sie leisten für die Sensorik des Geschmacks, Geruchs, des Hörens, Sehens, Wärmeempfindens und für die Mechanosensibilität einen entscheidenden Beitrag. Zusätzlich zu dieser Vielfalt wird einzelnen Zellen über TRP-Kanäle ermöglicht, Änderungen ihrer Umgebung, wie beispielsweise Änderungen der Osmolarität, wahrzunehmen^{19, 30, 69, 85, 123}.

Bisher ist für 4 verschiedene Erkrankungen eine Mutation oder eine Störung der TRP-Aktivität bekannt. Sowohl neurogenerative Erkrankungen, wie die seltene Mukopolysaccharidose Typ IV, als auch Nierenkrankungen, wie die autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung oder die fokale, segmentale Glomerulosklerose und Störungen des Elektrolythaushaltes bei Hypomagnesiämie und Hypocalciämie durch Mutation eines TRP-Kanals indizieren, dass wahrscheinlich noch viele andere Erkrankungen durch Funktionseinschränkungen verschiedener TRP-Kanäle zustande kommen^{52, 72, 77, 78, 115, 125, 146}.

Im kardiopulmonalen System spielen bei Erkrankungen, wie beispielsweise kardialer Hypertrophie, pulmonaler Hypertension und Arteriosklerose nicht nur spannungsabhängige Ionenkanäle für den pathophysiologisch wichtigen Kationeninflux eine Rolle, sondern auch nicht-selektive Ionenkanäle können die Zellproliferation und den Gefäßtonus durch Calcium- und Natriuminflux wesentlich beeinflussen. Gerade TRPC-Kanäle, die mit den TRP-Kanälen der Fruchtfliege *Drosophila*, den Gründungsmitgliedern der TRP-Superfamilie, die höchste Sequenzhomologie haben, scheinen in kardialen Myozyten und Glattmuskelzellen des systemischen und pulmonalen Kreislaufs eine wichtige Rolle für Proliferation und Vasokonstriktion zu spielen^{11, 18, 19, 21, 29, 54, 58, 70, 75}.

Bei Patienten mit hypoxie-induzierter oder idiopathisch-chronischer pulmonaler Hypertonie konnte eine Hochregulation von TRPC6 auf mRNA- und Proteinebene beobachtet werden^{56, 148}.

Daher wurde die Rolle von TRPC6 bei akuter und chronischer Hypoxie im Tiermodell näher untersucht. Die Untersuchung TRPC6-defizienter Mäuse ergab jedoch, dass nach dreiwöchiger chronischer Hypoxieexposition kein signifikanter Unterschied im kardialen und pulmonalvaskulären Remodelling im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vorhanden war. Allerdings stellte sich bei der physiologischen Untersuchung der akuten und protrahierten Phase der HPV heraus, dass die akute Phase bei TRPC6-defizienten Mäusen vollkommen fehlte, während hingegen die protrahierte, dreistündige hypoxieinduzierte Vasokonstriktionsphase nicht von den Wildtypkontrollen zu unterscheiden war. Auch ein Calciumanstieg in TRPC6-defizienten PASMC konnte bei akuter Hypoxieexposition im Gegensatz zu den Wildtypkontrollen nicht gemessen werden¹³⁷.

Dies zeigt, dass TRPC6 in Mäusen für die akute HPV essenziell ist und für die protrahierte Phase respektive die hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie zumindest bei Mäusen keine Rolle spielt. Somit könnten die Mechanismen der Signaltransduktion der akuten Phase der HPV von denen unterschieden werden, die unter chronischer Hypoxie zu pathophysiologischen Prozessen wie Gefäßremodelling und pulmonaler Vasokonstriktion im Rahmen einer PH führen^{19, 137}.

Wie dargestellt, spielt für die chronische hypoxie-induzierte pulmonale Hypertension und das vaskuläre Remodelling TRPC6 in Mäusen keine Rolle. Es wird allerdings in Erwägung gezogen, dass andere TRPC-Kanäle in diese Prozesse eingebunden sind. In Ratten und Mäusen konnte eine HIF-1 (Hypoxie induzierbarer Faktor-1) abhängige Hochregulation von TRPC1 und TRPC6 beobachtet werden. Gerade TRPC1 scheint für die Proliferation von PASMC in Zellkultur wichtig zu sein^{1, 116, 128}.

Für die Aufklärung der Signalkaskade der akuten HPV ist die Erkenntnis, dass der TRPC6-Kanal essenzieller Bestandteil des Signaltransduktionsweges der akuten HPV ist, von immenser Bedeutung. Potenzielle Aktivatoren des TRPC6-Kanals sind aufgrund dessen besonderer Rolle für die akute HPV gleichfalls mögliche Kandidaten, die als Mediatoren der Signalkaskade der akuten HPV in Frage kommen.

Bis heute konnte gezeigt werden, dass das Phospholipase C (PLC) Produkt Diacylglycerol (DAG) zu einer erhöhten Aktivität von TRPC6 und TRPC3 führt.^{20, 39}. Außerdem ließ sich eine Aktivierung des TRPC6-Kanals durch DAG-Akkumulation und folglich ein Calciumanstieg, wie er unter Hypoxie zu erwarten ist, durch Gabe eines DAG-Kinase-Inhibitors in isolierten PASMOC simulieren¹³⁷. Auch wenn eine direkte Interaktion von DAG zu dem TRPC6-Kanal bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte, scheint es möglich, dass die Aktivierung der DAG-Produktion durch PLC oder die Inhibition der DAG-Kinase, die die DAG-Konzentration durch Phosphorylierung limitiert, wie auch der TRPC6-Kanal eine Schlüsselposition als „upstream“-Mechanismen in der Signalkaskade der akuten HPV einnehmen.

1.6 Hämoxygenase 2 (HO-2) und spannungsabhängiger Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanal (B_K) als möglicher O_2 -Sensorkomplex

Der spannungsabhängige Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanal (B_K), auch Slo oder Maxi-K genannt, ist ein Kaliumkanal mit einer besonders hohen Leitfähigkeit, der spannungs- und calciumabhängig aktiviert werden kann⁹⁹. An zellfreien Glomuszellmembranen konnte gezeigt werden, dass Hypoxie diesen Kanal inaktiviert⁹⁴. Diese Tatsache, dass trotz fehlenden zellulären Komponenten eine Inhibition des B_K -Kanals durch Hypoxie möglich war, ließ darauf schließen, dass der eigentliche O_2 -Sensor in der Nähe des Kaliumkanals lokalisiert sein musste. Hämoxygenase-2 (HO-2), eine der 3 Isoformen der Hämoxygenase, konnte als zu B_K -Kanälen benachbartes, membrangebundenes Enzym identifiziert werden^{63, 65}. Unter NADPH- und O_2 -Verbrauch katalysiert HO-2 den Abbau von Häm in CO, Fe^{3+} und Biliverdin, was jedoch sofort in Bilirubin durch eine Bilirubinreduktase umgewandelt wird. Die Vermutung, dass Hämoxygenase als O_2 -Sensor dienen könnte, basiert auf der Annahme, dass HO-2 Häm in dessen Abbauprodukte aufspaltet und möglicherweise eines dieser Produkte den in der Nähe gelegenen B_K -Kanal offen hält⁴¹. Für das Abbauprodukt CO konnte ein Einfluss auf Glomuszellaktivität nachgewiesen werden⁹⁰. Daher wird eine direkte Wirkung des CO auf die B_K -Kanal-Aktivität postuliert. Ein geringerer pO_2 führt zu weniger CO

als Abbauprodukt der Hämoxxygenase, folglich zu verminderter B_K -Kanalaktivität und somit zur Membrandepolarisation in Glomuszellen, so die Annahme (siehe Abb. 1.2). Experimentell konnte durch die Zugabe von HO-2 Substraten, NADPH und Häm, oder durch Zugabe eines CO-Donors eine erhöhte B_K -Kanal-Aktivität gemessen werden. Selektives Ausschalten der HO-2 durch siRNA verminderte dagegen die B_K -Kanal-Aktivität^{50, 145}.

Eine andere Variante des HO-2/ B_K -Kanal Modells wurde ebenso beschrieben. Eine direkte Bindung von Häm an B_K -Kanäle wurde im Gehirn von Ratten nachgewiesen. Bei geringerem Abbau von Häm unter Hypoxie könnte eine erhöhte Hämkonzentration also direkt die Ursache für eine B_K -Kanal-Inhibition sein^{50, 117}.

Um diese interessanten Möglichkeiten der Assoziation von Redoxstatus (NADPH), Häm als für die Sauerstoffbindung wichtiges Molekül, CO als möglicher Botenstoff und Kaliumkanälen, die für die Membrandepolarisation verantwortlich sind, zu verfolgen, wurde die Sauerstoffsensorik bei HO-2 defiziente Tiere untersucht. In Glomuszellen von HO-2-defizienten Tieren konnte keine eingeschränkte O_2 -Sensitivität gefunden werden⁸⁴. Dagegen wird für die akute HPV in HO-2-defizienten Tieren ein Ventilation-Perfusion-Ungleichgewicht beschrieben. Der Einfluss von HO-2 auf chronische Hypoxie wurde jedoch noch nicht überprüft³. Die Bedeutung des B_K -Kanals auf neurologische Fehlfunktionen wurde an $B_K^{-/-}$ Tieren untersucht¹⁰². B_K -defiziente Tiere sind allerdings noch nicht auf eingeschränkte Sauerstoffsensorik in Glomuszellen und im pulmonalen Kreislauf hin getestet worden.

HO-2 und der B_K -Kanal sind möglicherweise für Sauerstoffsensorik im pulmonalen Kreislauf mitverantwortlich. Ob eine direkte oder indirekte Verbindung über einen Botenstoff wie beispielsweise CO zwischen HO-2 und B_K -Kanal existiert oder ob nur die HO-2 respektive der B_K -Kanal an der Sauerstoffsensorik teilnimmt, ist bis dato für den pulmonalen Kreislauf noch nicht gesichert^{41, 50, 51, 140}.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob eine pharmakologische Modulation des Diacylglycerol (DAG) - Stoffwechsels sowohl die akute Phase als auch die protrahierte Phase der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion im intakten isolierten, ventilierten und perfundierten Organ spezifisch beeinflussen kann.

In einem zweiten Teil der Dissertation sollte die Hypothese untersucht werden, ob der Komplex aus Hämoxygenase 2 (HO-2) und spannungsabhängigem Ca^{2+} -aktiviertem Kaliumkanal (B_K) als möglicher Sauerstoffsensor der vaskulären Effekte der alveolären Hypoxie fungieren kann.

2. Material und Methoden

2.1 Mäuse

Mäuse vom Typ C57/BL6 wurden von Charles River Laboratories, Sulzfeld geliefert.

HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäuse zur Untersuchung der Rolle des Enzyms HO-2 wurden im zentralen Tierlabor der Universitätsklinik Gießen gezüchtet und gehalten. Das heterozygote Zuchtpaar stammte von J. López-Barneo, Sevilla, Spanien⁸⁴.

B_K^{-/-} und B_K^{+/+} Mäuse wurden von PD Dr. M. Sausbier, Tübingen, Deutschland, zur Verfügung gestellt und im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen gehalten¹⁰².

Die für die pharmakologischen Versuche verwendeten Tiere waren alle männlichen Geschlechts, zwischen 2 und 3 Monate alt und wogen zwischen 20 g und 26 g.

Für die Versuche zur Rolle des B_K-Kanals und der HO-2 wurden Tiere beider Geschlechter verwendet. Das Alter lag zwischen 2 und 3 Monaten, das Gewicht zwischen 20 g und 32 g.

Alle Tiere bekamen Wasser und Standardfuttermittel Altromin® ad libidum. Die Beleuchtungsdauer im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin betrug ca. 12 Stunden pro Tag. Die Pflege der Tiere und die Durchführung der Tierversuche erfolgten nach den „Principles of laboratory animal care“ (NIH publication No. 86-23, revised 1985) und nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen.

Die transgenen Tiere der HO-2 und B_K-Reihe wurden mit den im folgenden Teil beschriebenen Methoden untersucht:

2.5 Isolierte, perfundierte und ventilierte Mauslunge

2.6 Invasive Bestimmung des rechtsventrikulären systolischen Blutdrucks

2.7 Bestimmung des Verhältnisses der Masse des rechten Ventrikels zur Masse des linken Ventrikels plus Septum (RV/(LV+S)) als Maß der Rechtsherzhypertrophie

2.8 Histologische und immunhistochemische Methoden

Die pharmakologischen Experimente wurden mit der Methode der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslungen, beschrieben im Abschnitt 2.5, untersucht.

Die Anzahl der durchgeführten Experimente und der dazugehörigen Kontrollen sind im Ergebnisteil dieser Arbeit angegeben.

2.2 Geräte und Materialien für die physiologischen Untersuchungen

2.2.1 Geräte

Peristaltische Infusionspumpe ISM 597		Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
Atempumpe Minivent Type 845		Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Wägezelle Isomatric Transducer		Kent Scientific Cooperation, Litchfield, Connecticut, USA
Verstärker Transbridge 4M		World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Transducer Amplifier Module		Hans Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Druckaufnehmer	1-fach Set Mod. II Uni Giessen, Combitrans®	B Braun, Melsungen, Deutschland
Kühlung des Wassers der Wärmekammer	Frigomix®	U-1 B Braun, Melsungen, Deutschland
Temperaturregulator des Wassers der Wärmekammer	Thermomix®	BM Braun, Melsungen, Deutschland
Grafik- und Datenerfassungsprogramm	Labtech Notebook Pro® 1994	Laboratory Technologies Corp., Wilmington, USA
pH- Meter Radiometer ABL 500		Kopenhagen, Dänemark
2 Druckmessgeräte für normoxisches und hypoxisches Beatmungsgas		Aalborg Instruments, Orangeburg, N.Y., USA
Waage, handelsüblich, für Messgrößen im Bereich bis 500 g		
Zentrifuge zur Bestimmung des Hämatokrits	Adams Autocrit™ Centrifuge	Clay Adams, Parsippany, N.J., USA
Sauerstoffkontrollgerät für O ₂ -Kammern		O ₂ -controller, Labotec, Göttingen Deutschland

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

chirurgischer Faden, 5-0 Ethibond*Excel	Inject Luer®	Johnson&Johnson, New Brunswick, N.J., USA
Kanüle 24 G (0,9 mm x 25 mm)	BD Microlance 3®	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Medizinisches Klebeband	Durapore®	St. Paul, MN, USA
Einmalspritzen 1 ml, 2 ml	Inject Luer®	Braun Melsungen, Deutschland

Zellstofftupfer 5 x 4 cm	Purzellin®	Lohmann und Rauscher Rengsdorf, Deutschland
Einmalhandschuhe	Transaflex®	Ansell Surbiton Surrey, UK
Dreiwegehahn	Discofix®	Braun Melsungen, Deutschland
Kanülen in verschiedenen Stärken	BD Microlance™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Pumpenschläuche Innendurchmesser: 0,89 mm bis 2,54 mm	Tygon®	Kalensee, Gießen, Deutschland
Combi-Stopper		Braun, Melsungen
Zellulose-Handtücher		Tork, Mannheim, Deutschland
Perfusor-Leitung 150 cm		Braun, Melsungen, Deutschland
Zellstofftupfer 5x4 cm	Purzellin®	Lohmann und Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Hämatokrit-Kapillaren, 77 mm/60 µl, D.A. 1,3-1,4 mm		Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Silikonspray		Centramed Medizintechnik, Koblenz, Deutschland
Mulltupfer, pflaumengroß		Beese, Barbüttel, Deutschland
Eppendorfgefäße versch. Größen		Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2.3 Präparationsmaterialien

Trachealtubus aus einer Einmalkanüle 1,2x4 mm	BD Microlance™ 3	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Präparationsbesteck: Pinzette gebogen, Pinzette gerade, Mikro- Schere, Schere		Martin Medizintechnik Tuttlingen, Deutschland
Katheter für LV: Eigenanfertigung: ca. 3 cm langes, hohles Metallstück mit ca. 1,2 mm Durchmesser und einer Verdickung am in den LV eingebrachten, gebogenen Ende		
Befestigung und Fixierung der Katheter Miniball with 8 mm Threaded M2 Rod, T50034 und zwei Miniball Joint holder T32045		Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland

2.2.4 Pharmaka, Gase und Chemikalien

Krebs–Henseleit Puffer		Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat 1 M, 8,4 %		Serag-Wiessner, Naila, Deutschland

Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml	Ketavet®	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
Xylazinhydrochlorid 2 %	Rompun®	Bayer Healthcare, Leverkusen, Deutschland
Isotonische NaCl-Lösung 0,9 %		DeltaSelect, Dreieich, Deutschland
Heparin (5000 I.E./ml)	Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm®	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Proteinlöser PAL 50		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad iniectabilia		Baxter S.A., Unterschleißheim, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)		Merck, Darmstadt, Deutschland
U46619, Thromboxananalogon		Paesel und Lorei GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland
R59949, DAG-Kinase-Inhibitor II		Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
OAG, DAG-Analogon		Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
U73122, PLC-Inhibitor, aktive Form		Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
U73343, PLC-Inhibitor, inaktive Form		Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
KCl pro analysi		Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96 %		Fischer, Saarbrücken, Deutschland
Normoxisches Beatmungsgas: 21,0 % O ₂ , 5,3 % CO ₂ , Rest N ₂		Air Liquide, Siegen, Deutschland
Hypoxisches Beatmungsgas: 1,0 % O ₂ , 5,3 % CO ₂ , Rest N ₂		Air Liquide, Siegen, Deutschland

2.3 Geräte und Materialien für die histologischen Untersuchungen

2.3.1 Geräte

Rotationsmikrotom vollautomatisch	RM 2165	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Objektträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland

Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
geschlossener Vakuum- Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1050	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop Durchlicht	DMLA	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Computer	Q550 IW	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Software zur Bestimmung des pulmonalvaskulären Muskularisierungsgrads		Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland

2.3.2 Materialien

Ethanol 17,0 %, 95,0 %, 99,6 % vergällt mit Ethylmethylketon		Fischer, Saarbrücken, Deutschland
Isopropanol 99,8 %		Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Methanol reinst		Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Wasserstoffperoxid 30 % pro analysi		Merck, Darmstadt, Deutschland
Roti-Histol (Xylolersatz)		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser 24x36 mm		R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Universal-Einbettkassetten mit Deckel, verschiedenfarbig		Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Objektträger		R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Mikrotomklingen S 35		Feather, Japan (über: Produkte für die Medizin AG Köln, Deutschland)
Paraffin Einbettmedium		Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eindeckmedium Xylol-löslich		Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Trypsin		Zytomed, Berlin, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit,		Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland

Normal Goat Serum		Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
Vectastain Elite ABC Kits anti-rabbit		Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Vector VIP Substrat Kit		Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
DAB Substrat Kit		Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Methylgrün Counterstain		Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Zamboni's Fixativ: - 0,2 M Na ₂ HPO ₄ : 390 ml; - 0,2 M Na ₂ H ₂ PO ₄ : 110 ml; - 16,0 % Paraformaldehyd: 25 ml; - Saturated Picric Acid: 15 ml - Aqua dest.: 10 ml eingestellt auf pH 7,3 - 7,4,		Zamboni ¹⁵⁴
Antikörper: von-Willebrand-Faktor: Rabbit IgG, Vectastain Verdünnung von 1:900 mit 10,0 % BSA		Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Antikörper: anti-alpha-smooth-muscle-actin: M.O.M. Kit, PK2200, Verdünnung von 1: 900 mit 10,0 % BSA		Vector, Burlingame, UK

2.4 Geräte und Materialien für die Genotypisierung der HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäuse

2.4.1 Geräte

Zentrifuge	Mikro 200	Hettich Zentrifugen, Tuttligen, Deutschland
Rüttler	Thermomix compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
T-personal PCR-Maschine		Biometra, Göttingen, Deutschland
Photometer: Chemi genius – bioimaging system		Syngene, Cambridge, UK
Elektrophoresekammer		Keutz-Laborgeräte, Reiskirchen, Deutschland
Spannungsgerät	Power Pac®	Biorad, München, Deutschland

2.4.2 Materialien

Aufreinigung der DNA: - Proteinase K - Puffer ATL	DNAeasy® blood and tissue kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
---	-------------------------------	--------------------------------

- Puffer AL - Puffer AW 1 - Puffer AW 2 - Puffer AE - Sammelgefäße - DNAeasy [®] Aufreinigungssäulen		
dNTP-Mix Gold (je 10mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)		Peqlab, Erlangen, Deutschland
taq-(H)-Polymerase		Peqlab, Erlangen, Deutschland
Puffer S		Peqlab, Erlangen, Deutschland
Aqua ad iniectabila Baxter S.A.		DeltaSelect, Dreieich, Deutschland
Aqua ad iniectabila		Baxter S.A., Unterschleißheim, Deutschland
TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) 1x (40 mM Tris-Acetat, 5 mM Natriumacetat, 1mM EDTA, pH 7,4 Essigsäure)		
Tris-Acetat (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)		Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumacetat		Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Essigsäure		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, Ultrapure Agarose		Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid 10 mg/ml		Fluka, Buchs, Schweiz,
DNA-ladder, 100 bp		Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
6x Loading Dye		Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
Primer		Metabion international AG, Martinsried, Deutschland

2.5 Isolierte, perfundierte und ventilierte Mauslunge

2.5.1 Einführung

Das Modell der isolierten Lunge wurde bereits 1912 von Knowlton und Starling beschrieben⁵³. Im Laborbereich des Zentrums für Innere Medizin, Medizinische Klinik II/V der Justus-Liebig-Universität Gießen, ist dieses Modell seit 1994 in Form der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge etabliert¹³⁹. 2004 wurde das Modell auf die isolierte, perfundierte und ventilierte Mauslunge übertragen¹³⁶.

Bezüglich verschiedenen Fragestellungen bietet das Modell eines blutfrei perfundierten, isolierten und ventilierten Organs ein von zentralnervösen, humoralen und metabolischen Einflüssen des Gesamtorganismus unabhängiges System.

Das Modell bietet die Möglichkeit komplexe biochemische Interaktionen und physiologische sowie biophysikalische Parameter zu untersuchen. Außerdem lassen sich pathologische Zustände gezielt induzieren und die Wirkungsweisen pharmakologischer Substanzen auf das isolierte Organ sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Zustand testen.

Die seit 2004 erfolgreiche Anwendung des Modells an der Maus ermöglicht neben den oben genannten Vorteilen zusätzlich die Untersuchung von transgenen Mäusen. Dadurch können direkt Einflüsse von bestimmten Ionenkanälen, Enzymen oder anderen Proteinen auf die Physiologie der Lunge in gendefizienten Mäusen untersucht werden.

Neben der kontinuierlichen pulmonalarteriellen und pulmonalvenösen Druckmessung ermöglicht das Modell sowohl die Messung von Beatmungsdruck, Lungengewicht als auch die biochemische beziehungsweise chemische Analyse von Expirationsluft und Perfusatproben.

2.5.2 Versuchsaufbau

Die Lungen wurden in einer beheizten und feuchten Kammer an einer Wägezelle (Kent Scientific Cooperation Isometric Transducer) frei aufgehängt. Die Perfusion erfolgte flusskonstant mittels peristaltischer Infusionspumpe (ISM 597, Ismatec, Wertheim-Mondfeld). Nach Passage der Lunge floss das Perfusat über den linken Ventrikel zurück in das Perfusateservoir. Um eine konstante Temperatur von 37°C

im Organ aufrecht zu halten, wurden das Perfusatreservoir, die Wärmekammer und die Heizspirale mit einer doppelwandigen Glasummantlung ausgestattet, wodurch eine Temperierung des Perfusats und der Kammer möglich war. Luftembolien wurden durch sorgfälliges Entlüften des Schlauchsystems vor Beginn der Präparation ausgeschlossen.

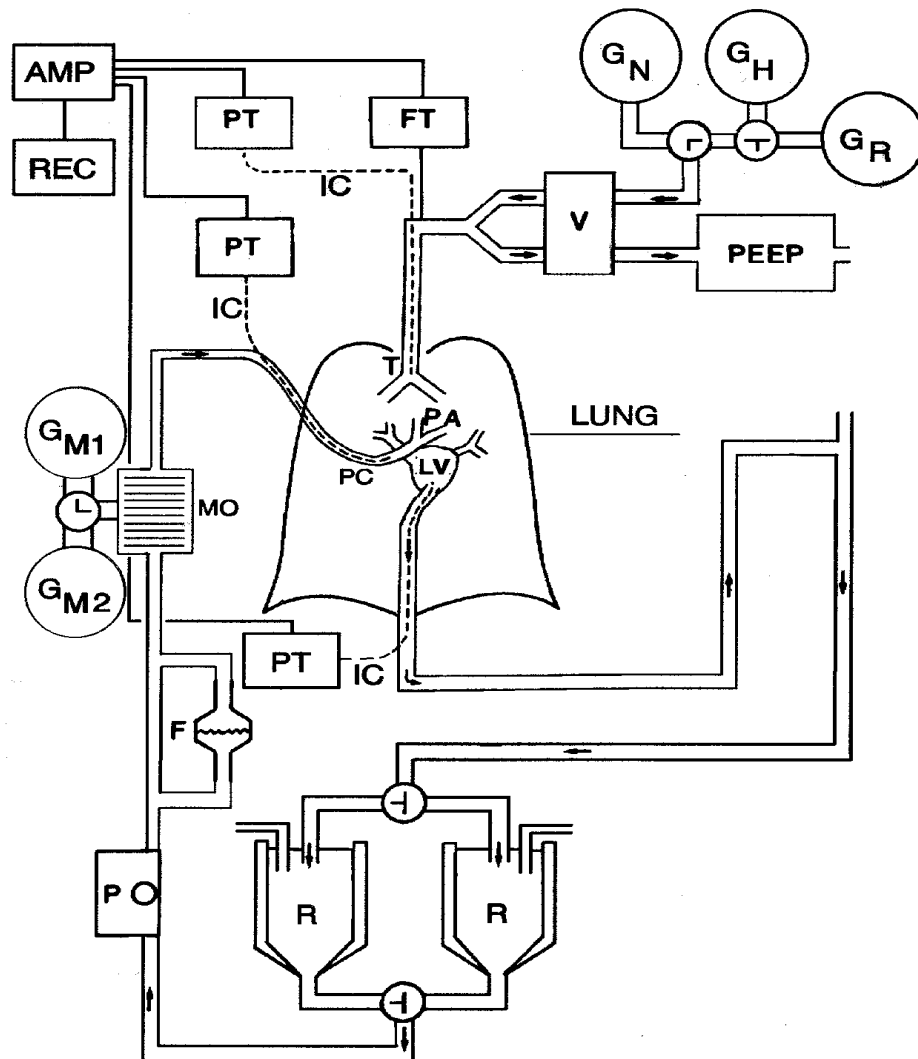


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Aufbaus des Perfusions- und Beatmungssystems. AMP: Messverstärker, DW: elektromechanischer Druckwandler, F: Filter, GN: normoxisches Gasgemisch, GH: hypoxisches Gasgemisch, GR: Raumluft, IK: Innenkatheter, LV: linker Ventrikel, P: Rollerpumpe, PA: Pulmonalarterie, PAK: Pulmonaliskatheter, PEEP: Vorrichtung zur Einstellung eines positiv-endexpiratorischen Drucks, R: Perfusatreservoir, REC: Schreiber und Personalcomputer zur Registrierung der gemessenen Werte, T Trachea, V: Ventilator, VD: Vorrichtung zur Einstellung des linksvenösen Druckniveaus, WZ: Wägezelle.

Die Perfusion erfolgt mit Krebs-Henseleit-Puffer (Serag-Wiesner, Naila) mit folgender Zusammensetzung: NaCl 120 mM

KCl	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,1 mM
NaHCO ₃	24 mM
CaCl ₂	2,4 mM,
MgCl ₂	1,3 mM
Glucose	13,32 mM

und 5 % (Gewicht/Volumen) Hydroxyethylamylopectin (Molekulargewicht 200,000).

Durch Zugabe von NaHCO₃ (2,4 ml/100 ml Perfusat) und anschließender Begasung des Perfusats mit normoxischem Gas wurde ein pH von 7,3 bis 7,4 erreicht. Das Gesamtvolumen des rezirkulierenden Perfusats betrug 15 ml.

Die Ventilationparameter während des Versuches waren wie folgt:

Tidalvolumen	300 µl
Beatmungsfrequenz	90 Atemzüge/min
Positiver-endexpiratorischer Druck (PEEP)	3 cmH ₂ O

Beatmung mit normoxischem Gas (21,0 % O₂, 5,3 % CO₂ Rest N₂, Air Liquide, Siegen) oder hypoxischem Gas (1,0 % O₂, 5,3 % CO₂ Rest N₂, Air Liquide, Siegen).

2.5.3 Reinigung des Systems

Vor Beginn eines Versuches wurde das gesamte System zunächst mit 80 ml destilliertem Wasser (Aqua ad iniectabilia Baxter S.A., Unterschleißheim) und dann mit 20 ml Perfusat gespült.

Nach Abschluss des Versuches wurde das System immer zunächst mit mindestens 50 ml destilliertem Wasser und anschließend mit 0,1 ml des Proteinlösers (PAL 50, Carl Roth, Karlsruhe) verdünnt in 20 ml destilliertem Wasser ausgespült. Bis zur nächsten Verwendung des Systems blieb der Proteinlöser in seiner Verdünnung im Schlauchsystem.

2.5.4 Präparation der Mauslunge

Vor Beginn der Präparation wurden die Mäuse in tiefe Narkose versetzt. 125 mg/kg Ketamin (Ketavet 100 mg/ml, Pfizer, Karlsruhe) und 25 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun 2 %, Bayer Healthcare, Leverkusen) wurden intraperitoneal verabreicht.

Zur Antikoagulation wurden, ebenfalls intraperitoneal, 2500 I.E./kg Heparin (Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm®, Ulm) injiziert.

Daraufhin wurden die Tiere über ein Tracheostoma intubiert und mit Raumluft durch eine Kolbenpumpe (Minivent Type 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) im oben genannten Modus beatmet.

Nach Eröffnen des oberen Abdomens erfolgte eine vollständige mediane Sternotomie. Dem Aufklappen des Thorax schloss sich zunächst die Punktion sowohl des linken als auch des rechten Ventrikels an. Danach wurden Katheter in Pulmonalarterie und linkes Atrium eingebracht, erster durch Ligation fixiert. Im Anschluss wurde mittels einer Peristaltik-Pumpe (ISM 597, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) die Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer (Serag-Wiessner, Naila) bei 4°C und einer Flussrate von 0,2 ml/min begonnen. Gleichzeitig mit dem Beginn der künstlichen Perfusion wurde die Beatmung von Raumluft auf gemischtes normoxisches Gas (21,0 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂, Air Liquide, Siegen) geändert.

Die Lungen wurden ohne Unterbrechung von Ventilation und Perfusion aus dem Thorax herauspräpariert und frei an einer Wägezelle zur Gewichtsmessung des Organs aufgehängt. Zur Anpassung der Temperatur wurde eine auf etwa 37°C beheizte und befeuchtete Glaskammer um die aufgehängte Lunge platziert. Nach Durchspülen der Lungen mit ≥20 ml Puffer wurde der Perfusionskreislauf geschlossen. Mittlerweile wurde die Flussrate von 0,2 ml/min auf 2 ml/min erhöht, das Gesamtvolumen des Puffers bei beginnender Rezirkulation betrug 15ml. Der linksatriale Druck wurde auf 2,0 mmHg erhöht, die Temperatur des rezirkulierenden Perfusats auf 37°C.

Die Drücke in der Pulmonalarterie und dem linken Atrium wurden mit Druckabnehmern über dünnlumige Katheter gemessen, mittels eines Analog-Digitalwandlers digitalisiert und dadurch eine Datenaufnahme durch einen Personalcomputer ermöglicht.

Nach der durchschnittlichen Präparationsdauer von circa 15 min, des Erreichens eines steady-states nach circa 20 min, einer nunmehr erreichten Flussrate von 2 ml/min, und einer erfolgten Kalibrierung der Druckaufnehmer konnte mit der Messung und dem geplanten Versuchsablauf begonnen werden.

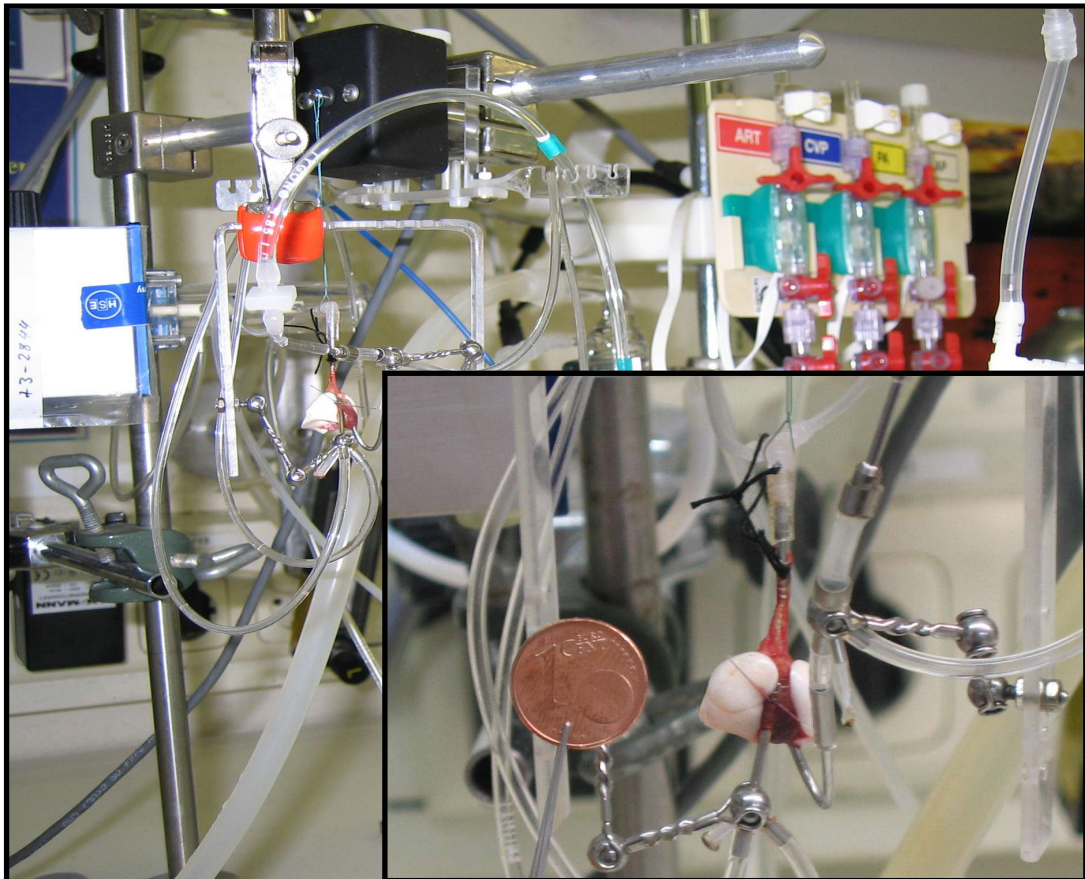


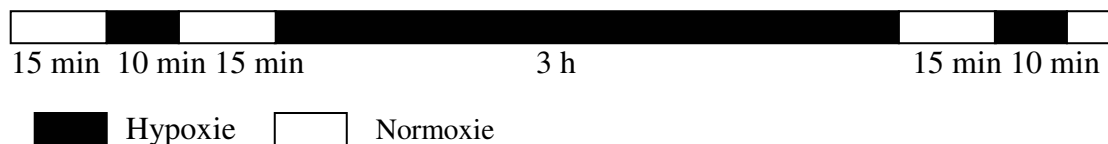
Abb. 2.2: Originale Abbildung des oben beschriebenen Versuchsaufbaus nach abgeschlossener Präparation der Mauslunge und erfolgreicher Kanülierung des rechten und linken Ventrikels (rechts im Bild).

2.5.5 Versuchsmodus

Nach einer ca. 20 min dauernden Aufwärmphase begannen die Versuche mit einer 15 min dauernden Steady-state-Phase, in der die gemessenen Parameter sich nicht verändern durften, so dass die benötigte Stabilität des Präparates gewährleistet wurde.

Die Umstellung von normoxischer auf hypoxische Beatmung erfolgte übergangslos über einen 3-Wege-Hahn, der in die Gaszufuhrleitung zwischen geschaltet war.

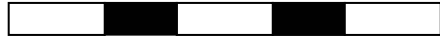
3-Stufen-Hypoxie



Der Versuchsmodus der 3-Stufen-Hypoxie mit einer 3 h dauernden hypoxischen Phase wurde bei Versuchen an den transgenen B_K und HO-2 Mäusen gewählt. Ebenfalls kam dieser Modus bei der Untersuchung der Wirkung von DAG-Kinase-

Inhibitor II (R59949, Calbiochem, Bad Soden) auf die protrahierte Phase der HPV zum Einsatz.

Akute Hypoxie

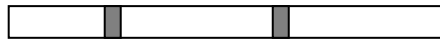


15 min 10 min 15 min 10 min 15 min

Hypoxie Normoxie

10 min andauernde Phasen hypoxischer Beatmung wechselten sich mit 15 min dauernder normoxischer Beatmung ab.

Vasokonstriktion mittels U46619



15 min 25 min 25 min

U46619-Bolus Normoxie

U46619 wurde in einem Verhältnis von 2:1 in DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt) gelöst und über einen Bypass mit einer 1 ml Spritze in die Mäuselunge eingebracht. Die Menge U46619 wurde so gewählt, dass 1,5 nM im Perfusat erreicht wurde. Diese Versuche erfolgten im Falle der transgenen Mäuse im Anschluss an die Versuche für die akute Hypoxie. Bei den pharmakologischen Experimenten an C57/BL6 Mäusen wurden separate Versuche für Hypoxie und U46619 durchgeführt. Nach zwei Kontrollvasokonstriktionen erfolgten daraufhin die Vasokonstriktionen im erläuterten Modus.

Vasokonstriktion mittels KCl



15 min 25 min 25 min

KCl-Bolus Normoxie

Um zu zeigen, dass die getesteten pharmakologischen Substanzen selektiv die HPV und nicht generell die Vasokonstriktion in den pulmonalen Gefäßen inhibieren, wurde neben U46619 ein weiterer vasokonstriktorisches Stimulus, die KCl-Bolusgabe, gewählt. Die Bolusgabe erfolgte analog zu der des U46619 über den Bypass mit einer 1 ml Spritze. Die Menge von 0,75 ml 0,02 M KCl-Lösung als

Bolus, entsprechend einer Konzentration im Perfusatreseptor von 1 μM , führte zu einer Vasokonstriktion, die von der Stärke der HPV zu Beginn der Experimente glich.

Zur Untersuchung der Einflüsse der verwendeten Substanzen auf die akute HPV, die protrahierte, d.h. eine 180 min lange dauernde HPV, und die Vasokonstriktion durch U46619 oder KCl wurden Kontrollversuche mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Substanz durchgeführt.

Um die Einflüsse der pharmakologischen Substanzen auf den normoxischen PAP, den pulmonalarteriellen Druck bei normoxischer Beatmung und konstanter Perfusion mit 2 ml/min zu ermitteln, erfolgte zusätzlich eine Substanzapplikation unter rein normoxischer Beatmung.

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede der akuten und protrahierten HPV wurden in B_K und HO-2 $+/+$ und $-/-$ Mäusen für beide Gruppen sowohl Versuche mit 180 min dauernder hypoxischer Beatmung als auch gleich lange dauernder normoxischer Beatmung durchgeführt.

2.5.6 Verwendete Substanzen und Applikationsmodi

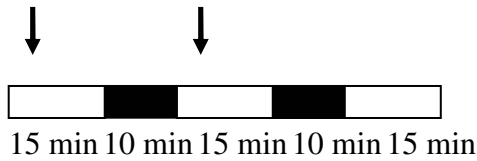
R59949

MW: 489,6

Lösungsmittel: DMSO

Applikation: Aliquots zu 10 μl 100 mM R59949 in DMSO wurden hergestellt. Vor der Applikation wurden diese mit dem Perfusatmedium weiter verdünnt (1:100). Die verdünnte Lösung (1 mM) R59949 wurde in den Versuchsreihen jeweils 10min vor beginnender Vasokonstriktion zu dem Perfusatmedium der Dosisreihe resultierend in einer Konzentration von 5, 10, 15, 20, 25 und 30 μM in das Reservoir gegeben (5 μM entsprechen einer Zugabe von 75 μl der 1 mM R59949 Lösung zu dem Perfusatmedium). Bei der Verwendung der Substanz zur Untersuchung des Einflusses von R59949 auf die protrahierte Phase der HPV wurde 10min vor Beginn der 3 h dauernden Hypoxiephase 150 μl der 1 mM R59949 Lösung zum Perfusat gegeben, entsprechend 10 μM R59949 im zirkulierenden Perfusat.

R59949 Gabe R59949 Gabe



■ Hypoxie □ Normoxie

Pfeile markieren die Gabe der Substanzen, deren Einfluss auf die Vasokonstriktion getestet wurde, jeweils 10 min vor beginnender Vasokonstriktion. In dem hier abgebildeten Beispiel ist der vasokonstriktorische Stimulus Hypoxie (entsprechend für U46619 und KCl, s.o). Getestete Substanz ist R59949. Gleiche Versuchsmodi gelten für OAG, U73122 und U73343.

OAG (1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol)

MW: 398,58 Lösungsmittel: DMSO

Applikation: Aliquots zu 100 µl 50 mM OAG in DMSO wurden hergestellt. Kurz vor der Verwendung der Substanzen in der Dosisreihe von 15, 30, 60, 90, 120 µM wurde die 50 mM Lösung mit Perfusatmedium weit verdünnt (1:5). Aus der 10 mM Lösung wurden für eine 15 µM OAG Konzentration im Perfusatmedium 22,5 µl 10 min vor Beginn der Vasokonstriktion in den Perfusatbehälter gegeben.

U73122

MW: 464,64

Lösungsmittel: Ethanol (Ethanol 96 %, Fischer, Saarbrücken)

Applikation: Aus der mit Ethanol als Lösungsmittel hergestellten 1 mM U73122 Lösung wurden direkt 30 µl Lösung für 2 µM U73122 Konzentration in das zirkulierende Perfusat gegeben. In der durchgeführten Dosisreihe von 2, 3, und 4 µM U73122 war der jeweilige Zeitpunkt der Applikation analog zu OAG und R59949 10 min vor der beginnenden Vasokonstriktion.

U73343

MW: 466,66

Lösungsmittel: Ethanol

Applikation: siehe U73122

2.6 Invasive Bestimmung des rechtsventrikulären Blutdrucks

2.6.1 Einführung

Neben der histologischen Aufarbeitung der untersuchten Lungen, welche direkt ein im Rahmen der PH durch chronische Hypoxie induziertes Gefäß-remodelling nachweisen kann, lässt die invasive Bestimmung von rechtsventrikulären Blutdrücken (RVSP) eine Aussage über den Blutdruck in der Pulmonalarterie treffen. Daher ist die Bestimmung des RVSP ein geeigneter Parameter um das Ausmaß der durch chronische Hypoxie resultierenden PH zu bestimmen.

Ein Teil der für die hämodynamische und histologische Untersuchung verwendeten Tiere wurde für eine Dauer von 3 Wochen unter normobarer Hypoxie (10,0 % O₂) gehalten, der andere Teil für den gleichen Zeitraum in normobarer Normoxie (21,0 % O₂). Durch eine Absenkung der globalen Sauerstoffkonzentration lassen sich für die Lunge hypoxische Zustände simulieren, wie sie bei pulmonalen Erkrankungen wie z.B. COPD, Fibrose, Emphysem oder aber auch in großer Höhe vorkommen.

2.6.2 Präparation und Bestimmung des RVSP

Vor Beginn der Präparation wurde den Mäusen zur Narkose 62,5 mg/kg Ketamin (Ketavet 100 mg/ml, Pfizer, Karlsruhe) und 12,5 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun 2 %, Bayer Healthcare, Leverkusen) sowie zur Antikoagulation 1250 I.E./kg Heparin (Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm®, Ulm) intraperitoneal verabreicht. Nach Spülung der Druckaufnehmer mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Druckwandler zur Messung des RVSP auf 0 mmHg kalibriert.

Der Intubation der Tiere über ein Tracheostoma folgte die Beatmung mit Raumluft durch eine Kolbenpumpe (Minivent Type 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten).

Beatmungsparameter waren folgende:

Tidalvolumen	250 µl
Beatmungsfrequenz	150 Atemzüge/min
positiver endexpiratorischer Druck (PEEP)	1 cmH ₂ O

Nach Entfernung der Haut im Bereich des processus xiphoideus wurde das Abdomen an dieser Stelle vorsichtig inzidiert. Es erfolgte die Platzierung einer Kanüle (24G (0,55 mm x 25mm) BD Microlance™ 3, Becton Dickinson, Heidelberg) in den nun

sichtbaren rechten Ventrikel. Anschließend wurden die RVSP für einen Zeitraum von 10 min aufgezeichnet.

2.6.3 Bestimmung des Hämatokrit

Die Anpassung des Organismus an chronische Hypoxie erfolgt unter anderem durch Erhöhung des Hämatokritwertes im Blut, um durch eine erhöhte Anzahl an Erythrozyten in der Zirkulation die Sauerstoffversorgung der Peripherie zu verbessern. Somit ist die Bestimmung des Hämatokrit eine geeignete Möglichkeit die Optimierung der Sauerstoffversorgung der Peripherie und die Adaptation des Organismus an veränderte Sauerstoffverhältnisse, wie hier chronischer Hypoxie, festzustellen⁴⁰.

Nach Beendigung der Messung des RVSP wurde an der durch die Kanüle eröffneten Stelle des RV über eine Hämatokrit-Kapillare (77 mm/60 µl, D.A. 1,3-1,4 mm, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt) Blut entnommen und anschließend mittels einer Zentrifuge (Adams AutocritTM Centrifuge, Clay Adams, Parsippany, N.J., USA) der Hämatokrit bestimmt.

2.7 Bestimmung des Verhältnisses der Masse des rechten Ventrikels zur Masse des linken Ventrikels plus Septum (RV/(LV+S)) als Maß der Rechtsherzhypertrophie

2.7.1 Einführung

Das Herz versucht sich in erster Linie den herrschenden Druckverhältnissen im pulmonalen und systemischen Kreislauf anzupassen. Ein erhöhter pulmonalarterieller Druck führt zu einer Hypertrophie des rechten Ventrikels (RV), ein Anstieg des systemischen Drucks lässt den linken Ventrikel (LV) samt Septum (S) hypertrophieren.

Neben der Möglichkeit die absoluten Massen der rechten und linken Herzhälften zu vergleichen, lässt sich auch über die Bildung des Verhältnisses Masse des RV/ Masse (LV+S) eine Aussage über das Ausmaß einer rechtsventrikulären Hypertrophie und der damit zusammenhängenden pulmonalarteriellen Hypertonie treffen. Daher ist die

Berechnung dieser sogenannten Herzratio ein etabliertes Maß für die Stärke des pulmonalen Gefäßumbauprozesses¹⁰³.

2.7.2 Präparation der Herzen

Die verwendeten Herzen wurden im Anschluss an die Bestimmung des RVSP (Abschnitt 2.6.2) und Fixation der Lungen (Abschnitt 2.8.2) bearbeitet.

Der rechte Ventrikel wurde mikrochirurgisch von dem linken Ventrikel plus Septum getrennt. Nach erfolgter Trocknung wurden die Masse des rechten Ventrikels und die Masse des linken Ventrikels plus Septums bestimmt.

Sektion und Gewichtsmessung wurden geblindet durchgeführt. Wie beschrieben, wurde das Verhältnis $RV/(LV+S)$ als Index für eine rechtsventrikuläre Hypertrophie gebildet¹⁰³.

2.8 Histologische und immunhistochemische Methoden

2.8.1 Einführung

Die histologische Untersuchung von Lungenpräparaten ist von immenser Bedeutung für Untersuchungen der pulmonalen Strombahn, da hierdurch direkt das bei Hypoxie auftretende Gefäß-remodelling beobachtet werden kann.

Pharmakologische Therapien der pulmonalen Hypertonie lassen sich so, wie auch genetisch Einflüsse auf die Morphologie der Lungenstrombahn durch Untersuchung transgener Tiere, direkt in ihrem Einfluss auf die Gefäßumbauprozesse quantifizieren.

2.8.2 Präparation der Lungen und Anfertigung der Schnittpräparate

Die für die histologischen Untersuchungen verwendeten Lungen wurden im Anschluss an die Bestimmung des RVSP präpariert. Nachdem die in Abschnitt 2.6.2 und 2.6.3 beschriebenen Schritte durchgeführt worden waren, wurde ein Katheter in die bestehende Öffnung im RV eingebracht und durch eine Ligatur fixiert. Dann wurden die Lungen mit 20 ml Kochsalzlösung (Isotonische NaCl-Lösung 0,9 %, DeltaSelect, Dreieich) und anschließend mit Zamboni's-Fixativ durchspült¹⁵⁴. Der Abfluss der Lösungen erfolgte durch einen Schnitt im LV. Nach 5 Minuten dauernder Spülung bei 22 cmH₂O wurde das Lungenpräparat vom Herzen getrennt

und in 0,1 M PBS (Merck, Darmstadt) über Nacht bei 4°C eingelagert. Am darauf folgenden Tag wurde der PBS-Puffer gewechselt. Bis zur weiteren Verwendung verblieben die Lungen in diesem Puffer bei 4°C.

Die Einbettung der Gewebe wurde folgendermaßen durchgeführt. Die in PBS gelagerten Mäuselungen wurden aufgeteilt. Zur weiteren Verwendung kamen der obere Lappen des rechten Lungenflügels und der gesamte linke Lungenflügel. Die Gewebe wurden über Nacht im Routineprogramm des geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten (Modell TB1050, Leica, Nussloch) entwässert; danach wurden sie in Paraffin (Paraffin Einbettmedium, Paraplast Plus[®], Sigma Aldrich, Steinheim) eingegossen.

Zur Anfertigung der Schnittpräparate wurden aus den Paraffinblöcken am Mikrotom (Rotationsmikrotom vollautomatisch, RM 2165, Leica Microsystems, Nussloch) 3 µm dicke Scheiben geschnitten, die nach ihrer Streckung im 37°C warmen Wasserbad auf Objektträger aufgebracht wurden. Dann wurden die Präparate auf einer Heizplatte bei 40°C getrocknet und über Nacht bei 37°C im Brutschrank verwahrt.

Die nächsten Schritte waren **die Entparaffinierung und die Rehydrierung** der Schnitte. Diese wurden zunächst für 20 Minuten bei 65°C erhitzt. Dann durchliefen sie die folgende Alkoholreihe:

10 min	Roti-Histol
10 min	Roti-Histol
5 min	Roti-Histol
5 min	Ethanol absolut 99,6 % (Fischer, Saarbrücken)
5 min	Ethanol absolut 99,6 %
5 min	Ethanol 96,0 % (Fischer, Saarbrücken)
5 min	Ethanol 70,0 % (Fischer, Saarbrücken)
15 min	H ₂ O ₂ -Gemisch: 180 ml Methanol (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) + 20 ml H ₂ O ₂ 30,0 %ig (Wasserstoffperoxid 30 % pro analysi, Merck, Darmstadt)

Anschließend erfolgte die **immunhistochemische Färbung**. Zwischen den einzelnen Schritten der Färbung wurden die Schnitte für 5 min in PBS gewaschen:

1. Färbung gegen α -Aktin

5 min	Aqua dest.
10 min	Trypsin (Trypsin, Digest All 2 [®] , Zytomed, Berlin) auf 37°C erwärmt
15 min	Avidin Blocking (Avidin-Biotin-Blocking Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen)
15 min	Biotin Blocking
15 min	10,0 % BSA
60 min	M.O.M. Mouse Ig Blocking Reagenz (M.O.M. Kit, PK2200, Vector, Burlingame, UK)
2x5 min	PBS
5 min	M.O.M. Diluent/ Oroteinblocking
30 min	Primärantikörper Alpha Aktin
2x5 min	PBS
10 min	M.O.M. biotinyliertes IgG Reagenz
2x5 min	PBS
5 min	M.O.M. ABC Reagenz
2x5 min	PBS
ca. 1 min	VECTOR Vip. Substrat Kit (Dauer nach Augenmaß bis zur Lilafärbung)
1 min	H ₂ O ohne zuvorige PBS Pufferung

2. Färbung gegen von-Willebrand-Faktor

15 min	Avidin- Blocking
15 min	Biotin –Blocking
15 min	10,0 % BSA
30 min	Blocking Serum (Goat) (Normal Goat Serum, Alexis Biochemicals, Grünberg)
30 min	vWF Primarantikörper (37°C) (Rabbit)
30 min	biotinilierter Sekundärantikörper (Goat)

30 min	ABC Reagenz (Vectastain Elite ABC Kits anti-rabbit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen)
20-30 sec	DAB Substrat (DAB Substrat Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen) (Dauer nach Augenmaß bis zur Braunfärbung)
5 min	H ₂ O
2 min	Gegenfärbung mit Methylgrün (Methylgrün Counterstain, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen) auf einer Heizplatte bei 60°C
1 min	Aqua dest.

Nach der abgeschlossenen Färbung erfolgten **die Dehydrierung und das Eindecken der Schnitte** in harzigem Medium:

2 min	Ethanol 96,0 %
5 min	Isopropylalkohol 99,8 % (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz)
5 min	Isopropylalkohol 99,8 %
5 min	Roti-Histol
5 min	Roti-Histol
5 min	Xylol (Roth, Karlsruhe)
	Eindecken mit Pertex [®] (Medite GmbH, Burgdorf)

2.8.3 Morphometrische Analyse der Lungengefäße - Muskularisierungsgrad

Zur morphometrischen Analyse der Lungengefäße wurde ein computergestütztes Analysesystem (Leica Q Win Standard Analyzing Software) mit von der Firma Leica speziell für die Gefäßmorphometrie entwickelten Makros verwendet.

Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades wurden 3µm Paraffinschnitte mit immunhistochemischer Doppelfärbung gegen smooth-muscle-alpha-actin und von-Willebrand-Faktor (Faktor VIII) gefärbt, wie es im Färbeprotokoll angeführt ist. Bei 400x, 200x und 100x Vergrößerung wurden pro Tier 80 Gefäße ausgezählt, welche mit einem ductus alveolaris assoziiert waren und einen externen Gefäßdurchmesser von 20 bis 70 µm hatten ¹⁰³.

Die untersuchten Gefäße wurden als voll muskularisiert, partiell muskularisiert oder nicht muskularisiert kategorisiert. Um den Muskularisierungsgrad zu bestimmen, wurde der Anteil anti-alpha-smooth-muscle-actin positiver (violetter)

Gefäßwandbereiche ermittelt. Dies wurde halbautomatisch in einer colorimetrisch-spektrometrischen Rechnung von der speziell von Leica angefertigten Software durchgeführt. Nicht muskularisierte Gefäße wurden in gleicher Art und Weise durch die (braune) endotheliale Anti-von-Willebrand-Faktor-Färbung deutlich gemacht.

Die Grenzen zwischen den einzelnen Kategorien wurden wie folgt festgesetzt:

- **nicht muskularisiert:** ≤ 4 % Anteil von smooth-muscle-alpha-actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia
- **partiell muskularisiert:** ≤ 75 % Anteil von smooth-muscle-alpha-actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia
- **voll muskularisiert:** > 75 % Anteil von smooth-muscle-alpha-actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia

Die errechneten Werte des Muskularisierungsgrads wurden direkt nach der Auswertung jedes einzelnen Gefäßes automatisch in Excel überführt.

2.9 Genotypisierung der HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäuse

2.9.1 Gewinnung von DNA

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden Gewebeproben mit 20 µl Proteinase K und 180 µl ATL Puffer über Nacht bei 56°C verdaut.

Das gewonnen Lysat wurde am nächsten Tag mit 200 µl AL Puffer und 200 µl Ethanol 96,0 % vermischt und anschließend auf die Aufreinigungssäulen gegeben und mit 6000x G zentrifugiert. Nach zwei Waschdurchgängen mit Puffer je 500 µl AW1 und AW2 Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 6000x G respektive 20000x G wurde die an den Aufreinigungssäulen verbleibende DNA mit AE Puffer aus den Säulen heraus gewaschen.

2.9.2 PCR – Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction)

Zur Vervielfältigung der gereinigten DNA wurde die Methode der PCR gewählt ¹⁰⁰.

Die benötigten Primer waren folgende:

Primer	Sequenz
HO-2.1_for	5'TTC ATA GCC ATC TGT AGT GA-3'
HO-2.2_rev	5'ATA CTT CAT GTC CTT GAT CA-3'

Primer	Sequenz
NEO_for	5'-CCC GGT TCT TTT TGT CAA GA-3'
NEO_rev	5'-GAT GTT TCG CTT GGT GGT C-3'

Für jedes untersuchte Tier wurden für beide Primerpaare eine PCR durchgeführt.
Pro Ansatz (23 µl) wurde für die PCR benötigt:

0,2 µl	taq-(H)-Polymerase
2,5 µl	Puffer S
0,5 µl	dNTPs
17,8 µl	aqua dest.
1,0 µl	Primer for
1,0 µl	Primer rev

Folgende Temperaturprofile wurden für die PCR gewählt:

HO-2-Primer Bande (+/+)		NEO-Primer Bande (-/-)	
1. 95°C	5 min	1. 95°C	5 min
2. 95°C	30 s	2. 95°C	30 s
3. 56°C	30 s	3. 60°C	30 s
4. 72°C	1 min	4. 72°C	1 min
Wiederholung von Schritt 2-4 für zusätzliche 34 Zyklen		Wiederholung von Schritt 2-4 für zusätzliche 34 Zyklen	
5. 72°C	10 min	5. 72°C	10 min

2.9.3 Gelelektrophorese

10 µl des jeweiligen PCR Produktes wurden anschließend mit 2 µl loading dye auf ein einprozentiges Agarosegel (versetzt mit Ethidiumbromid, 0,4 µg/ml EtBr in 1xTAE-Puffer) aufgetragen. Als Größenmarker wurde eine 1 kb DNA-Leiter verwendet. Das Gel lief bei 120 V über 30 min in einer Elektrophoresekammer. Anschließend wurden die DNA Banden mittels UV-Licht des UV-B Bereichs (280 nm Wellenlänge) in einem Photometer sichtbar gemacht.

2.10 Statistische Auswertung

Unter Zuhilfenahme eines Personalcomputers und der Programme Excel 97 (Microsoft GmbH, Unterschleißheim) und SigmaPlot 8.0 (scientific solutions, Lausanne, Schweiz) erfolgte die Auswertung der Daten.

Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte (MW) $\pm$ Standardfehler (SEM, standard error of the mean).

Die Darstellung einzelner PAP-Werte in Prozent bezieht sich jeweils auf die in den Versuchsreihen zuerst durchgeführte Vasokonstriktion der einzelnen Gruppen.

Die n-Zahl der jeweiligen Gruppen ist jeweils in der Beschreibung der Abbildungen angegeben.

Die einzelnen Werte waren normalverteilt. Beim Vergleich zweier Gruppen kam der Student t-Test für unverbundene Stichproben zur Anwendung, beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit dem Student-Newman-Keuls-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Als Statistikprogramm wurde hierbei InStat 2.04 (GraphPad-Software Inc, San Diego, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse pharmakologischer Untersuchungen zum Einfluss des TRPC6-Aktivators DAG auf die akute Phase der HPV

3.1.1 R59949

Die Applikation der Substanz R59949 DAG-Kinase-Inhibitor II führte zu einer dosisabhängigen Inhibition der akuten Phasen der HPV. Bei einer Konzentration von 15 μM R59949 im Perfusatmedium war die HPV um mehr als 65 % inhibiert, sie betrug $0,3 \pm 0,1$ mmHg (= $34,9 \pm 10,2$ %) des Ausgangswertes ($0,7$ mmHg = 100 %). Bei 30 μM R59949 war die HPV vollständig inhibiert.

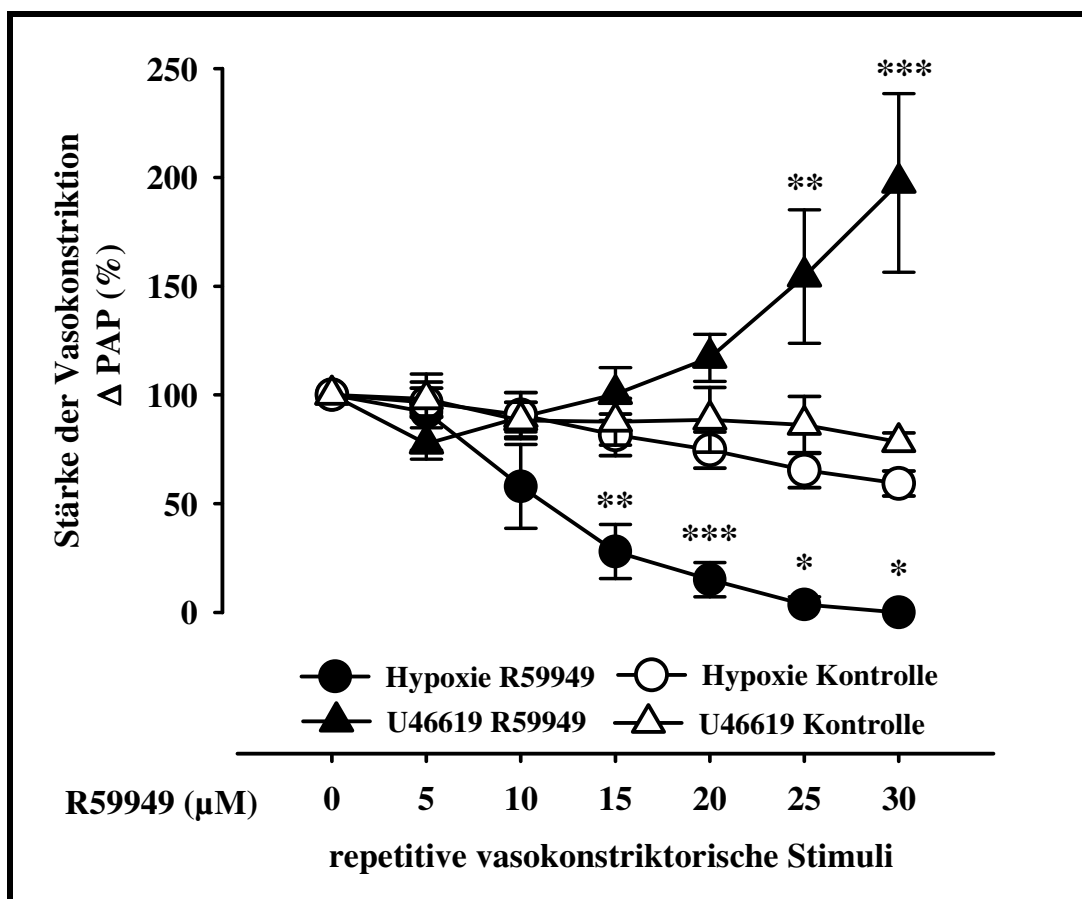


Abb. 3.1: Einfluss des DAG-Kinase-Inhibitors II R59949 auf die akute Phase der HPV und die durch das Thromboxanalogon U46619 induzierte Vasokonstriktion samt den dazugehörigen Kontrollen, alle Gruppen n=5. * markieren einen statistisch signifikanten Unterschied verglichen mit den Kontrollgruppen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Kontrollversuche mit dem Thromboxananalogon U46619 hingegen zeigten, dass die durch diesen pharmakologischen Stimulus induzierte Vasokonstriktion durch die Zugabe des DAG-Kinase-Inhibitor II nicht gehemmt, sondern vielmehr dosisabhängig verstärkt wurde. Diese Verstärkung erreichte bei 30 μM einen Wert von $1,5 \pm 0,3$ mmHg (= $197,4 \pm 36,8$ %, 100 % = Stärke der Vasokonstriktion ohne Inhibitor) während die korrespondierenden Werte für die Kontrollen ohne R59949 bei $0,8 \pm 0,1$ mmHg (= $78,4 \pm 4,2$ %) lagen (siehe Abbildung 3.1).

Um die HPV mit einem zweiten vasokonstriktorischen Stimulus zu vergleichen wurde eine Versuchsreihe mit KCl-induzierten Vasokonstriktionen durchgeführt. Es stellte sich hierbei heraus, dass die KCl-induzierte Vasokonstriktion im Gegensatz zu den U46619-induzierten Vasokonstriktionen ebenfalls durch R59949 inhibiert wurde. Schon bei 5 μM R59949 im zirkulierenden Perfusat zeigte sich eine

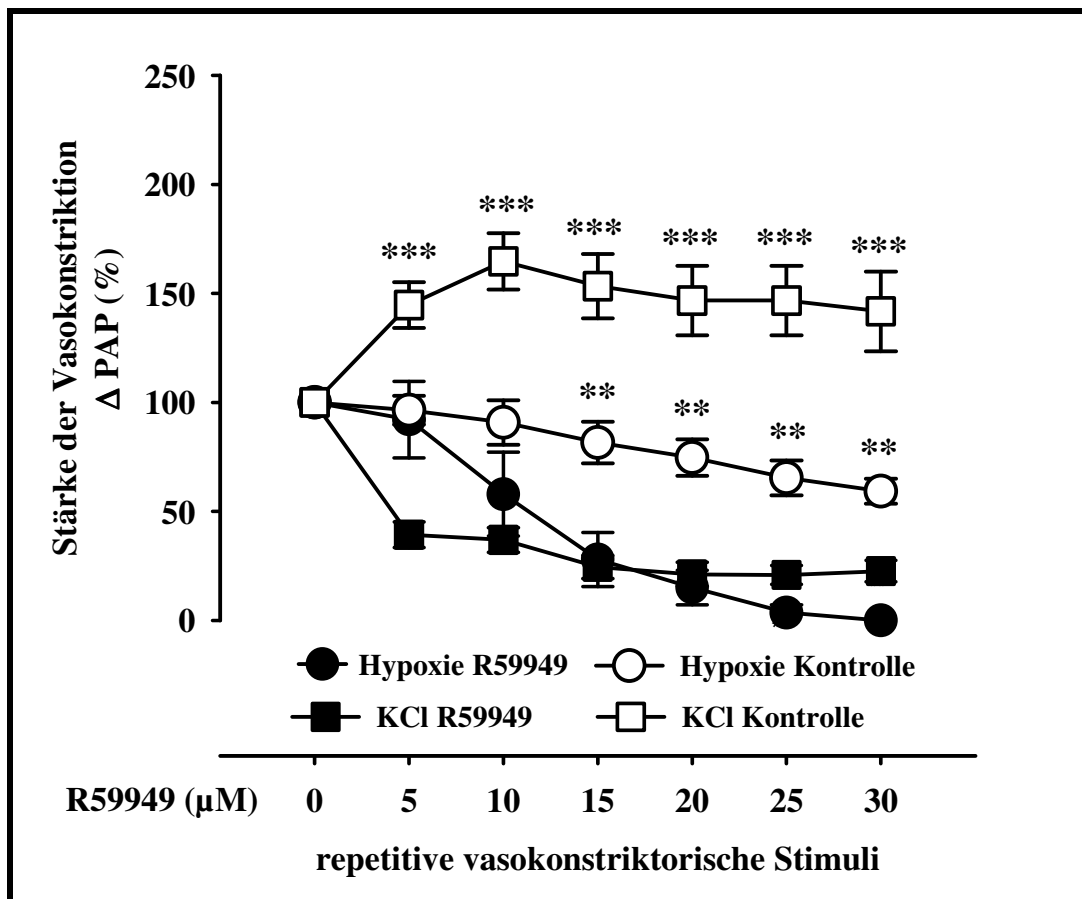


Abb. 3.2: Einfluss von R59949 auf die akute Phase der HPV und die durch KCl-induzierte Vasokonstriktion, jeweils $n=5$. Signifikante Unterschiede sind durch * markiert (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$).

signifikante Abnahme der KCl-induzierten Vasokonstriktion von 2,2 mmHg (= 100 %) auf $0,8 \pm 0,1$ mmHg (= $39,3 \pm 5,8$ %) gegenüber einem Anstieg in den

Kontrollgruppe von 2,3 mmHg (= 100 %) auf $3,4 \pm 0,6$ mmHg (= $144,7 \pm 10,5$ %) ohne R59949. Auch bei den darauf folgenden Vasokonstriktionen mit erhöhten Dosen R59949 zeigte sich eine signifikante, jedoch keine vollständige Inhibition der KCl-induzierten Vasokonstriktion (s. Abb. 3.2).

Der Einfluss von R59949 auf den normoxischen PAP wird in Abb. 3.3 dargestellt. Der normoxische PAP ist derjenige Druck, welcher sich bei konstanter Perfusion der isolierten Lunge mit 2 ml/min und normoxischer Beatmung in der Pulmonalarterie einstellt. Bei jeder Applikation von R59949, welche jeweils 10 min vor dem vasokonstriktorisches Manöver durchgeführt wurde, wurde der normoxische PAP durch die Applikation des DAG-Kinase-Inhibitors II erhöht. Daher wurden die jeweiligen Änderungen des normoxischen PAP, die durch jede einzelne Zugabe von R59949 provoziert wurde, während der Versuche mit repetitiver hypoxischer Ventilation, repetitiven Vasokonstriktionen durch U46619 und KCl aber auch in Versuchen mit rein normoxischer Beatmung bestimmt. Bei 25 μ M und 30 μ M R59949 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen

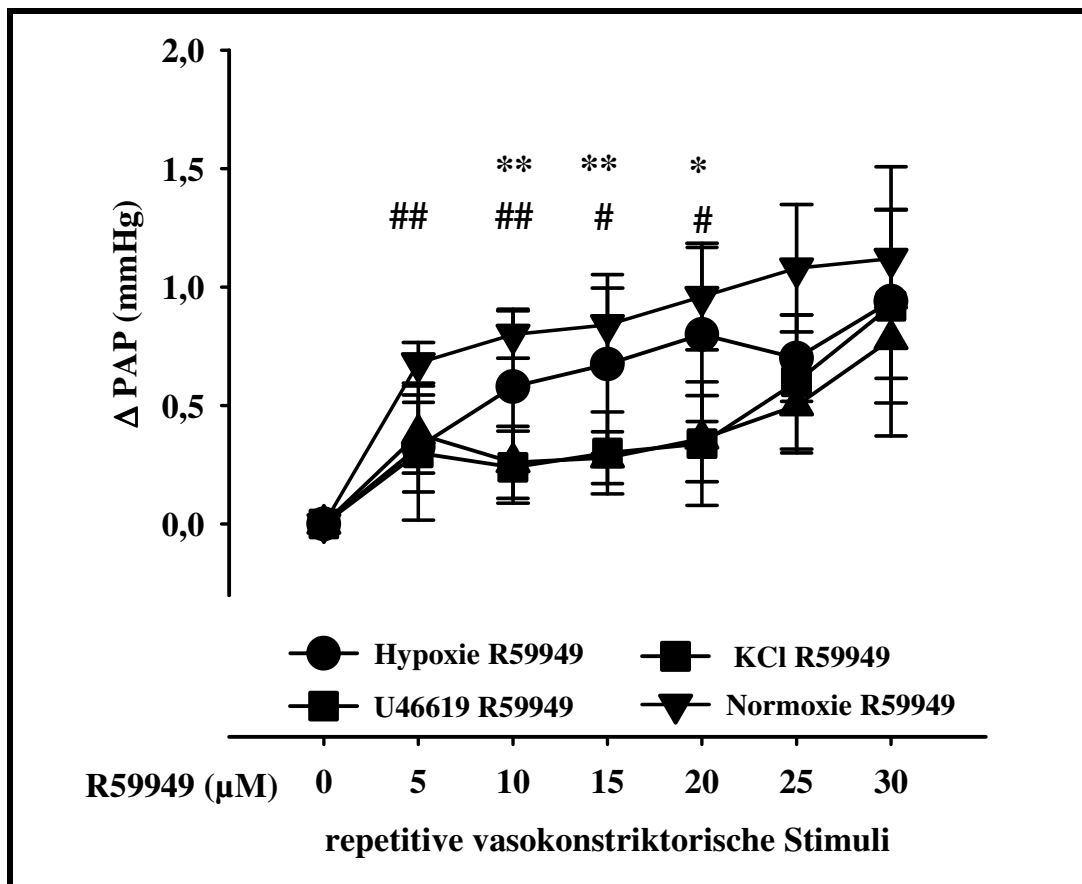


Abb. 3.3: Anstieg des normoxischen PAP durch jeweilige DAG-Kinase-Inhibitor II R59949 Gabe in Versuchen mit Vasokonstriktorisches Stimuli (Hypoxie, U46619, KCl) und Normoxie jeweils n=5. Anstiege beziehen sich auf jede einzelne R59949 Gabe. Signifikante

Unterschiede zwischen Normoxie- und KCl-Versuchen werden durch #, zwischen Normoxie und U46619 durch * symbolisiert, (*, #: $p < 0,05$; **, ##: $p < 0,01$).

den Versuchen mit vasokonstriktorischem Stimuli und den unter Normoxie durchgeführten Versuchen. Ebenso wurde kein signifikanter Druckanstieg des normoxischen PAP in den Normoxieversuchen gegenüber den Hypoxieversuchen bei geringeren R59949 Konzentrationen beobachtet. Die normoxischen PAP-Werte bei niedrigen R59949 Konzentrationen stiegen dagegen bei U46619- und KCl-induzierter Vasokonstriktion signifikant geringer an als bei den Normoxiekontrollversuchen ohne vasokonstriktorisches Stimuli (siehe Abb. 3.3).

3.1.2 OAG

Die Untersuchung des Einflusses des DAG-Analogons OAG auf die Stärke der HPV zeigte bei Konzentrationen von 15 und 30 μM OAG zunächst einen Anstieg der HPV von 1,8 mmHg (= 100 %) bei 0 μM OAG auf $2,3 \pm 0,3$ mmHg (= $130,1 \pm 5,8$ %) bei 15 μM OAG, welcher jedoch bei 30 μM OAG [$2,2 \pm 0,3$ mmHg (= $124,4 \pm 12,0$ %)] nicht signifikant war.

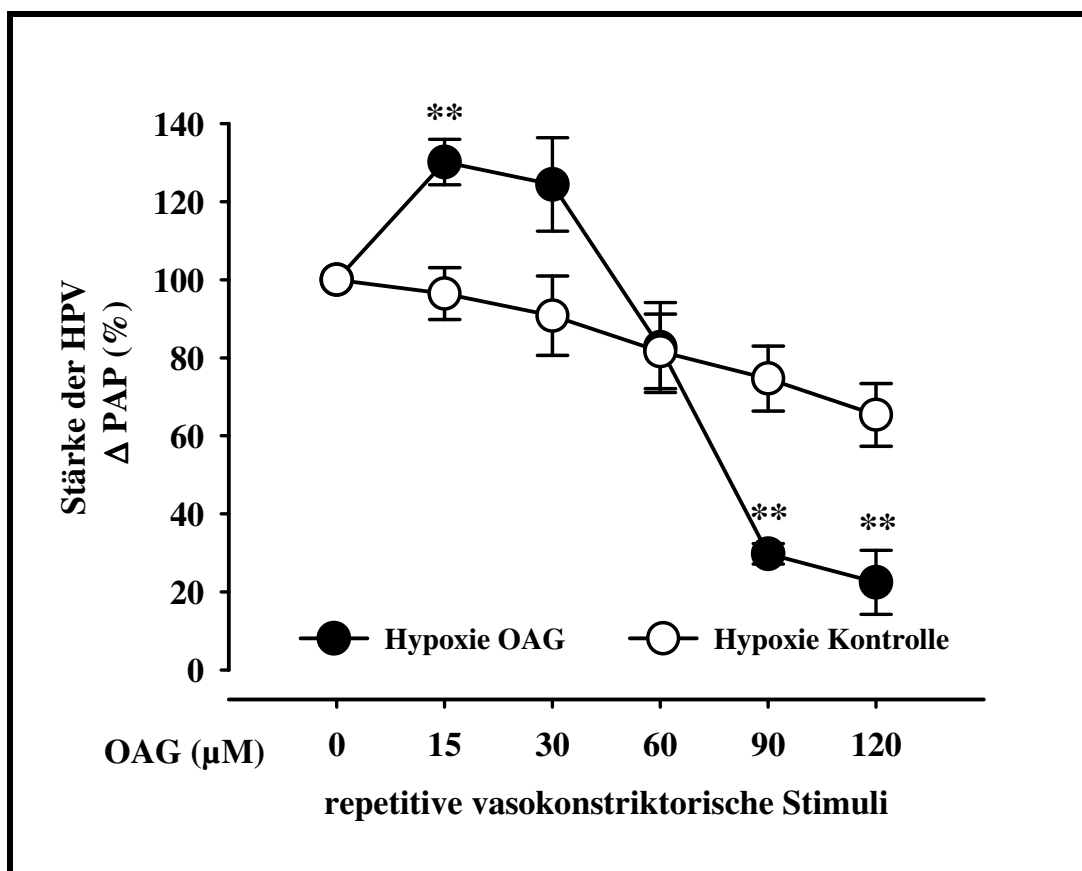


Abb. 3.4: Wirkung des DAG-Analogons OAG auf die akute Phase der HPV inklusive der dazugehörigen Hypoxiekontrollen, jeweils n=5. * markieren signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (*:p<0,05; **:p<0,01).

Konzentrationen von 90 und 120 μM des DAG-Analogons führten zu einer signifikanten Inhibition der HPV. Bei 120 μM OAG konnte nur noch $0,5 \pm 0,2$ mmHg (= $22,4 \pm 8,2$ %) der ursprünglichen Stärke der Vasokonstriktion beobachtet werden (Abb. 3.4).

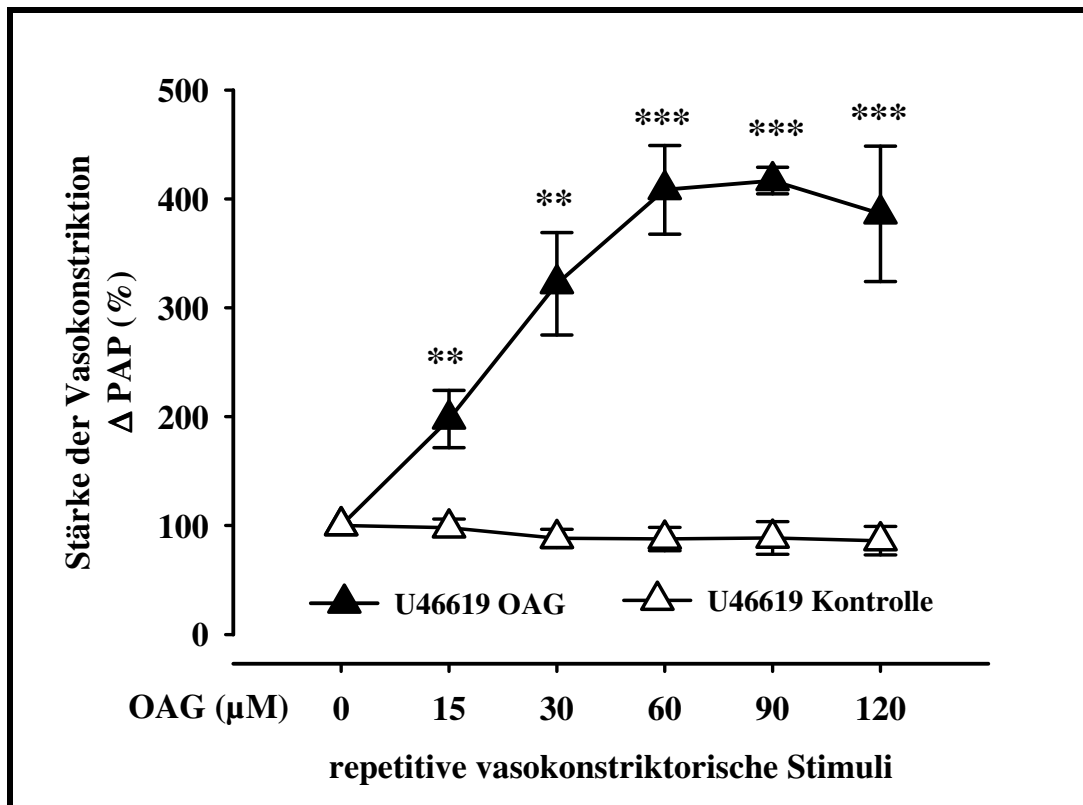


Abb. 3.5: Einfluss des DAG-Analogons OAG auf die U46619-induzierte Vasokonstriktion, jeweils n=5. * markieren signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (*:p<0,05, **:p<0,01, ***: p<0,001).

Wie im Falle der DAG-Kinase-Inhibition durch R59949 konnte auch bei OAG durch Kontrollversuche mit alleiniger U46619 Applikation gezeigt werden, dass das DAG-Analogon die U46619-induzierte Vasokonstriktion nicht inhibiert. Im Gegenteil verstärkte sich die Vasoreaktion auf U46619 unter OAG schon bei 15 μM signifikant auf $4,3 \pm 0,6$ mmHg (= $197,7 \pm 26,3$ %) (s. Abb. 3.5).

Die durch KCl ausgelöste Vasokonstriktion zeigte unter OAG ebenfalls wie die durch U46619 ausgelöste Vasokonstriktion unter OAG eine signifikante Verstärkung gegenüber der Kontrollgruppe. Bei 30 μM OAG wurde die Vasokonstriktion signifikant auf $4,8 \pm 0,3$ mmHg (= $293,8 \pm 40,1$ %) verstärkt, während hingegen in der Kontrollgruppe die Werte bei $3,8 \pm 0,6$ mmHg (= $164,7 \pm 13,0$ %) lagen (s. Abb. 3.6).

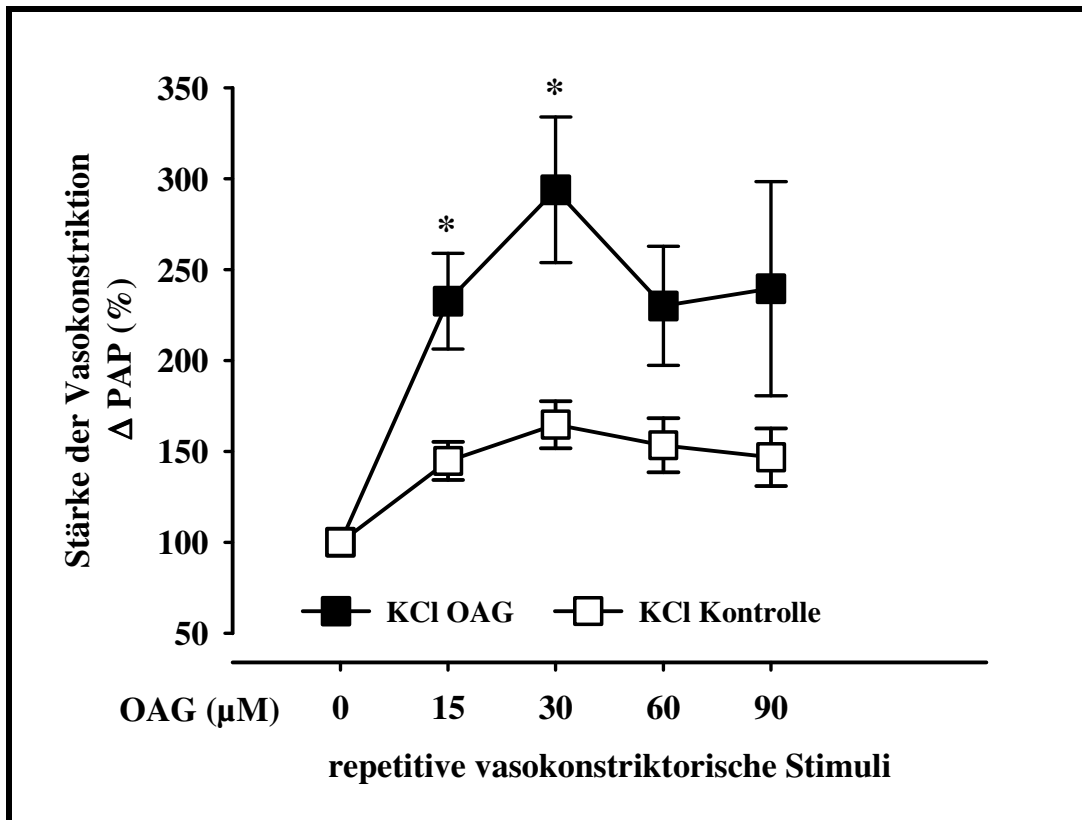


Abb. 3.6: Einfluss des DAG-Analogons OAG auf die KCl-induzierte Vasokonstriktion, jeweils n=5. * markieren signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (*:p<0,05).

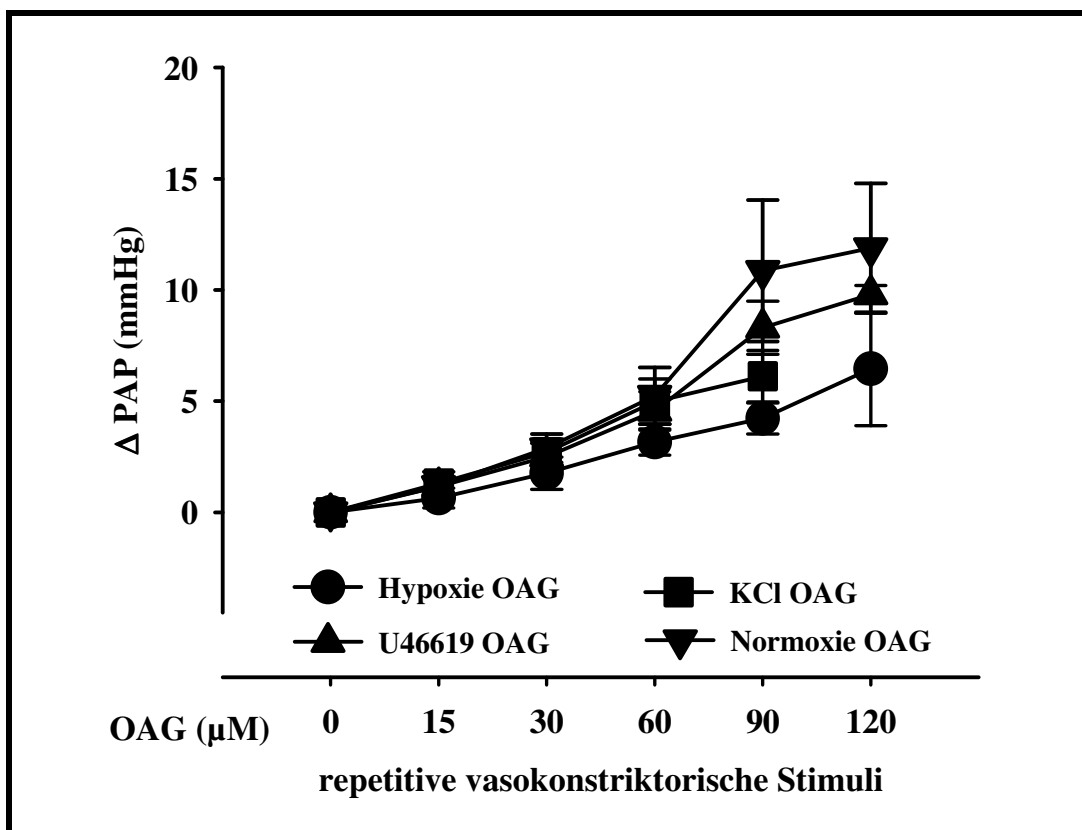


Abb. 3.7: Wirkung von OAG auf den normoxischen PAP. Vergleich zwischen Hypoxie, U46619, KCl und der dazugehörigen Normoxie-Kontrollgruppe, jeweils n=5.

Das DAG-Analogon OAG zeigte ebenfalls wie der DAG-Kinase-Inhibitor R59949 einen Einfluss auf den normoxischen PAP. Sowohl in den Versuchen mit den vasokonstriktorischem Stimuli Hypoxie, U46619 und KCl als auch in der mit normoxischem Gas durchgeführten Kontrollgruppe zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg des Gefäßtonus unter OAG-Gabe, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen bezüglich der Erhöhung des normoxischen PAP festgestellt werden konnten (s. Abb. 3.7).

3.1.3 U73122 und U73343

In Abbildung 3.8 ist die Wirkung des PLC-Inhibitors U73122 auf die HPV dargestellt. Im Gegensatz zu der ebenfalls getesteten inaktiven Form des Inhibitors U73343 und zu den Kontrollgruppen, in denen nur das Lösungsmittel Ethanol dem

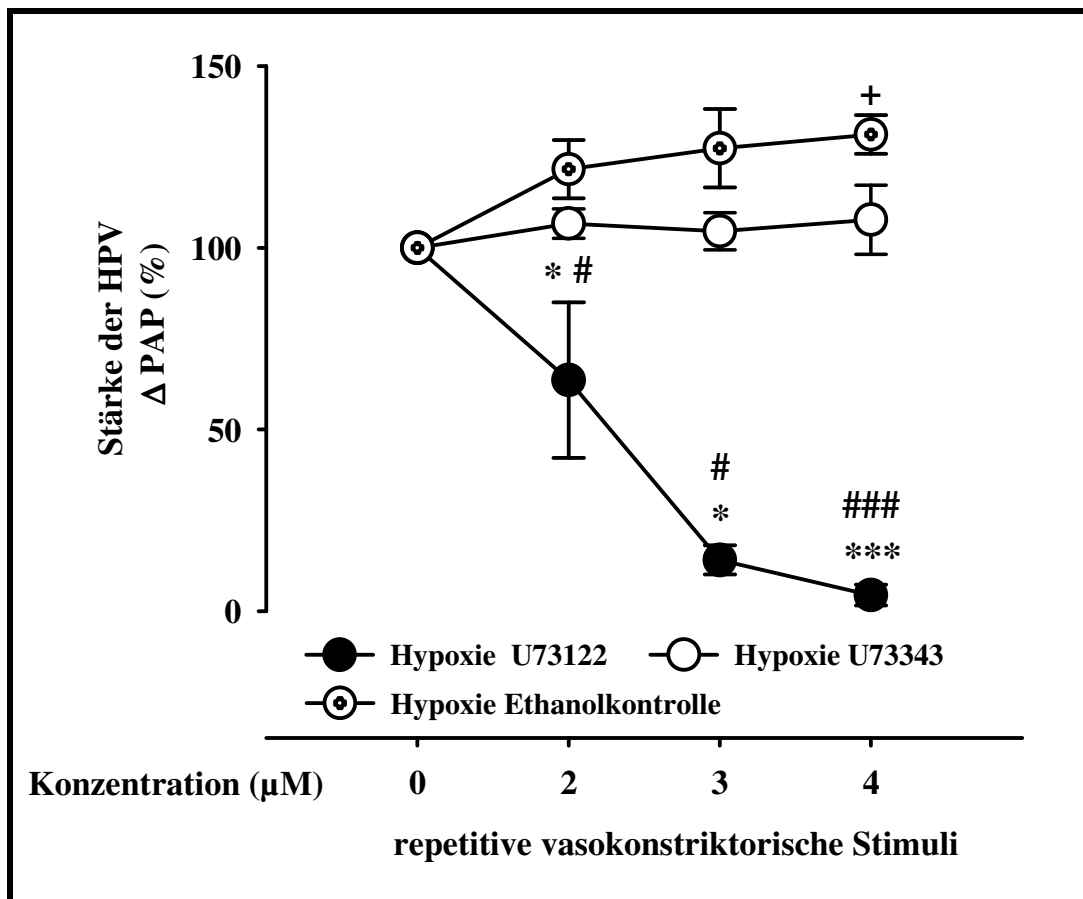


Abb. 3.8: Wirkung des PLC-Inhibitors U73122 auf die akute Phase der HPV und der dazugehörigen Kontrollen mit der inaktiven Form des PLC-Inhibitors U73343 und dem Lösungsmittel Ethanol, jeweils n=5. * markieren signifikante Unterschiede zwischen der U73122-Gruppe und der Ethanolkontrollgruppe, # zwischen der U73122- und der U73343-Gruppe, + zwischen U73343 und der Ethanolkontrollgruppe (*, #, +: p<0,05; ***, ###: p<0,001).

Perfusat hinzu gegeben wurde, zeigte der PLC-Inhibitor U73122 bei einer Konzentration von 4 μM eine signifikante Hemmung der HPV gegenüber den beiden Kontrollgruppen. Es konnte nur noch eine HPV von lediglich $0,1 \pm 0,1$ mmHg (= $4,4 \pm 2,6$ %) gemessen werden, während hingegen in den Kontrollgruppen der Versuche zur Phospholipase C Inhibition bei repetitiven hypoxischen Beatmungsphasen von 10 min die HPV leicht im Vergleich zum Beginn der Kontrollen zunahm [U73343 4 μM : $3,3 \pm 0,3$ mmHg (= $107,7 \pm 9,5$ %) resp. Lösungsmittel Ethanol $3,9 \pm 0,6$ mmHg (= $131,2 \pm 5,3$ %)].

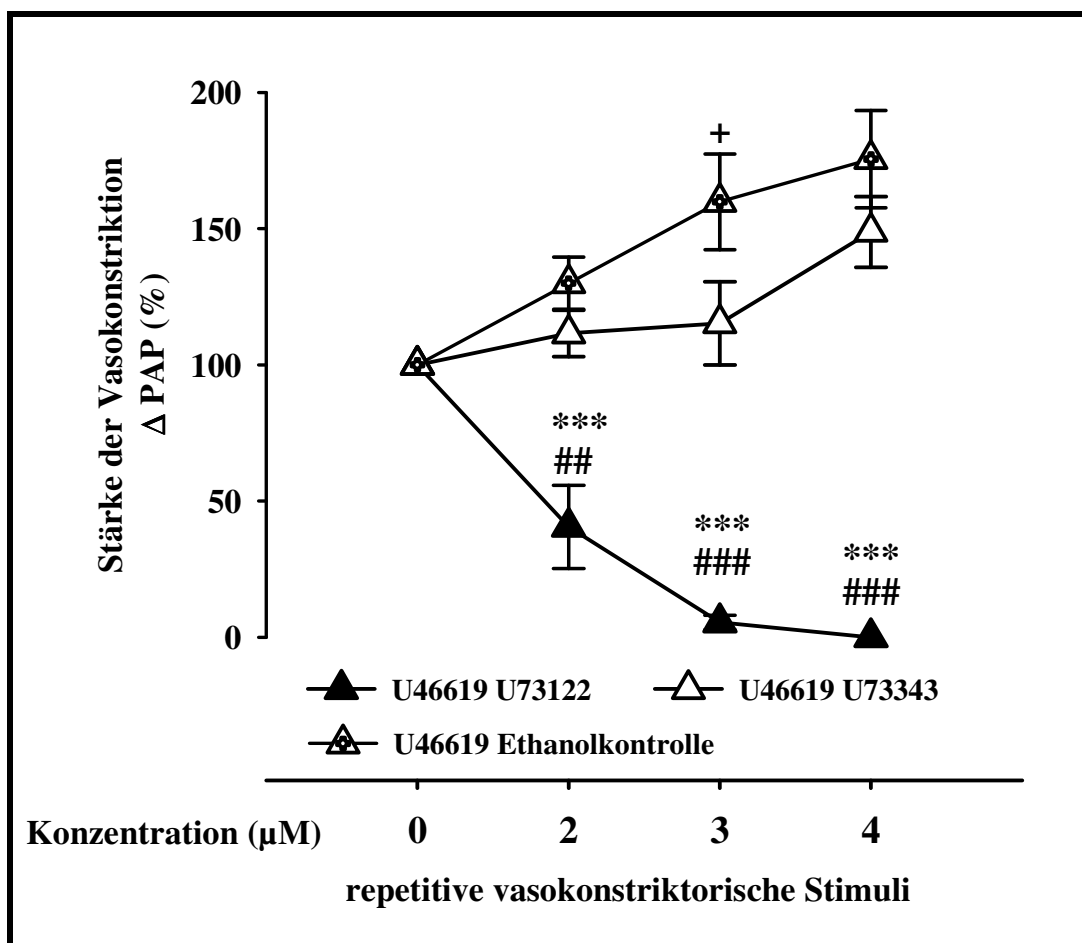


Abb. 3.9: Wirkung des PLC-Inhibitors U73122 auf die U46619-induzierte Vasokonstriktion, je $n=5$. * markieren signifikante Unterschiede zwischen der U73122-Gruppe und der Ethanolkontrollgruppe, # zwischen der U73122- und der U73343-Gruppe und + zwischen der U73343 und der Ethanolkontrollgruppe (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, entsprechend für # und +).

Die Wirkung von U73122 auf die U46619 induzierte Vasokonstriktion wurde ebenfalls untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass U73122 eine vollständige Inhibition der U46619 induzierten Vasokonstriktion verursacht. Wie schon in den Versuchen zur Untersuchung des Einflusses des PLC-Inhibitors auf die HPV zeigte

die Kontrollgruppe mit U73343 ein ähnliches Verhalten wie die Kontrollen mit dem Lösungsmittel Ethanol. Bei beiden Gruppen stieg die Vasokonstriktion bei 4 μM U73343 beziehungsweise der entsprechenden Menge des Lösungsmittels an, unterschied sich aber nicht signifikant voneinander [U73343 4 μM : $4,8 \pm 0,5$ mmHg (= $148,8 \pm 13,0$ %); Ethanol: $4,8 \pm 1,0$ mmHg (= $175,5 \pm 17,8$ %)] (s. Abb. 3.9).

Bei der zusätzlichen Untersuchung der Substanzen bezüglich des Einflusses auf die KCl-induzierte Vasokonstriktion zeigte sich eine Inhibition der Vasokonstriktion durch den aktiven PLC-Inhibitor U73122 auf $0,4 \pm 0,1$ mmHg (= $12,0 \pm 3,7$ %) des Ausgangswertes. Die Kontrollgruppe mit Ethanol zeigte, wie in den vorangegangenen Untersuchungen mit Hypoxie und U46619, eine Verstärkung der Vasokonstriktion bei repetitiven Stimuli KCl. Die Versuche der U73343 Kontrollgruppen zeigten keine Verstärkung der Vasokonstriktion, wie es bei den Kontrollen mit Ethanol beobachtet werden konnte, sondern die Vasoreaktion war ähnlich dem Anfangsstimulus relativ konstant [U73343 4 μM : $3,7 \pm 0,7$ mmHg (= $114,7 \pm 17,2$ %)] (s. Abb. 3.10).

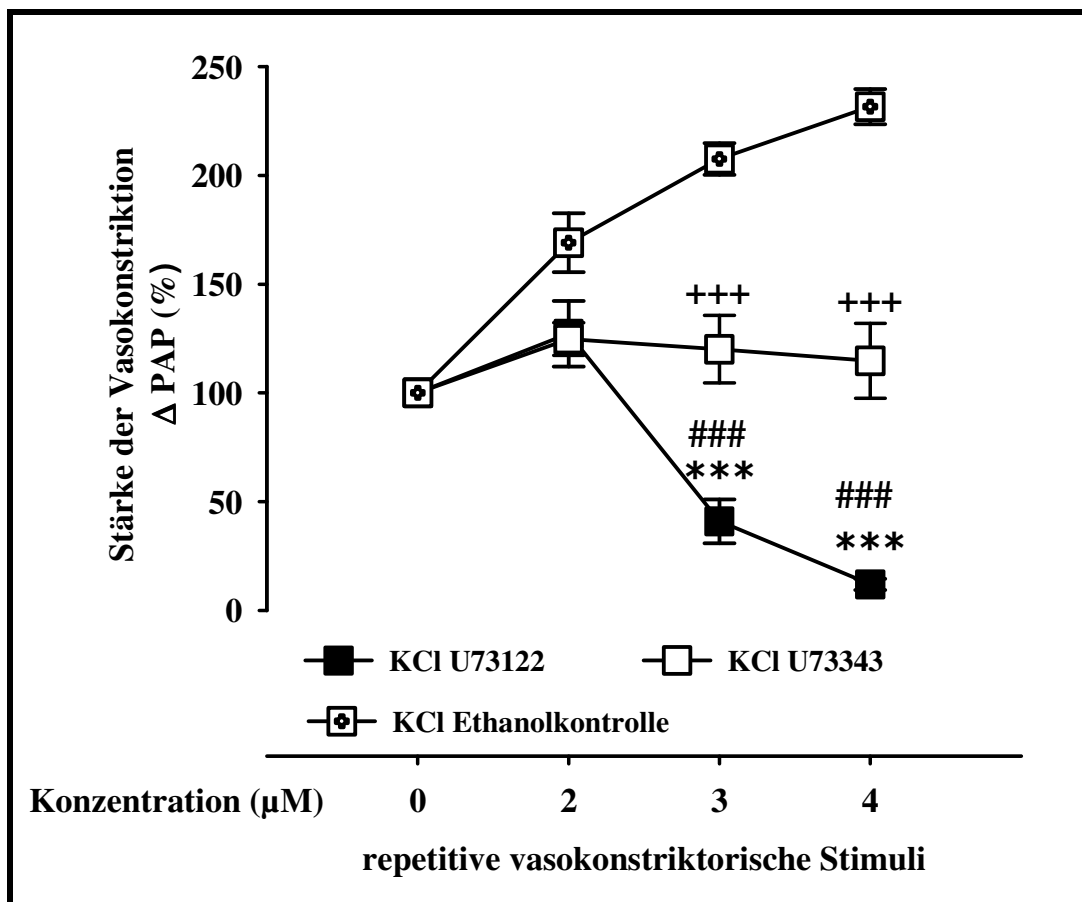


Abb. 3.10: Wirkung des PLC-Inhibitors U73122 auf die KCl-induzierte Vasokonstriktion, jeweils $n=5$. * markieren signifikante Unterschiede zwischen der U73122-Gruppe und der Ethanolkontrollgruppe, # zwischen der U73122- und der U73343-Gruppe und + zwischen der U73343 und der Ethanolkontrollgruppe. (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$, entsprechend für # und +)

Der normoxische PAP wurde durch Gabe des PLC-Inhibitors bei den Hypoxieversuchen und den U46619-Versuchen nicht signifikant gegenüber den Versuchen mit alleiniger Gabe des Lösungsmittels beeinflusst. Bei $4\text{ }\mu\text{M}$ U73122 in beiden Versuchsreihe konnte nur eine tendenzielle Abnahme des normoxischen PAP festgestellt werden (s. Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Lediglich bei den Versuchen, bei denen KCl als vasokonstriktorisches Stimulus diente, war die durch den PLC-Inhibitor U73122 hervorgerufene Abnahme des normoxischen PAPs statistisch signifikant (U73122 $3\text{ }\mu\text{M}$: $-0,9\pm0,3\text{ mmHg}$; U73443 $3\text{ }\mu\text{M}$ $0,1\pm0,1\text{ mmHg}$, Ethanol-Lsm.: $0,4\pm0,1\text{ mmHg}$) (Abb. 3.13).

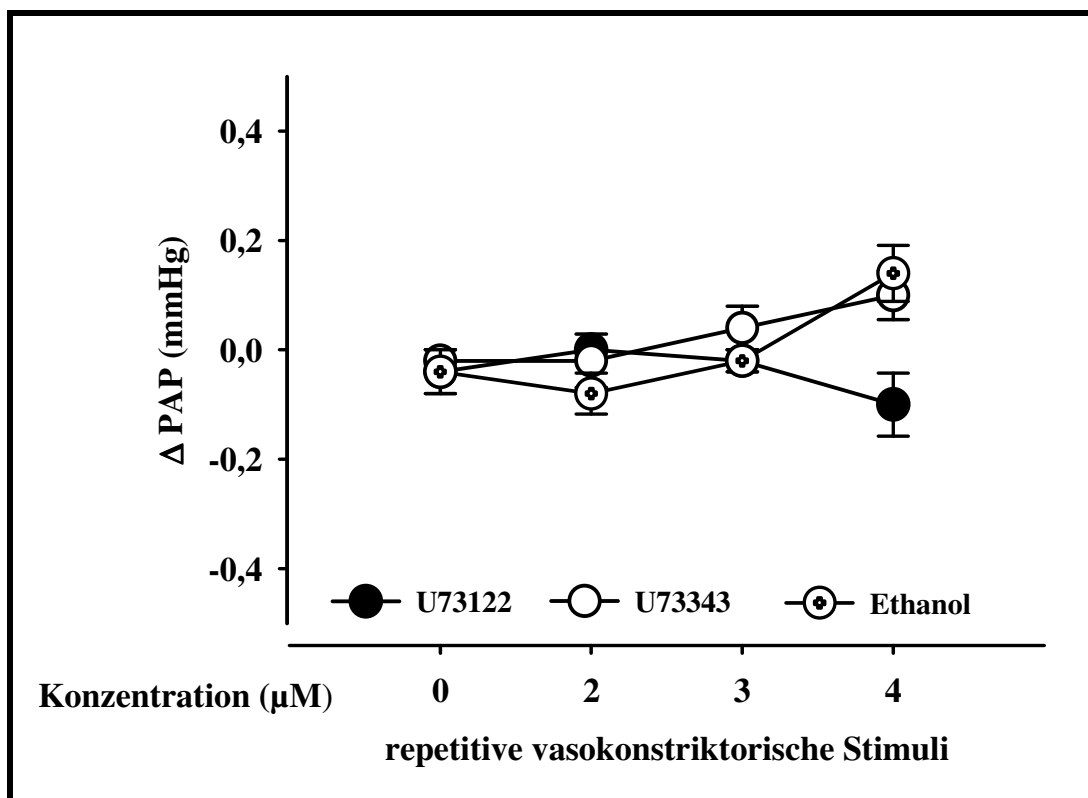


Abb. 3.11: Änderungen des normoxischen PAP bei HPV-Inhibition durch PLC-Inhibitor U73122, jeweils $n=5$.

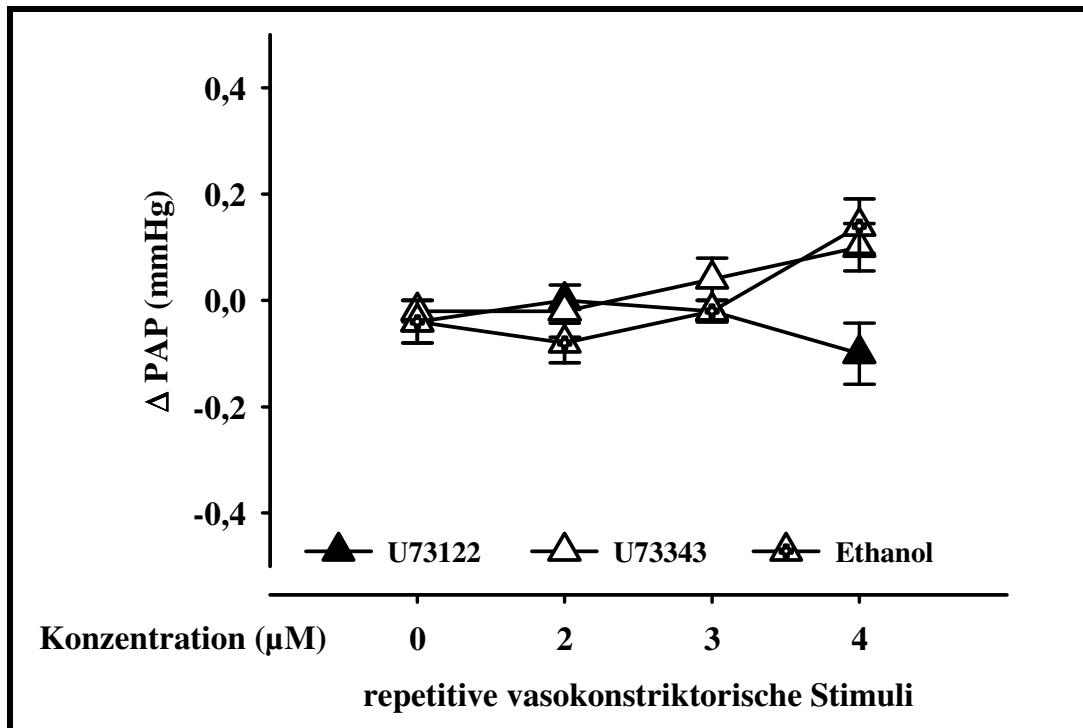


Abb. 3.12: Änderungen des normoxischen PAP bei Inhibition der durch U46619-induzierten Vasokonstriktion durch PLC-Inhibitor U73122 und dazugehörige Kontrollen, jeweils n=5.

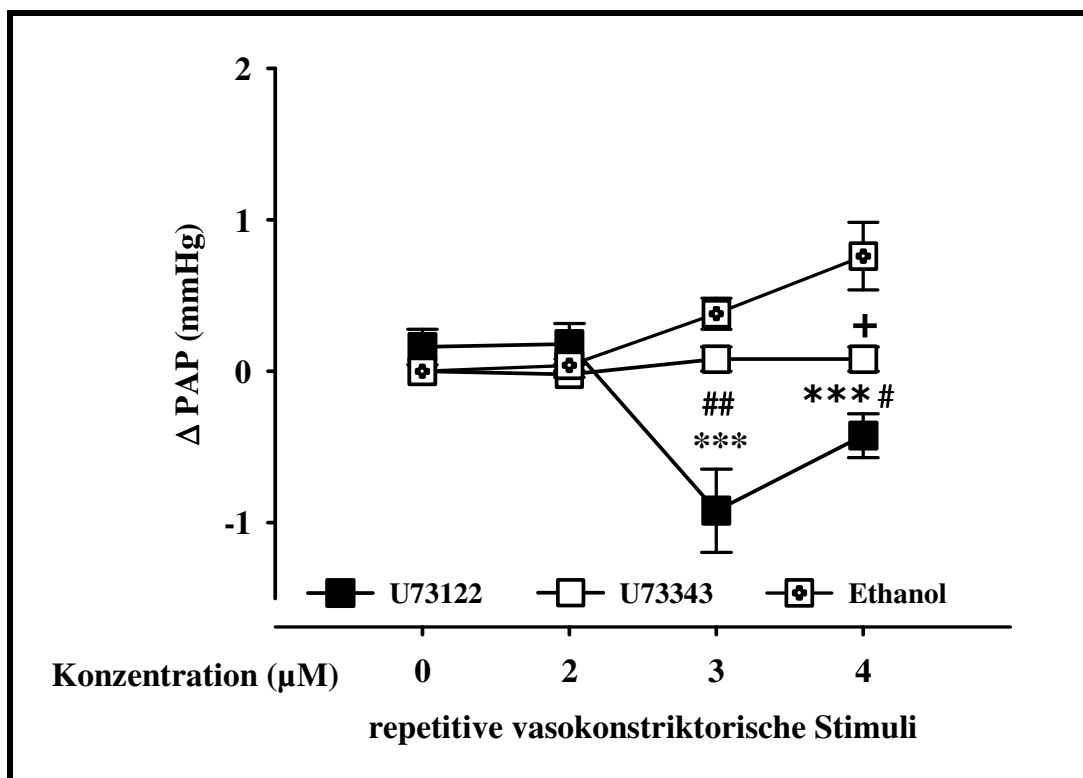


Abb. 3.13: Änderungen des normoxischen PAP bei Inhibition der durch KCl-induzierten Vasokonstriktion durch PLC-Inhibitor U73122, jeweils n=5. * markieren signifikante Unterschiede zwischen der U73122-Gruppe und der Ethanolkontrollgruppe, # zwischen der U73122- und der U73343-Gruppe und + zwischen der U73343 und der Ethanolkontrollgruppe (*:p<0,05; **:p<0,01, ***:p<0,001, entsprechend für # und +).

3.2 Ergebnisse pharmakologischer Untersuchungen zum Einfluss des TRPC6-Aktivators DAG auf die protrahierte Phase der HPV

3.2.1 R59949

In bisher erfolgten Untersuchungen zur Rolle des TRPC6-Kanals während der protrahierten Phase der HPV hat sich bei TRPC6^{-/-} gezeigt, dass ein Fehlen des TRPC6-Kanals keinen Einfluss auf die protrahierte Phase der HPV hat. Um die Bedeutung von DAG resp. DAG-Kinase für die protrahierten Phase der HPV zu untersuchen, wurde daher auch über die pharmakologische Beeinflussung mittels R59949 versucht, die protrahierte Phase der HPV zu inhibieren. In Abb. 3.14 ist der Effekt der einmaligen Gabe von 10 μ M R59949 auf sukzessive, hypoxische Manöver zu sehen.

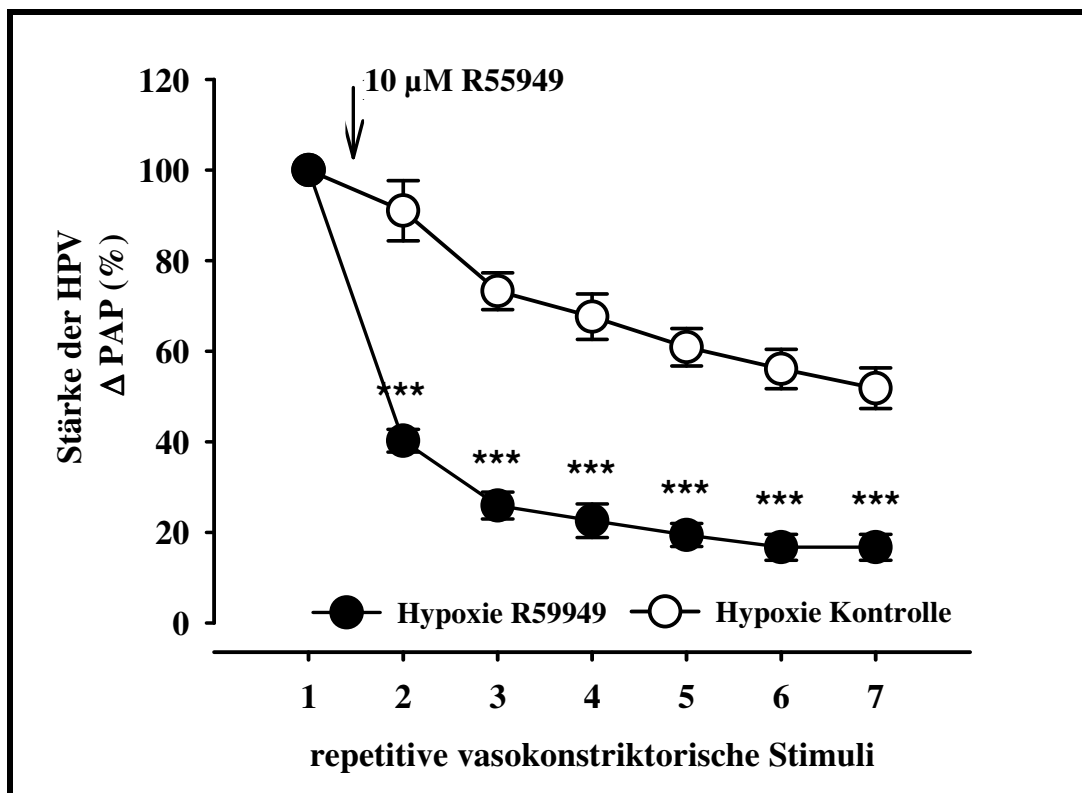


Abb. 3.14: Wirkung von R59949 bei einmaliger Gabe auf repetitive akute Phasen der HPV. Hypoxieversuche n=5, Kontrollen n=6. Sternchen *** markieren einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen (***: p<0,001).

Es ist zu erkennen, dass repetitive hypoxische Beatmungsphasen unter der einmaligen Zugabe von R59949 über den gesamten Versuchszeitraum zu einer deutlich eingeschränkten HPV führten. So verminderte sich die HPV unter Einfluss

von R59949 bei der ersten Phase der akuten HPV auf $0,7 \pm 0,1$ mmHg ($= 40,2 \pm 2,5$ %) gegenüber den Kontrollversuchen, wo noch $1,4 \pm 0,1$ mmHg ($= 91,0 \pm 6,7$ %) der ursprünglichen HPV-Stärke nachgewiesen werden konnten. Nach 7 repetitiven, 10 minütigen Hypoxien, welche einer Versuchsdauer von 175 min entsprechen, konnte mit R59949 eine HPV von $0,3 \pm 0,1$ mmHg ($= 16,7 \pm 2,9$ %) und ohne R59949 eine HPV von $0,7 \pm 0,1$ mmHg ($= 51,8 \pm 4,5$ %) der initialen Reaktionsstärke gemessen werden, so dass für einen Zeitraum von ca. 180 min eine signifikante Einschränkung der akuten hypoxischen Vasokonstriktion durch eine einmalige R59949-Gabe bewirkt werden konnte.

In separaten Experimenten wurde nun nach 10 min dauernder Wirkung von R59949 im rezirkulierenden Perfusatsystem eine 3 h dauernde hypoxische Beatmung begonnen. In Abb. 3.15 ist zu erkennen, dass die innerhalb der ersten 10 min auftretende HPV unter Einfluss des DAG-Kinase-Inhibitors signifikant vermindert

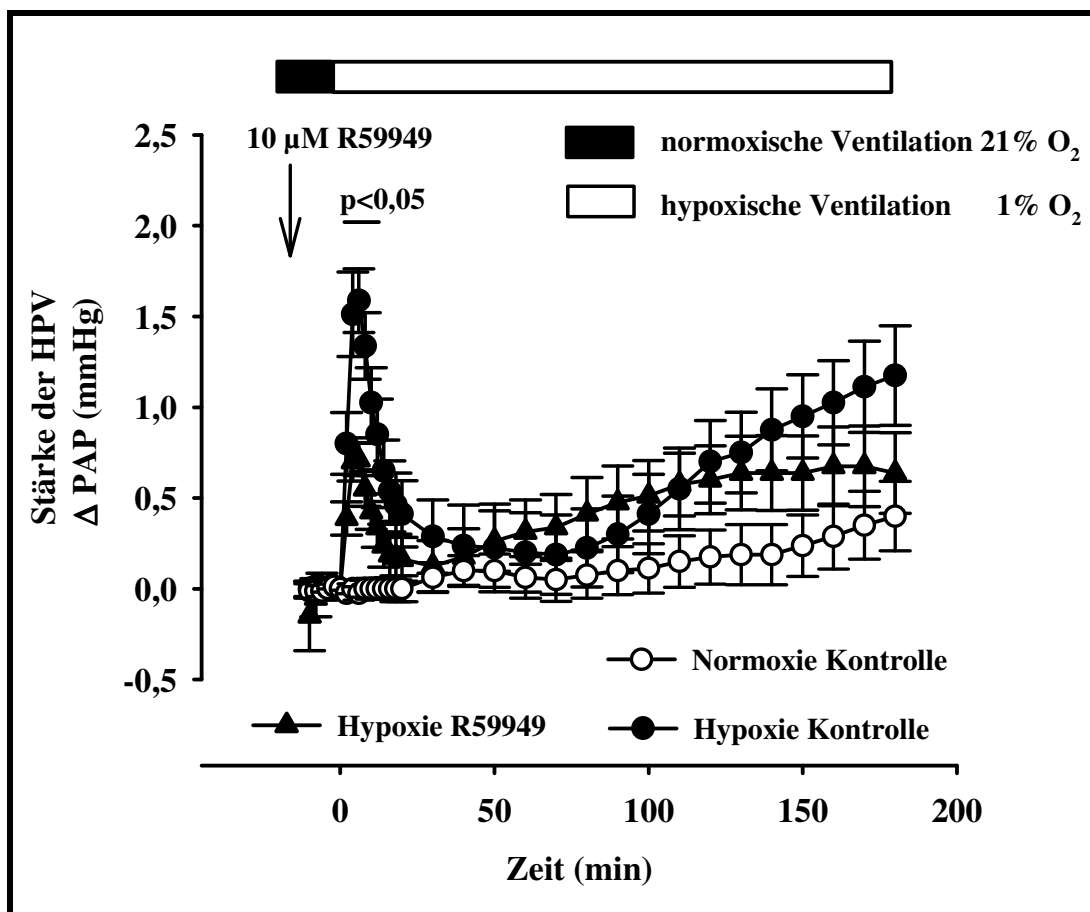


Abb. 3.15: Einfluss von R59949 auf die akute und protrahierte Phase der HPV, dazugehörige Normoxie- und Hypoxiekontrollen, jeweils $n=8$. Der Balken markiert einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Hypoxiekurven.

ist, $0,7 \pm 0,1$ mmHg gegenüber den Kontrollen mit $1,6 \pm 0,2$ mmHg. Die in den Kontrollen beobachtete, typische protrahierte Phase der HPV, bei der es nach einem Abfall des PAP nach etwa 60 min zu einer protrahierten Vasokonstriktion kommt, ist ebenso in den mit R59949 behandelten Lungen feststellbar und statistisch nicht signifikant unterschiedlich zu den hypoxischen Kontrollversuchen ohne R59949.

In Abb. 3.16 wird die Wirkung von R59949 auf die akute respektive protrahierte Phase der HPV dargestellt, in dem die Differenzen aus hypoxischen und normoxischen PAP gebildet wurden, um den Einfluss, den R59949 auf den Basistonus der pulmonalen Gefäße hat (Abb. 3.17), auszugleichen. In den Kontrollen war ein Maximum ($\Delta 1,6 \pm 0,2$ mmHg) innerhalb der ersten 10 Minuten der hypoxischen Beatmung erreicht, anschließend erfolgte die oben beschriebene,

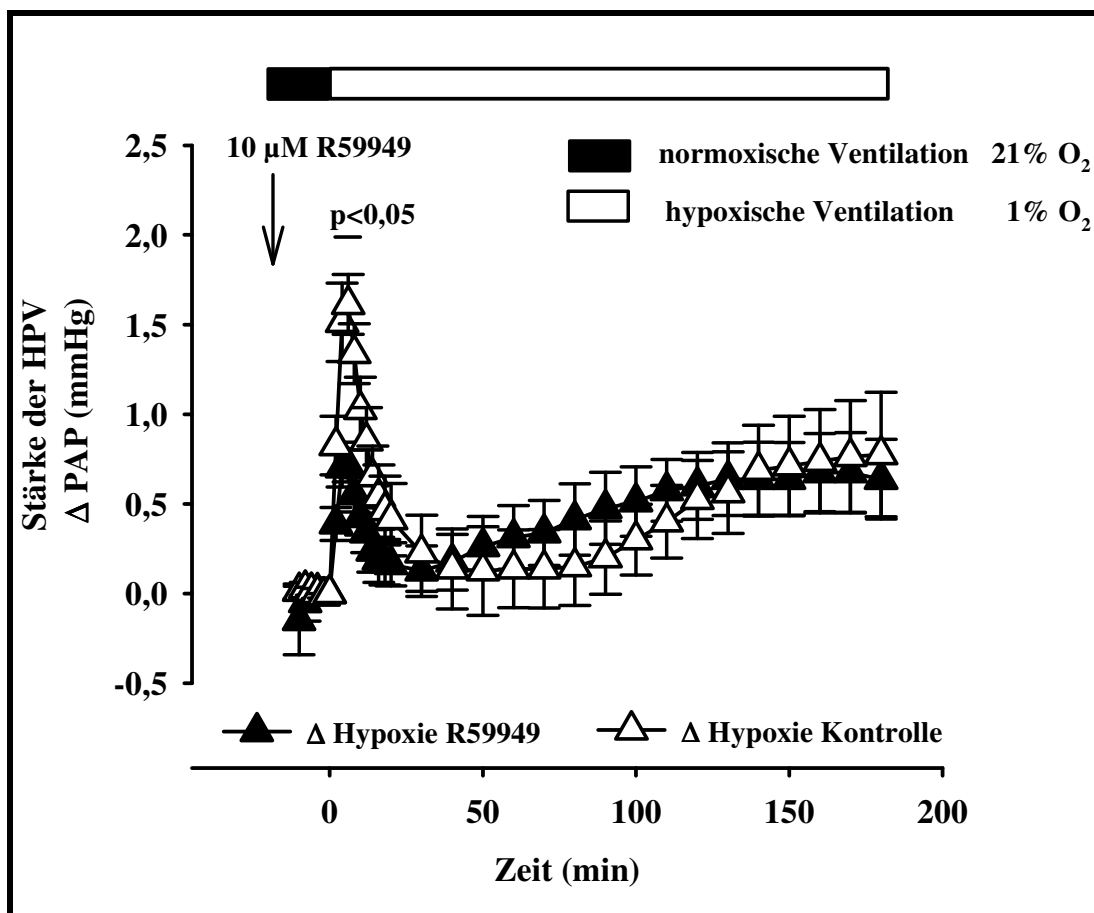


Abb. 3.16: Wirkung von R59949 auf die akute und protrahierte Phase der HPV. Dargestellt sind jeweils die Differenzen aus Hypoxie – Normoxieversuchen mit R59949 respektive ohne R59949, jeweils $n=8$. Der Balken markiert einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den abgebildeten Differenzkurven.

typische protrahierte Phase der HPV. Nach dem Abfall des PAP kam es nach 60min hypoxischer Beatmung zur Phase der protrahierten Vasokonstriktion ($\Delta 0,8 \pm 0,3$

mmHg). Anders verhielt es sich unter R59949. Wie in den Versuchen zur Wirkung von R59949 auf die akute HPV (Abb. 3.1) ist die akute Phase hypoxischer Vasokonstriktion, die innerhalb der ersten 10min auftritt, auch hier signifikant eingeschränkt ($\Delta 0,7 \pm 0,1$ mmHg). Bezüglich der protrahierten Phase der HPV konnte hingegen durch Zugabe von R59949 keine signifikante Hemmung der verzögerten Phase der HPV erreicht werden ($\Delta 0,6 \pm 0,2$ mmHg). Auch unter Wirkung des DAG-Kinase-Inhibitors konnte der für die protrahierte Phase der HPV typische, verzögerte Anstieg des PAP beobachtet werden (s. Abb. 3.16).

Der DAG-Kinase-Inhibitor R59949 beeinflusst neben der HPV auch den normoxischen PAP (s. Abb. 3.17). Ähnlich der akuten und protrahierten Phase der HPV ist hier ein unmittelbarer Anstieg des pulmonalen Gefäßtonus nach Zugabe des

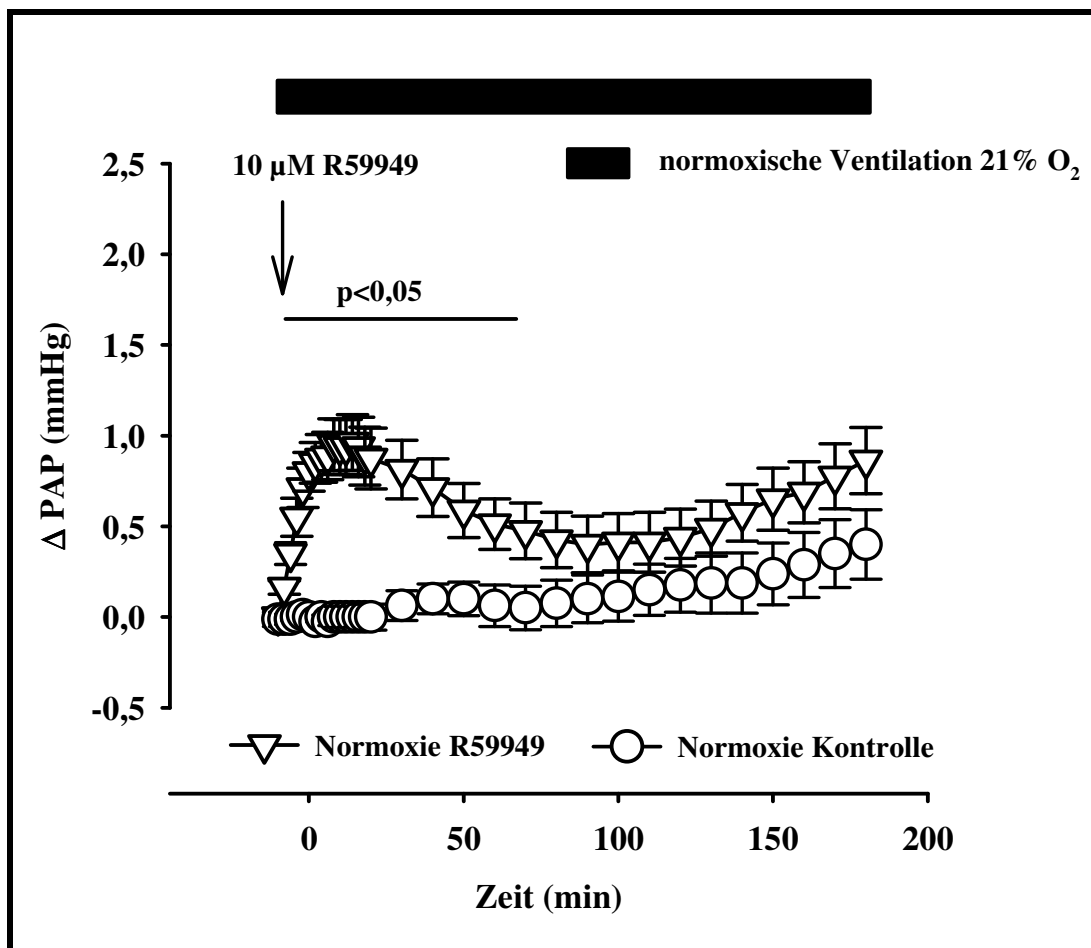


Abb. 3.17: Einfluss von R59949 auf den normoxischen PAP bei einmaliger Gabe, jeweils $n=8$. Der Balken markiert einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Normoxie-Kurven.

Inhibitors in das Perfusateservoir zu beobachten, dem ein Abfall und daraufhin ein langsamer, verzögerter Anstieg des PAP folgt.

3.3 HO-2 und spannungsabhängiger Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanal (B_K) als möglicher O_2 -Sensorkomplex

3.3.1 Akute und protrahierte Phase der HPV im Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge

Der Einsatz transgener Tiere im Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge zeigte bei der dreistündigen hypoxischen Beatmung keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Knockouttieren und den dazugehörigen Wildtypkontrolltieren im Verlauf der HPV (s. Abb. 3.18 und Abb. 3.19).

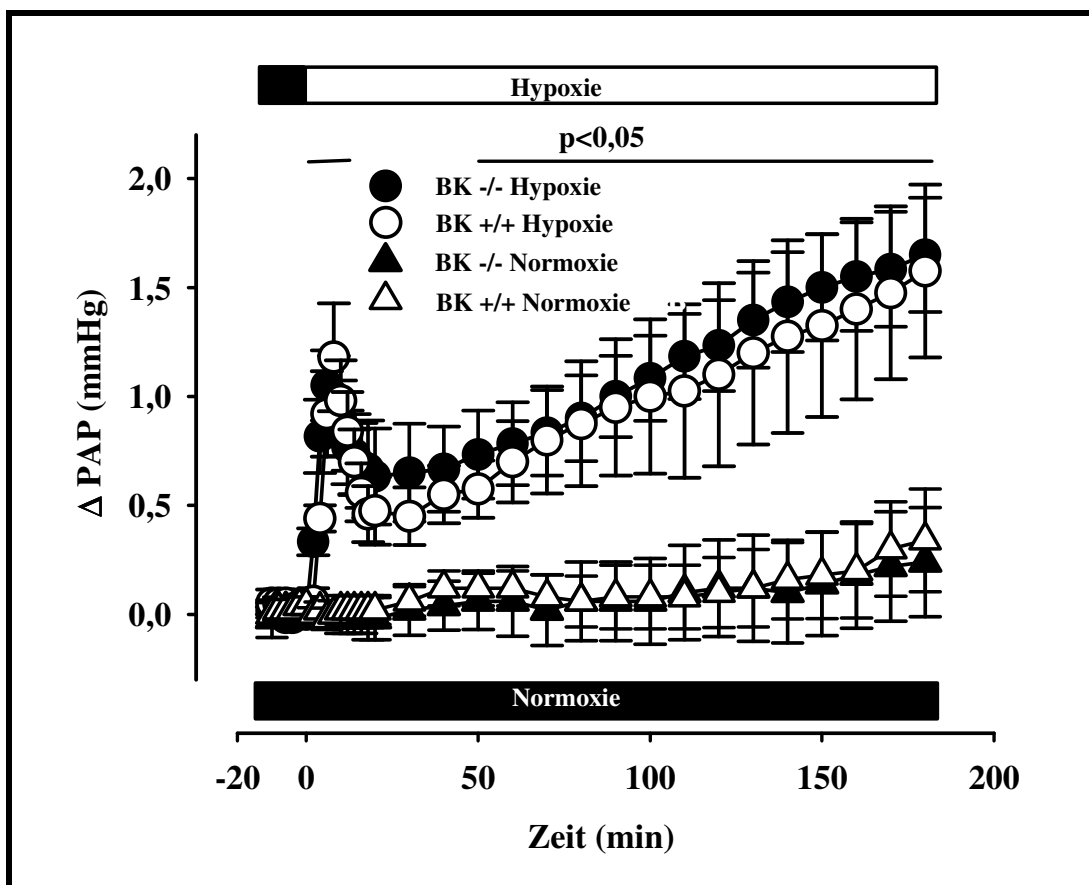


Abb. 3.18: Akute und protrahierte Phase der HPV in $\text{B}_\text{K}^{-/-}$ und $\text{B}_\text{K}^{+/+}$ Mäusen. Der Balken markiert statistisch signifikante Unterschiede zwischen hypoxisch beatmeten $\text{B}_\text{K}^{-/-}$ (ausgefüllte Kreise, $n=6$) und normoxisch beatmeten $\text{B}_\text{K}^{-/-}$ Lungen (ausgefüllte Dreiecke, $n=5$), ebenso zwischen hypoxisch beatmeten $\text{B}_\text{K}^{+/+}$ Lungen (offene Kreise, $n=4$) und normoxisch beatmeten $\text{B}_\text{K}^{+/+}$ Lungen (offene Dreiecke, $n=5$) ($p<0,05$).

Der für die HPV typische Verlauf mit einem akuten Druckanstieg, einem darauf folgenden Druckabfall und einem allmählichen, verzögerten Druckanstieg nach etwa einer Stunde wurde bei beiden Knockout-Linien und den dazugehörigen Kontrollen registriert. $\text{B}_\text{K}^{-/-}$ Mäuse zeigten zu Beginn der HPV einen Anstieg des PAP um

1,1±0,2 mmHg gegenüber den nicht genetisch manipulierten Kontrolltieren, bei welchen ein Maximum der akuten HPV von 1,3±0,3 mmHg beobachtet werden konnte. Das zweite Maximum der HPV war in beiden Versuchsgruppen am Ende der dreistündigen hypoxischen Beatmungphase erreicht ($B_K^{-/-}$: 1,7±0,3 mmHg vs. $B_K^{+/+}$: 1,7±0,4 mmHg). Weder während der akuten Phase der HPV, noch in der protrahierten Phase konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen $B_K^{-/-}$ und $B_K^{+/+}$ Tieren festgestellt werden (Abb. 3.18).

HO-2^{-/-} Tiere waren ebenfalls im Verlauf der HPV nicht von den HO-2^{+/+} Tieren zu unterscheiden. Das erste Maximum war auch hier innerhalb der ersten 10 min erreicht (HO-2^{-/-}: 1,1±0,2 mmHg vs. HO-2^{+/+}: 1,1±0,2 mmHg).

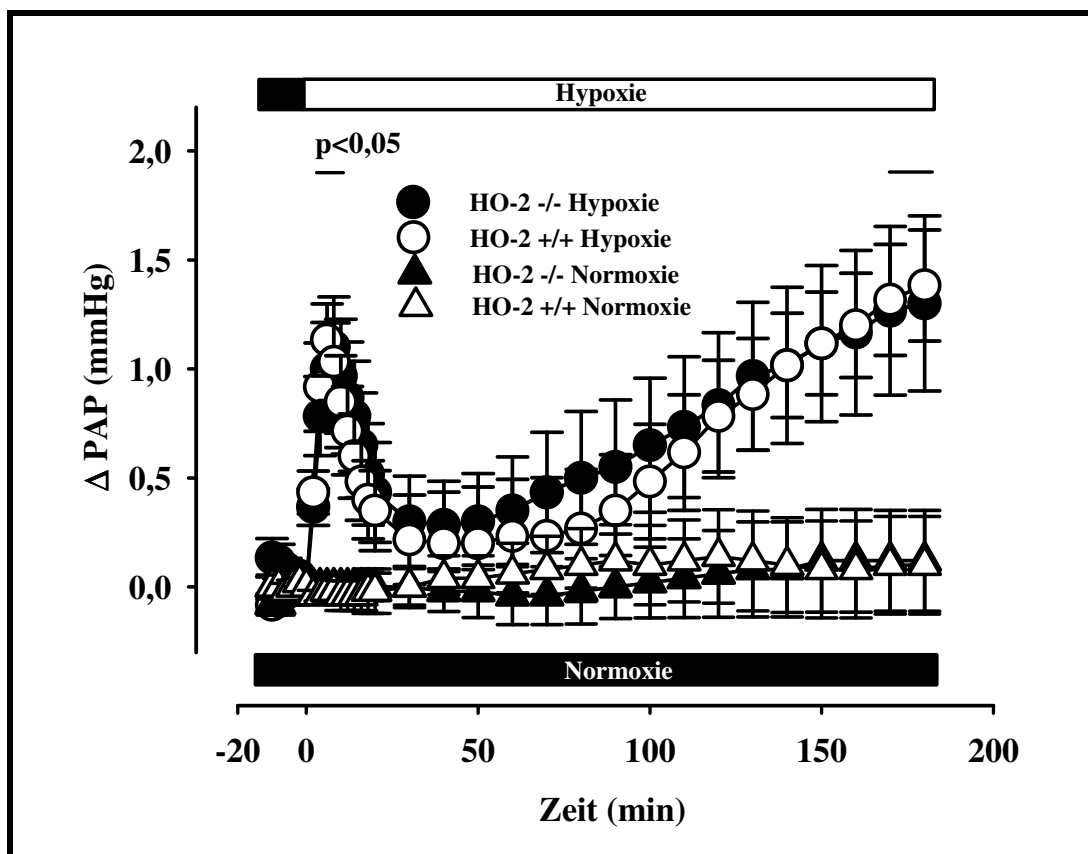


Abb. 3.19: Akute und protrahierte Phase der HPV in HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäusen. Der Balken markiert statistisch signifikante Unterschiede zwischen hypoxisch beatmeten HO-2^{-/-} (ausgefüllte Kreise, n=6) und normoxisch beatmeten HO-2^{-/-} Lungen (ausgefüllte Dreiecke, n=5), ebenso zwischen hypoxisch beatmeten HO-2^{+/+} (offene Kreise, n=5) und normoxisch beatmeten HO-2^{+/+} Lungen (offene Dreiecke, n=5) ($p<0,05$).

Der Verlauf der protrahierten Phase der HPV in den HO-2^{-/-} Tieren unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von dem der HO-2^{+/+} Mäuse. Auch hier war gegen Ende der hypoxischen Ventilation nach 3 Stunden das Maximum der protrahierten Phase der HPV erreicht (HO-2^{-/-}: 1,3±0,4 mmHg vs. HO-2^{+/+}: 1,4±0,3 mmHg) (Abb. 3.19).

Neben der Tatsache, dass sich sowohl bei B_K -Kanal als auch bei HO-2 defizienten Tieren der Verlauf der akuten und protrahierten Phase der HPV nicht von den dazugehörigen Wildtypkontrollen unterschied, konnte auch festgestellt werden, dass keine signifikante Differenz der normoxischen PAP-Werte vor Beginn der hypoxischen Beatmung in beiden Knockoutlinien verglichen mit den Wildtypkontrollen bestand ($B_K^{-/-}$: $8,8 \pm 0,5$ mmHg; $B_K^{+/+}$: $8,4 \pm 0,1$ mmHg; HO-2 $^{-/-}$: $9,0 \pm 0,2$ mmHg; HO-2 $^{+/+}$: $9,0 \pm 0,2$ mmHg). Die mit normoxischem Beatmungsgas ventilerten Organe der $B_K^{-/-}$ und HO-2 $^{-/-}$ Tiere zeigten ebenfalls keine besonderen Druckverläufe des normoxischen PAP verglichen mit den Wildtypkontrollgruppen.

3.3.2 Vasoreaktion auf Hypoxie und Thromboxananalogon U46619

Neben den Versuchen, deren Ergebnisse in 3.3.1 dargestellt sind, wurde die akute Phase der HPV mit der Vasokonstriktion, die durch U46619 induziert werden kann, verglichen.

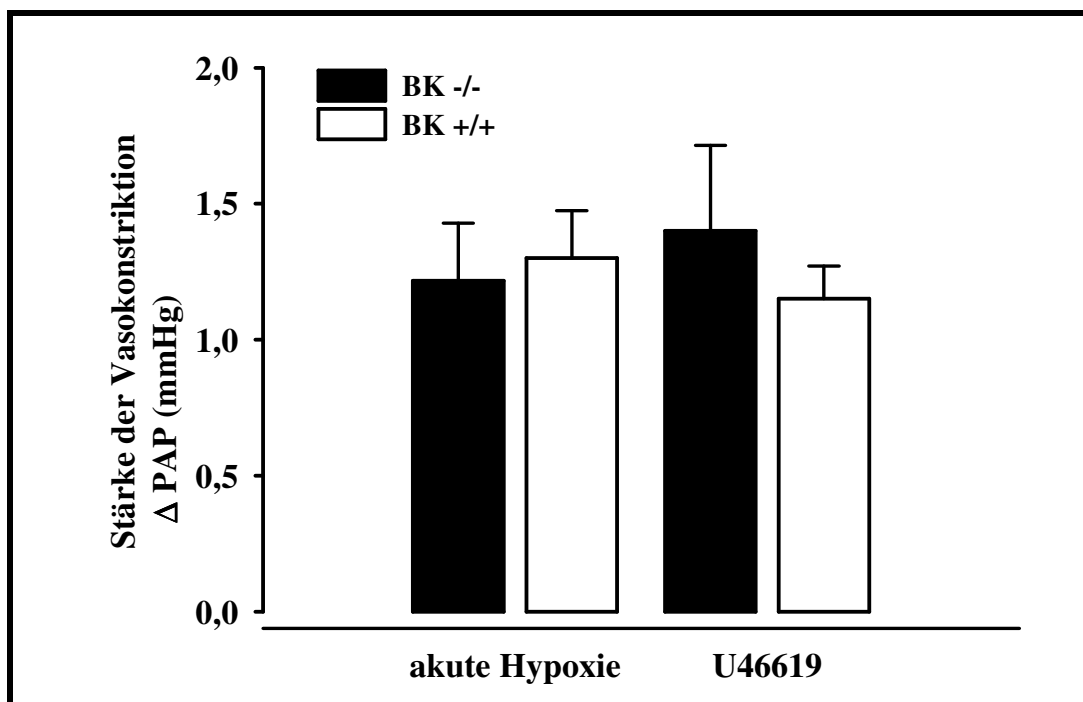


Abb. 3.20: Vergleich der Vasokonstriktion in $B_K^{-/-}$ und $B_K^{+/+}$ Mäusen auf Hypoxie und U46619, jeweils n=5.

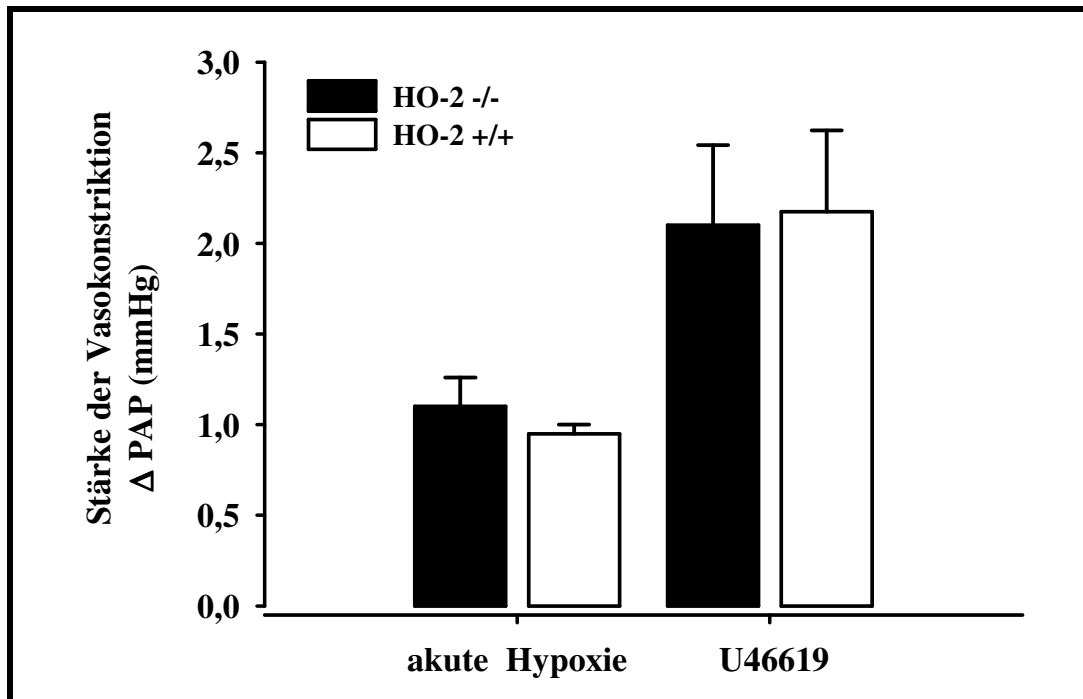


Abb. 3.21: Vergleich der Vasokonstriktion in HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäusen auf Hypoxie und U46619, HO-2^{-/-} n=5, HO-2^{+/+} Kontrollen n=4.

Wie in Abb.3.20 und Abb. 3.21 ersichtlich, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Vasokonstriktionen, die durch Hypoxie oder das Thromboxananalogon U46619 in B_K^{-/-} und B_K^{+/+} Mäusen bzw. in HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäusen induziert wurden.

3.3.3 Invasive Bestimmung des rechtsventrikulären Blutdrucks

Die dreiwöchige Exposition der Versuchstiere in 10,0 % O₂ führte sowohl bei B_K^{-/-} als auch bei B_K^{+/+} Mäusen zu einem signifikanten Anstieg des RVSP (B_K^{-/-}: 30,8±1,1 mmHg; B_K^{+/+}: 30,2±1,2 mmHg) gegenüber dem RVSP der in Normoxie (21,0 % O₂) gehaltenen Tiere (B_K^{-/-}: 25,3±1 mmHg; B_K^{+/+}: 25,2±1,4 mmHg). Es bestand jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den B_K^{+/+} und B_K^{-/-} Tieren in Normoxie und Hypoxie (s. Abb. 3.22). Betrachtet man HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäuse so zeigte sich sowohl für HO-2^{-/-} als auch für HO-2^{+/+} Tiere nach dreiwöchiger Behandlung in 10,0 % O₂ ein signifikanter Anstieg des RVSP (Normoxie: HO-2^{-/-}: 23,5±1,6 mmHg; HO-2^{+/+}: 23,8±2,1 mmHg; Hypoxie: HO-2^{-/-}: 33,7±1,7 mmHg; HO-2^{+/+}: 34,3±3,7 mmHg) (s. Abb. 3.23).

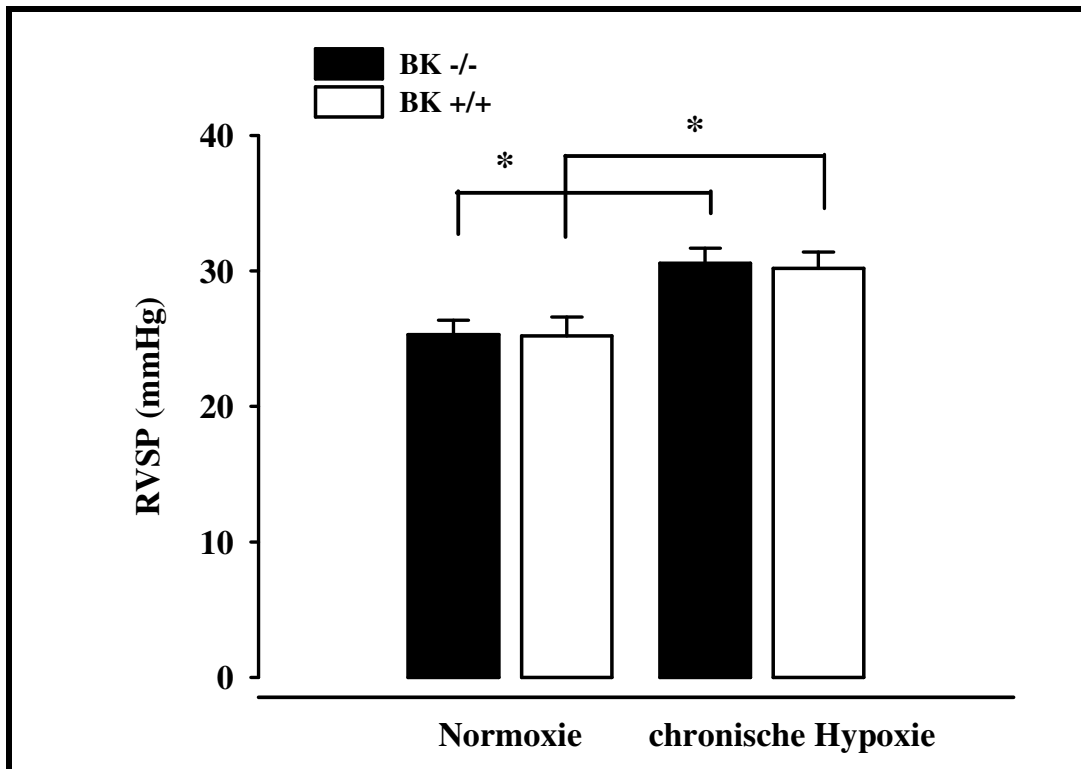


Abb. 3.22: RVSP in $B_K^{-/-}$ und $B_K^{+/+}$ Mäusen nach dreiwöchiger Behandlung in 10,0 % O_2 . $B_K^{-/-}$ in Normoxie $n=11$, in Hypoxie $B_K^{-/-}$ $n=7$. $B_K^{+/+}$ in Normoxie $n=12$, in Hypoxie $n=6$. * markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen $B_K^{-/-}$ Mäusen in chronischer Hypoxie vs. Normoxie respektive $B_K^{+/+}$ Mäusen in chronischer Hypoxie vs. Normoxie (*: $p<0,05$).

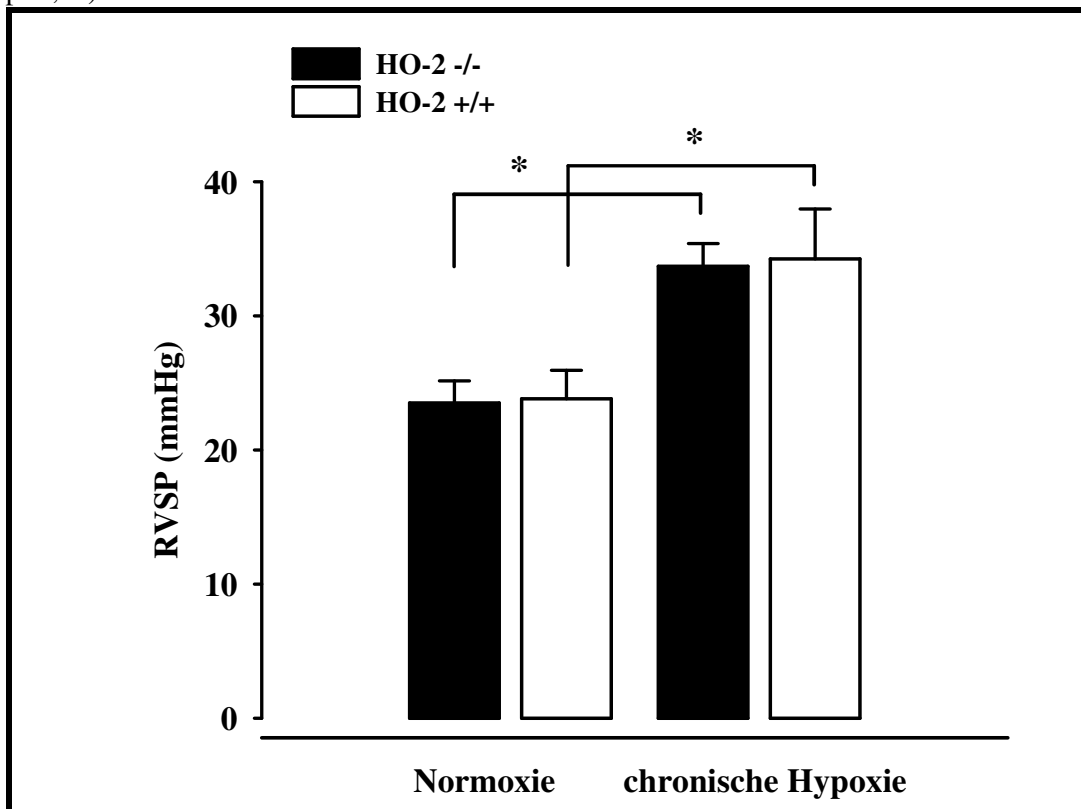


Abb. 3.23: RVSP in $HO-2^{-/-}$ und $HO-2^{+/+}$ Mäusen nach dreiwöchiger Behandlung in 10,0 % O_2 . $HO-2^{+/+}$ in Normoxie $n=4$, in Hypoxie $n=5$, $HO-2^{-/-}$ in Normoxie $n=5$, in chronischer

Hypoxie n=6. * markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen HO-2^{-/-} Mäusen in chronischer Hypoxie vs. Normoxie respektive HO-2^{+/+} Mäusen in chronischer Hypoxie vs. Normoxie (*: p<0,05).

Innerhalb der normoxischen und hypoxischen Gruppen waren die Ergebnisse bei den HO-2 defizienten Tieren wie auch bei den B_K-defizienten Tieren nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den unter gleichen Bedingungen gehaltenen B_K^{+/+} und HO-2^{+/+} Kontrollgruppen (s. Abb. 3.22, Abb. 3.23).

3.3.4 Bestimmung des Hämatokrit

Die Bestimmung des Hämatokrit ergab bei allen in dreiwöchiger Hypoxie gehaltenen Tieren eine signifikante Erhöhung desselben im Vergleich zu dem Hämatokrit der in Normoxie gehaltenen Tiere. Es bestand jedoch sowohl kein signifikanter Unterschied zwischen in chronischer Hypoxie gehaltenen B_K^{-/-} Mäusen (67±1,6 %) und B_K^{+/+} Mäusen (65±2,4 %) als auch im Vergleich der in Hypoxie gehaltenen HO-2 Mäuse untereinander (HO-2^{-/-}:50±1 %; HO-2^{+/+}:50±2 %) (s. Abb. 3.24 und Abb. 3.25).

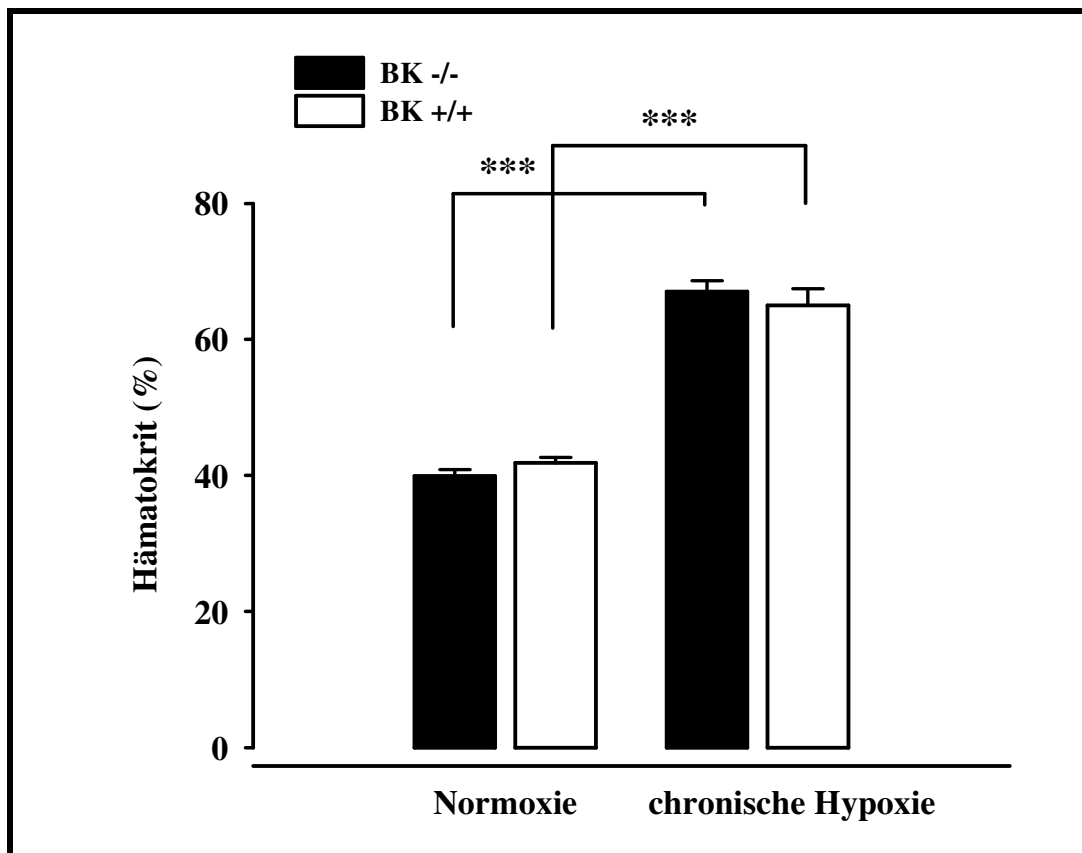


Abb. 3.24: Hämatokrit in B_K^{-/-} und B_K^{+/+} Mäusen in chronischer Hypoxie und Normoxie. B_K^{-/-} in chronischer Hypoxie n=7, in Normoxie n=12. B_K^{+/+} in chronischer Hypoxie n=6, in Normoxie n=11. * markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit Linien verbundenen Versuchsgruppen (***: p<0,001).

Um auszuschließen, dass das Fehlen von HO-2 bzw. B_K-Kanälen eventuell einen Einfluss auf den Hämatokrit unter normoxischen Bedingungen hat, wurde auch der Hämatokrit bei normoxisch gehaltenen Tiere verglichen. In den Normoxieversuchen mit B_K^{-/-} und B_K^{+/+} Mäusen konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden normoxischen Gruppen festgestellt werden (B_K^{-/-}: 39,9±1 %, B_K^{+/+}: 41,8±0,8 %). Es zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied des Hämatokrits zwischen HO-2 defizienten Mäusen verglichen mit HO-2^{+/+} Mäusen unter normoxischen Bedingungen (HO-2^{-/-}: 38±1 %, HO-2^{+/+}: 40±1 %) (s. Abb. 3.24 und Abb. 3.25).

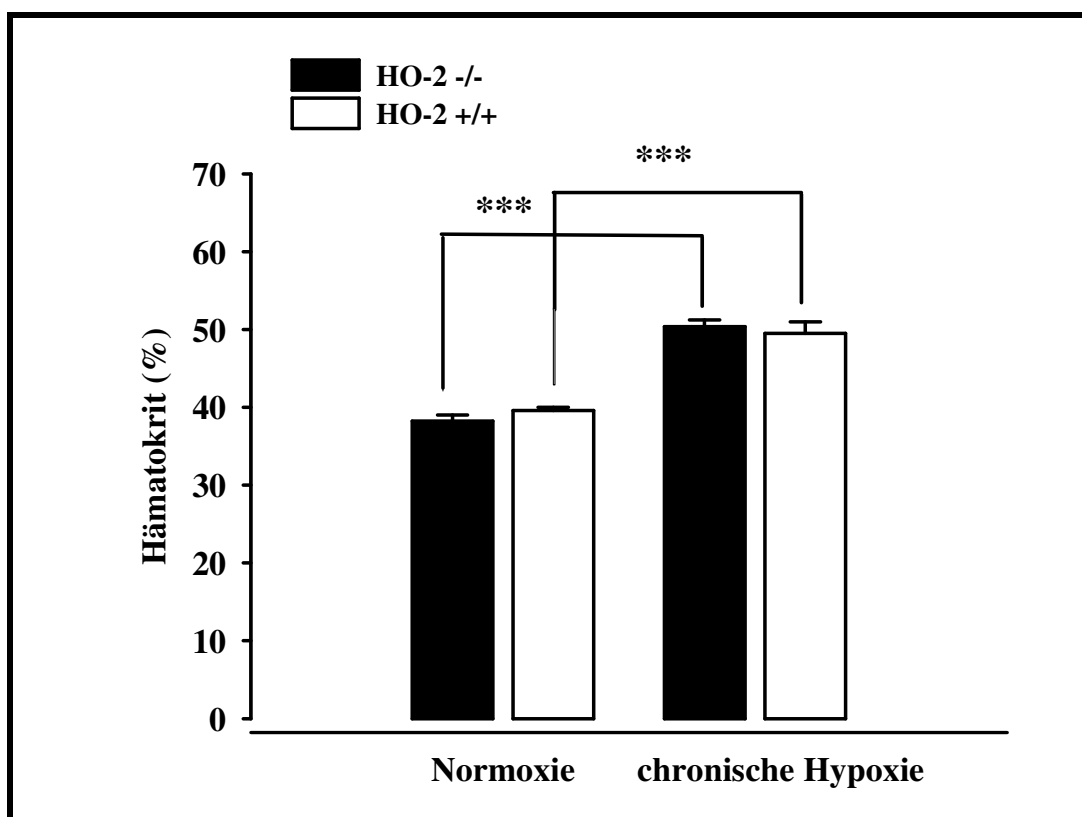


Abb. 3.25: Hämatokrit in HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäusen in chronischer Hypoxie und Normoxie. Chronische Hypoxie: HO-2^{-/-} n=5, HO-2^{+/+} n=4. Normoxie: HO-2^{-/-} n=4, HO-2^{+/+} n=5. * markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit Linien verbundenen Versuchsgruppen (***: p<0,001).

3.3.5 Bestimmung des Verhältnisses der Masse des rechten Ventrikels zur Masse des linken Ventrikels plus Septum (RV/(LV+S)) als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Die B_K^{-/-} Mäuse entwickelten nach dreiwöchiger Haltung in 10,0 % Sauerstoff eine Rechtsherzhypertrophie als Folge erhöhter intrapulmonaler Drücke. Die Ratio des Trockengewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum

(RV/(LV+S)) erhöhte sich von $0,3 \pm 0,02$ bei unter Normoxie gehaltenen $B_K^{-/-}$ Tieren auf $0,44 \pm 0,01$. Die Kontrollgruppen der $B_K^{+/+}$ Mäuse zeigten ebenso nach dreiwöchiger Hypoxie eine deutliche Rechtsherzhypertrophie ($0,48 \pm 0,02$) gegenüber den in Normoxie gehaltenen Tieren ($0,3 \pm 0,02$) (Abb. 3.26).

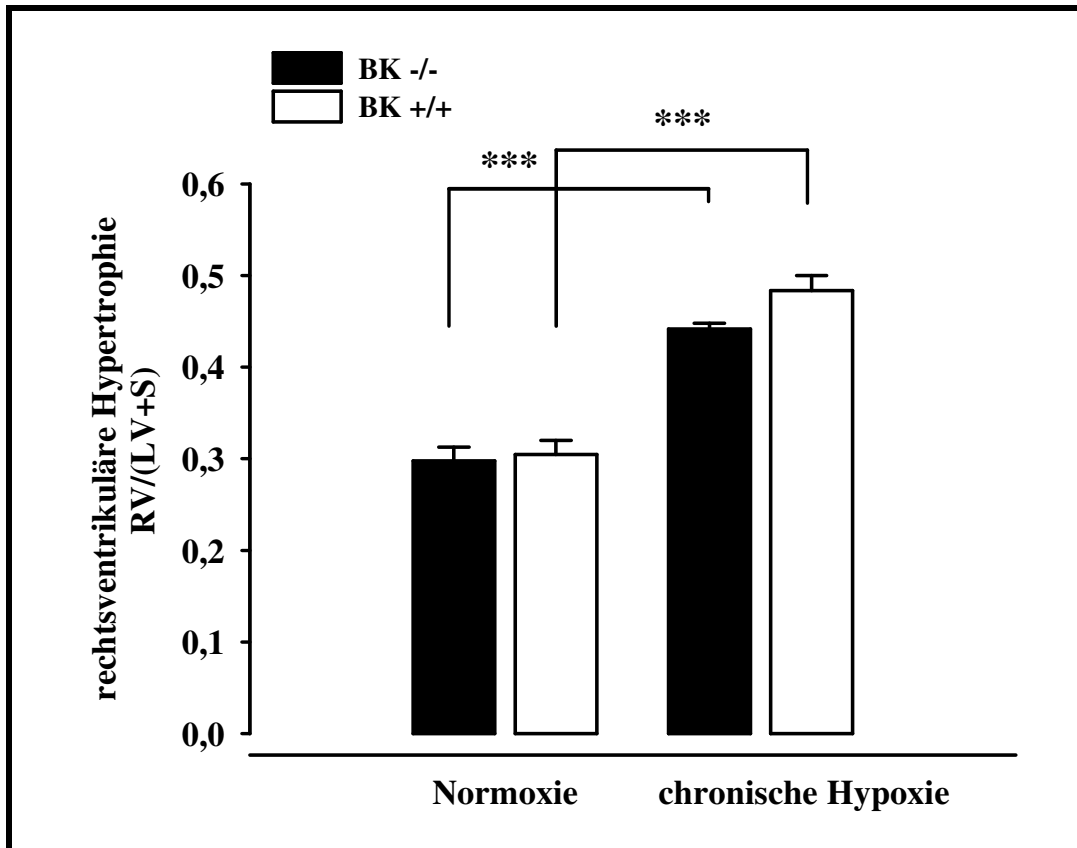


Abb. 3.26: Rechtsventrikuläre Hypertrophie (RV/(LV+S)) von $B_K^{-/-}$ und $B_K^{+/+}$ Mäusen nach dreiwöchiger Hypoxie. Normoxie $B_K^{-/-}$ und $B_K^{+/+}$ jeweils $n=10$, Hypoxie $B_K^{-/-}$ $n=6$, $B_K^{+/+}$ $n=7$. * markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit Linien verbundenen Versuchsgruppen; (***: $p < 0,001$).

Eine im Wesentlichen entsprechende, kardiale Anpassung an die durch Hypoxie veränderten Druck- respektive Widerstandsverhältnisse im pulmonalen Gefäßgebiet erfolgte bei den HO-2 Mäusen. HO-2^{-/-} Mäuse entwickelten unter 21 Tage dauernder hypoxischer Haltung eine Ratio (RV/(LV+S)) von $0,52 \pm 0,03$, HO-2^{+/+} Mäuse eine Ratio von $0,45 \pm 0,04$. Bei in Normalbedingungen gehaltenen HO-2 Tieren lagen die Ratios dagegen bei $0,32 \pm 0,01$ (HO-2^{-/-}) und $0,33 \pm 0,01$ (HO-2^{+/+}) (s. Abb. 3.27).

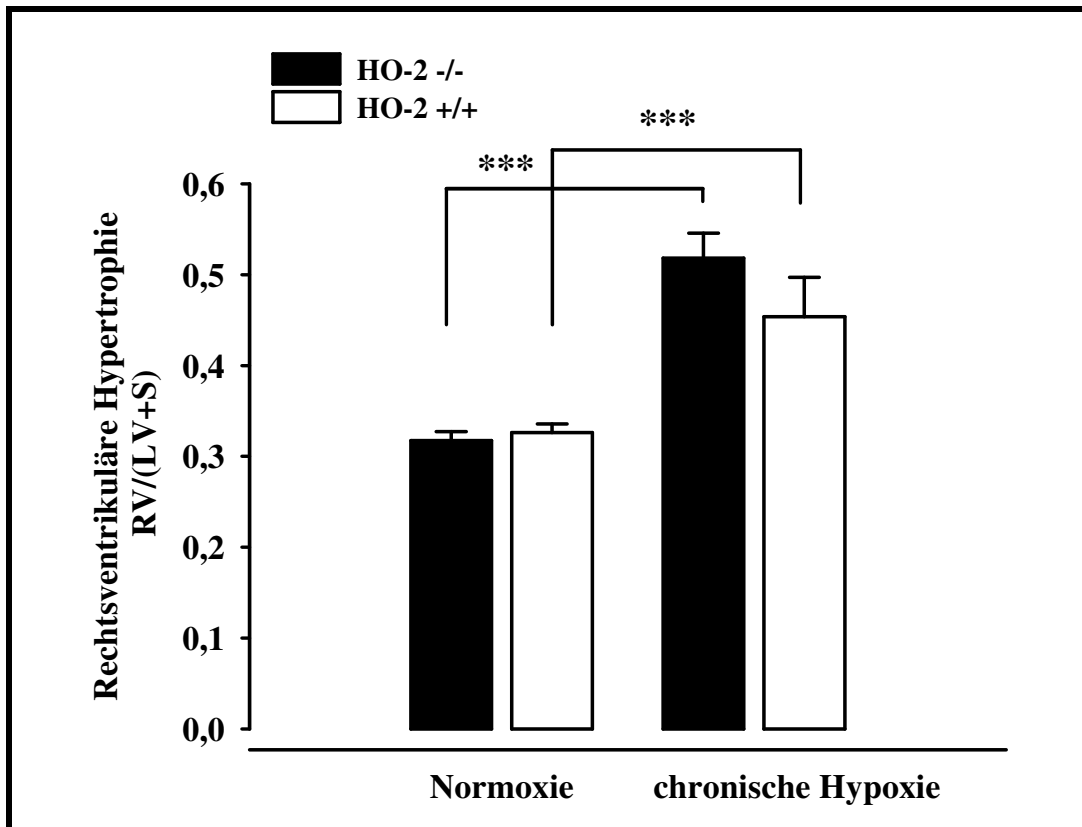


Abb. 3.27: Rechtsventrikuläre Hypertrophie (RV/(LV+S)) von HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäusen nach dreiwöchiger Hypoxie. Normoxie HO-2^{-/-} n=6 und HO-2^{+/+} n=4, Hypoxie HO-2^{-/-} n=6, HO-2^{+/+} n=4. * markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit Linien verbundenen Versuchsgruppen; (**: p<0,01; ***: p<0,001).

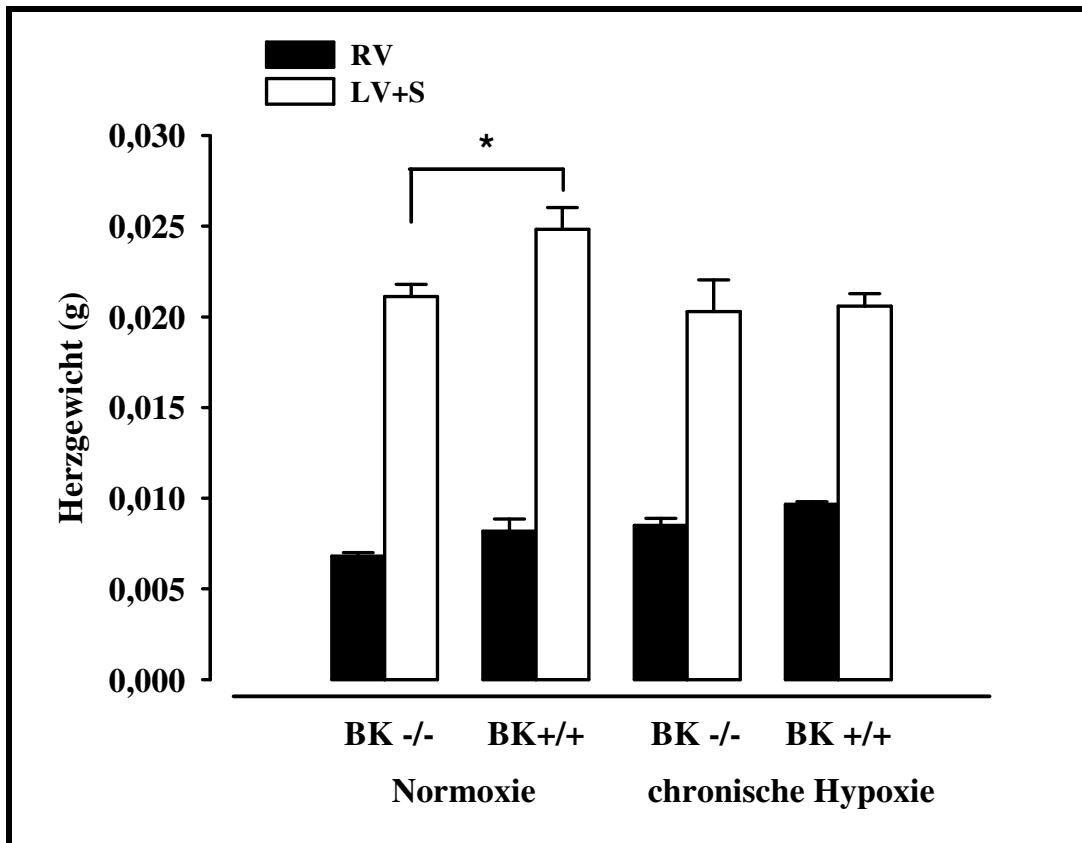


Abb. 3.28: Herzgewichte von BK^{-/-} respektive BK^{+/+} Mäusen nach dreiwöchiger Hypoxie und Normoxie. Normoxie BK^{-/-} und BK^{+/+} jeweils n=10, Hypoxie BK^{-/-} n=6, BK^{+/+} n=7.

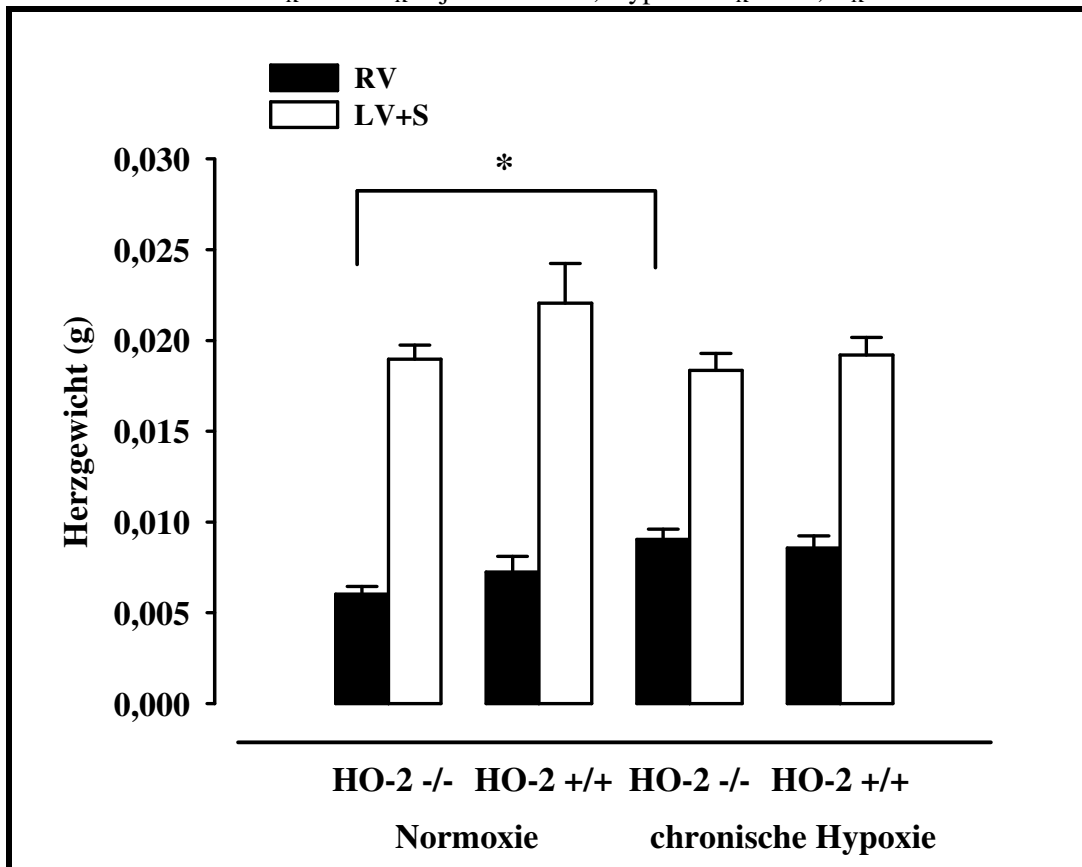


Abb. 3.29: Herzgewichte von HO-2^{-/-} respektive HO-2^{+/+} Mäusen nach dreiwöchiger

Hypoxie und Normoxie. Normoxie HO-2^{-/-} n=6 und HO-2^{+/+} n=5, Hypoxie HO-2^{-/-} n=6, HO-2^{+/+} n=4. Das * markiert einen statistisch signifikanten Unterschied der RV-Gewichte der HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäuse unter Normoxie, p<0,05.

Zusätzlich sind die absoluten Gewichte von RV und (LV+S) dargestellt (s. Abb. 3.28 und Abb. 3.29 oben).

Hier zeigte sich, dass die Gewichte des linken Ventrikels und Septums (LV+S) bei B_K- und HO-2^{-/-} und ^{+/+} Tieren durch Hypoxie nicht beeinflusst wurden und somit die Erhöhungen des Verhältnisses der Masse des rechten Ventrikels zu der Masse des linken Ventrikels plus Septum unter Hypoxie durch eine rechtsventrikuläre Hypertrophie zustande kamen.

3.3.6 Morphometrische Analyse der Lungengefäße – Muskularisierungsgrad

Nach Haltung der Versuchstiere in Hypoxiekammern für einen Zeitraum von 3 Wochen zeigte sich eine verstärkte Muskularisierung der Lungengefäße.

3.3.6.1 Immunhistochemische Doppelfärbung

Um den Muskularisierungsgrad pulmonaler Gefäße sichtbar zu machen und im weiteren quantitativ bestimmen zu können, wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung gegen glattmuskuläres alpha-Aktin und endothelialen von-Willebrand-Faktor vorgenommen (s. Abb 3.30).

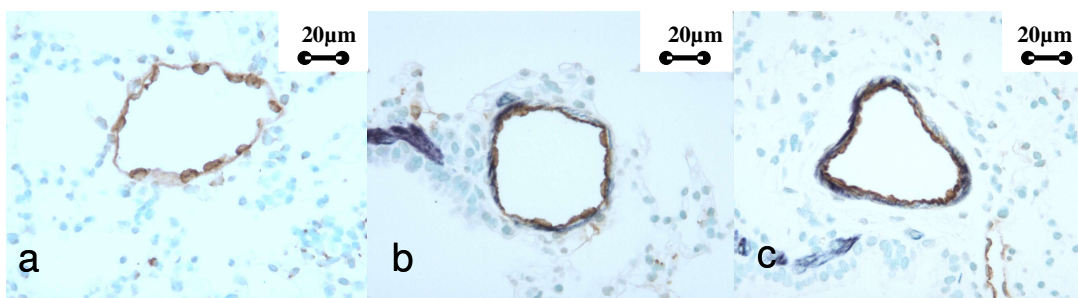


Abb. 3.30: Immunhistochemische Doppelfärbung peripherer Pulmonalarterien gegen von-Willebrand-Faktor (braun) und glattmuskuläres alpha Aktin (violett). In normoxischen B_K^{-/-} Mäusen sind die kleinen peripheren Pulmonalarterien nicht (a) oder nur teilweise (b) muskularisiert. Im Verlaufe der Progression der pulmonalen Hypertonie unter chronischer Hypoxie erfolgte eine starke Zunahme der Muskularisierung, (c) vollmuskularisiert.

3.3.6.2 Prozentualer Anteil voll, partiell und nicht muskularisierter Gefäße

Der Muskularisierungsgrad von intraazinären Gefäßen wurde der Größe nach quantifiziert.

Es wurden intraazinäre Gefäße von 20 bis 70 μm externem Gefäßdurchmesser betrachtet.

Bei diesen Gefäßen war sowohl bei den $B_K^{-/-}$ als auch bei den $B_K^{+/+}$ Mäusen unter chronischer Hypoxie der Anteil der vollmuskularisierten Gefäßen signifikant höher als bei $B_K^{-/-}$ und $B_K^{+/+}$ Mäusen, die zur Kontrolle unter Normoxie gehalten wurden. Es zeigte sich, dass der Anteil der vollmuskularisierten Gefäße bei $B_K^{+/+}$ und $B_K^{-/-}$ Mäusen jeweils um mehr als 22 % zunahm. Auch der Anteil der partiell muskularisierten Gefäße stieg bei Knockout- und Wildtyp-Tieren um jeweils mehr als 14 % in chronischer Hypoxie an. Dagegen nahm der Anteil nicht muskularisierter Gefäße in den in Hypoxie gehaltenen Tieren signifikant ab (Abb. 3.31 und Tab. 3.2).

In etwa identische Ergebnisse ergab die Untersuchung der $HO-2^{-/-}$ und $HO-2^{+/+}$ Tiere samt deren normoxischen Kontrollen. Hier war bei $HO-2^{-/-}$ und $HO-2^{+/+}$ Tieren, die in chronischer Hypoxie gehalten wurden, mehr als 45 % der Gefäße voll muskularisiert, während hingegen in Normoxie lediglich etwa 9 % der kleinen Gefäße vollmuskularisiert waren. Dagegen nahm der Anteil der nicht muskularisierten Gefäße in beiden Versuchsgruppen, $HO-2^{-/-}$ und $HO-2^{+/+}$, von über 65 % bei Normoxie auf unter 10 % bei Hypoxie ab (s. Abb. 3.32 und Tab. 3.3).

Wie auch bei den B_K Mäusen bestand bei den $HO-2$ Tieren im Vergleich der transgenen Versuchsgruppen zu deren Kontrollgruppen in Normoxie und chronischer Hypoxie in allen drei verschiedenen Gruppierungen der Gefäße, nämlich voll, partiell und nicht muskularisiert, kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 3.31, Abb. 3.32, Tab. 3.2 und Tab. 3.3).

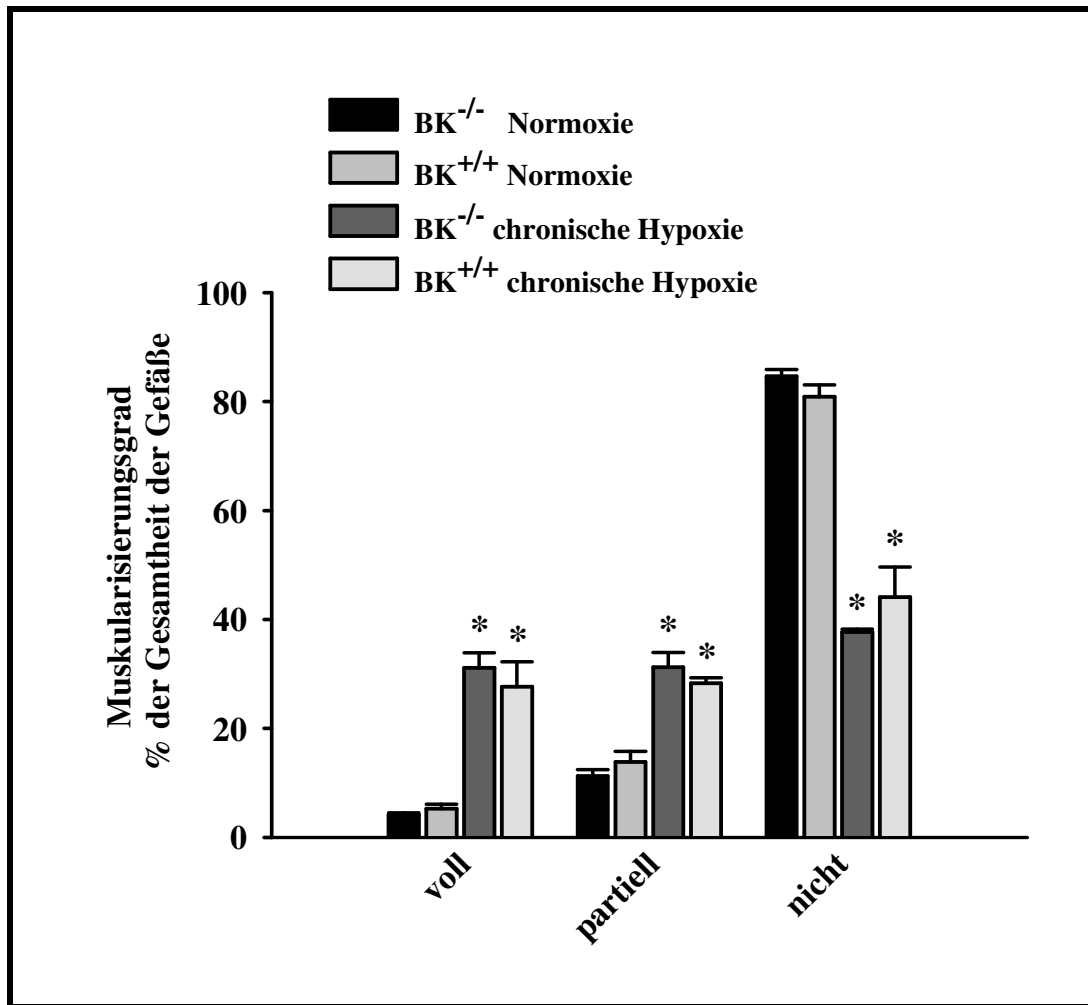


Abb. 3.31: Pulmonalarterieller Muskularisierungsgrad in $B_K^{-/-}$ und $B_K^{+/+}$ Mäusen. Gefäße zwischen 20 und 70 μm . $B_K^{-/-}$ und $B_K^{+/+}$ in Normoxie je $n=7$, in chronischer Hypoxie je $n=4$. * markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den in Hypoxie gehaltenen $B_K^{-/-}$ und $B_K^{+/+}$ Mäusen und den Normoxiekontrollen (*: $p<0,05$).

Tiere	Muskularisierungsgrad, Gefäße 20-70 μm (%)		
	Voll	partiell	nicht
$B_K^{-/-}$ Normoxie	4,1 $\pm$ 0,4	11,3 $\pm$ 1,1	84,6 $\pm$ 1,2
$B_K^{+/+}$ Normoxie	5,3 $\pm$ 0,8	13,8 $\pm$ 2,0	80,9 $\pm$ 2,2
$B_K^{-/-}$ chronische Hypoxie	31,1 $\pm$ 2,8	31,3 $\pm$ 2,7	37,7 $\pm$ 0,5
$B_K^{+/+}$ chronische Hypoxie	27,7 $\pm$ 4,6	28,3 $\pm$ 1,0	44,1 $\pm$ 5,6

Tab. 3.2: Pulmonalarterieller Muskularisierungsgrad in $B_K^{+/+}$ und $B_K^{-/-}$ Mäusen. Gefäße zwischen 20 und 70 μm . n-Zahlen und statistisch signifikante Unterschiede siehe dazugehörige Abb. 3.31.

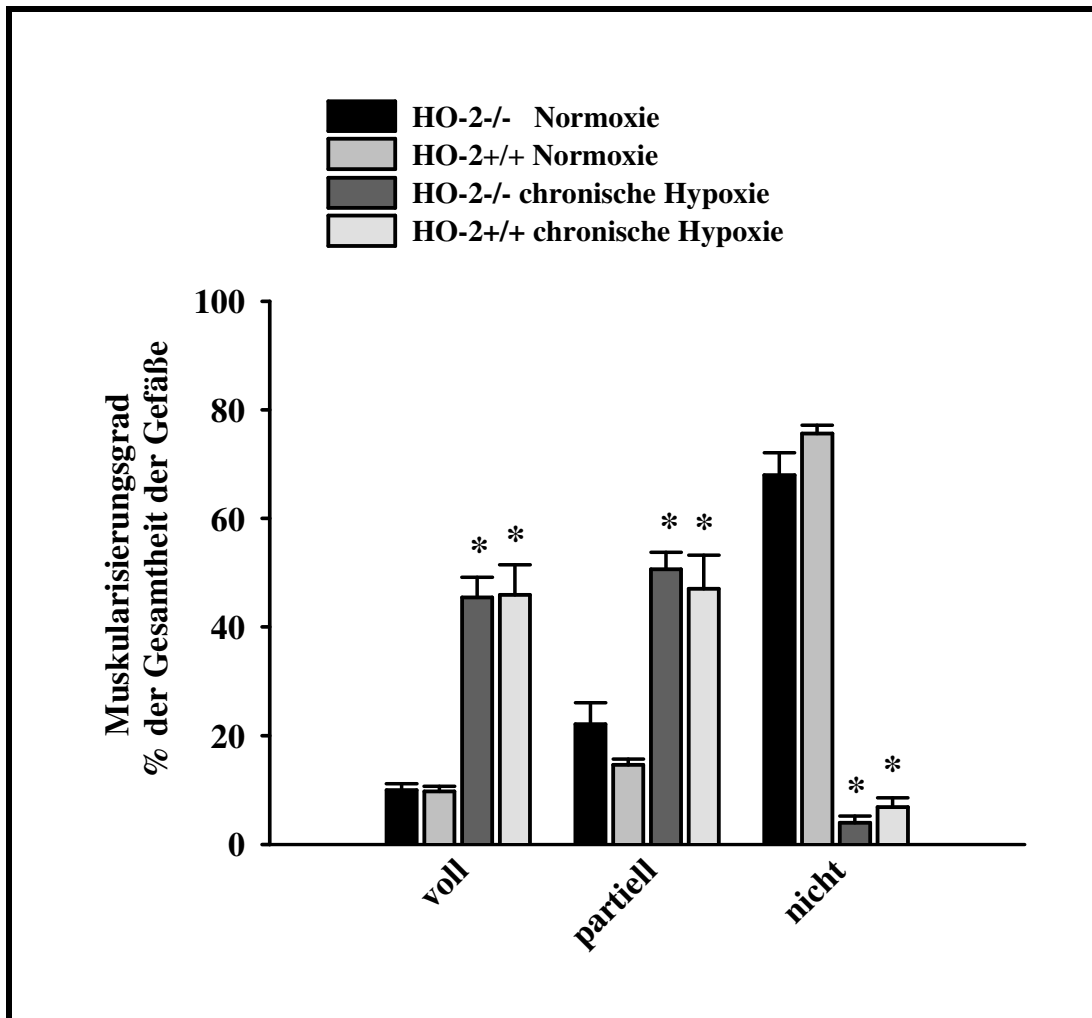


Abb. 3.32: Pulmonalarterieller Muskularisierungsgrad in HO-2^{+/+} und HO-2^{-/-} Mäusen. Gefäße zwischen 20 und 70 μ m. HO-2^{-/-} in Normoxie n=12, in chronischer Hypoxie n=6, HO-2^{+/+} in Normoxie n=7, in chronischer Hypoxie n=4. * markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den in Hypoxie gehaltenen HO-2^{+/+} und HO-2^{-/-} Mäusen und den Normoxiekontrollen (*: p<0,05).

Tiere	Muskularisierungsgrad, Gefäße 20-70 μ m (%)		
	Voll	Partiell	nicht
HO-2 ^{-/-} Normoxie	9,9 $\pm$ 1,2	22,1 $\pm$ 3,9	67,9 $\pm$ 4,1
HO-2 ^{+/+} Normoxie	9,7 $\pm$ 0,9	14,6 $\pm$ 1,1	75,6 $\pm$ 1,6
HO-2 ^{-/-} chronische Hypoxie	45,4 $\pm$ 3,7	50,6 $\pm$ 3,2	4,0 $\pm$ 1,3
HO-2 ^{+/+} chronische Hypoxie	45,9 $\pm$ 5,5	47,0 $\pm$ 6,2	6,9 $\pm$ 1,7

Tab. 3.3: Pulmonalarterieller Muskularisierungsgrad in HO-2^{+/+} und HO-2^{-/-} Mäusen. Gefäße zwischen 20 und 70 μ m. n-Zahlen siehe dazugehörige Abb. 3.32. Statistisch signifikante Unterschiede sind ebenfalls aus Abb. 3.32 zu entnehmen.

4. Diskussion

4.1 Pharmakologische Untersuchungen zum Einfluss des TRPC6-Aktivators DAG auf die akute Phase der HPV am Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge

Im isolierten, perfundierten und ventilierten Organ wurde die Bedeutung von DAG, einem Produkt der PLC und potenziellem Aktivator des für die akute HPV essenziellen TRPC6 Kanals, als Mediator der Signalkaskade der akuten HPV untersucht. Die Aktivierung des TRPC6-Kanals durch DAG konnte bisher durch verschiedene pharmakologische Substanzen beeinflusst werden^{19, 39}. Daher wurden im Rahmen dieser Dissertation im intakten Lungenpräparat R59949, ein DAG-Kinase-Inhibitor, der die Phosphorylierung von DAG zu Phosphatidsäure (PA) verhindert und so zu einer DAG Akkumulation führt, OAG, ein DAG-Analogon, und ein PLC-Inhibitor (U73122), der die DAG-Produktion der PLC verhindert, getestet, um den möglichen Aktivator des TRPC6-Kanals DAG als Mediator der Signalkaskade der akuten HPV zu identifizieren.

4.1.1 R59949

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit R59949 zeigten, dass der DAG-Kinase-Inhibitor R59949 die akute HPV dosisabhängig inhibierte. Dagegen war in den Kontrollversuchen mit U46619 keine Abnahme der Vasokonstriktion bei steigender R59949 Dosis zu beobachten, vielmehr fiel die Stärke der Vasokonstriktion signifikant höher aus als in den Kontrollgruppen (Abb. 3.1). Bei beiden Versuchsreihen wurde durch R59949 der normoxische PAP dosisabhängig erhöht (Abb. 3.3). Diese Ergebnisse indizierten, dass in den Effektorzellen der HPV, nämlich den PASMC, durch eine intrazelluläre DAG-Anreicherung der für die akute Phase der HPV essenzielle TRPC6-Kanal aktiviert wird und daher die HPV ausbleibt. Die Versuche mit dem Thromboxananalogon U46619 zeigten zum einen, dass durch R59949 eine selektive Hemmung der HPV im intakten Lungenpräparat möglich war, zum anderen, dass die ausbleibende Vasokonstriktion in den

Hypoxieversuchen nicht auf eine generellen Hemmung der glattmuskulären Kontraktilität beruhte, sondern unterschiedliche Signalwege für die HPV und die durch das vasokonstriktorisches Agens U46619 herbeigeführte Vasokonstriktion bestehen müssen.

Die daraufhin durchgeführten Versuche, bei denen die Gabe von KCl eine Vasokonstriktion induzierte, ergaben, dass R59949 – wie bei der HPV – schon bei der geringsten eingesetzten Konzentration die KCl-induzierte Vasokonstriktion signifikant inhibierte. Auch ein Anstieg des normoxischen PAP durch R59949 war hier zu beobachten (Abb. 3.2 und Abb. 3.3). Abgesehen von der Tatsache, dass die durch KCl herbeigeführte Vasokonstriktion bei höheren Dosen R59949 nicht wie die HPV vollständig zu inhibieren war, stellte diese weitere Untersuchung auf den ersten Blick eine Diskrepanz zu den Kontrollversuchen der U46619-Reihe dar. Eine extrazelluläre K^+ Erhöhung durch KCl-Gabe depolarisiert die Zellmembranen der PASMC unspezifisch und nicht wie U46619 über einen G-Protein gekoppelten Thromboxanrezeptor⁴². Daher ist anzunehmen, dass die KCl-Gabe direkt zu einer Aktivierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle (VOCC) führt und so eine Vasokonstriktion verursacht^{19, 67}. Eine Inhibition der KCl-induzierten Vasokonstriktion dagegen lässt darauf schließen, dass a.) der für die in PASMC stattfindende Vasokonstriktion benötigte Calciumeinstrom auf einem anderen Weg als die Calciumerhöhung durch den spezifischen Vasokonstriktor U46619 zustande kommt, b) KCl und Hypoxie zumindest hinsichtlich der $[Ca]_i$ -Erhöhung den gleichen Mechanismus besitzen könnten. Da KCl die Zellmembran depolarisiert, ist es nahe liegend, dass Calcium durch spannungsabhängige Calciumkanäle (VOCCs) bei KCl-Gabe in die Zellen strömt. Diese Annahme ist übereinstimmend mit der Beobachtung, dass der spezifische VOCC-Blocker Nicardipin in isolierten Lungen und PASMC die HPV nahezu vollständig inhibiert¹³⁷. Auch die Beobachtungen, dass L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blocker wie Verapamil oder SFK-525 die HPV hemmen und der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal Aktivator BAY K 8644 die HPV verstärkt, passen zu den vorliegenden Ergebnissen, unter der Bedingung, dass DAG und TRPC6 die Leitfähigkeit der für die HPV und KCl-induzierte Vasokonstriktion wichtigen VOCCs steuern^{66, 67, 120}. Ergebnisse, die zeigen, dass in einem TRPC6 Permeationsmodell Ca^{2+} nur ca. 4 % des Ionenflusses ausmacht, jedoch hauptsächlich Na^+ zur Membrandepolarisation beiträgt, sprechen ebenfalls für die Beteiligung eines spannungsabhängigen L-Typ-

Calciumkanals, der aufgrund der essenziellen Rolle von TRPC6 durch diesen möglicherweise gesteuert wird^{27, 112, 137}. Diese Überlegungen zur Aktivierung der VOCC sind kongruent mit den Beobachtungen, dass K_v -Kanäle nicht nur VOCC aktivieren können, sondern auch durch einen Na^+ -Einstrom inhibiert werden, was eine Membrandepolarisation zur Folge hat^{8, 9, 31, 133}.

Da die U46619-Vasokonstriktion durch R59949 nicht wie die KCl-induzierte Vasokonstriktion respektive die HPV inhibiert wurde, kann vor diesem Hintergrund für U46619 ein anderer Mechanismus der $[Ca]_i$ -Erhöhung angenommen werden, der nicht über VOCC funktioniert und unabhängig von der DAG-Konzentration und der DAG-Kinase-Aktivität ist. Untersuchungen an humanen Mesenterialarterien, die zeigen, dass die U46619-Vasokonstriktion durch Inhibitoren von speicher-gesteuerte Ca^{2+} -Kanälen (SOCC) gehemmt werden konnte, unterstreichen die Ergebnisse, die durch die DAG-Kinase-Inhibition mit R59949 erzielt worden sind³⁸.

All diese Überlegungen stehen auch nicht im Widerspruch zu den Resultaten aus Untersuchungen zur Rolle der Proteinkinase C (PKC), die wie TRPC6 von DAG aktiviert wird. PKCs sind eine Gruppe von Isoenzymen, die durch DAG aktiviert werden und in der Lunge für Vasokonstriktion, Zellwachstum, Permeabilität, Apoptose etc. von Bedeutung sind¹⁷. In Kaninchenlungen wurde eine PKC-Aktivierung bei der akuten HPV festgestellt und eine Aktivierung von NADPH-Oxidasen durch PKC diskutiert¹⁴². PKC-defiziente Mäuse zeigten eine eingeschränkte HPV⁵⁷. Ebenso wurde eine Inhibition von TRPC3/4/5-Kanälen durch PKC in HEK293-Zellen nachgewiesen, für TRPC6 konnte jedoch kein solcher Nachweis erbracht werden^{26, 124, 142}. So liegt es nahe, dass DAG neben der Aktivierung von PKC als Bestandteil eines eventuellen Verstärkermechanismus der akuten HPV TRPC6 in PASMC direkt aktiviert und ebenfalls wie TRPC6 essenzieller Bestandteil in der Signalkaskade der akuten HPV ist^{39, 137}.

4.1.2 OAG

OAG führte bei allen Versuchsreihen, Hypoxie, U46619 und KCl, zu einer Erhöhung des normoxischen PAP (Abb. 3.7). Die akute HPV wurde durch OAG bei höheren Dosen zu über 75 % inhibiert, nachdem niedrigere Dosen OAG die akute HPV verstärkten (Abb. 3.4). Die U46619-induzierten Vasokonstriktionen wurden, wie schon bei den Versuchen mit R59949, durch OAG signifikant verstärkt (Abb. 3.5).

Dagegen wurden die Vasokonstriktionen, die durch KCl-Bolusgabe herbeigeführt wurden, ebenfalls verstärkt. Bei niedrigeren Dosen OAG war der Unterschied der KCl-Vasokonstriktionen mit OAG verglichen mit den Kontrollen zunächst signifikant, bei höheren Dosen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.6).

Die nur noch minimale Vasokonstriktion durch Hypoxie und die Erhöhung des normoxischen PAP nach OAG-Gabe implizieren, dass die akute HPV und die OAG-Effekte durch denselben Signalweg zustande kommen. Es kann daher angenommen werden, dass durch eine bereits stattgefundene TRPC6-Aktivierung durch OAG nur eine geringe akute HPV erreicht werden konnte. Diese Resultate decken sich mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen zur Wirkung des DAG-Kinase-Inhibitors R59949 und dessen Einfluss auf Hypoxie (Abb. 3.1). Die Beobachtung, dass OAG an PASMC von TRPC6^{-/-} Mäusen keine Erhöhung der Membranströme verursacht, dies jedoch an Zellen von TRPC6^{+/+} Tieren durchaus veranlasst, stimmt ferner mit den oben dargestellten Ergebnissen überein¹³⁷.

Dass die HPV spezifisch durch OAG-Gabe gehemmt wurde, konnte die verstärkte Wirkung der U46619 Stimuli bei zunehmender OAG-Konzentration zeigen. Hier wurde keine Verminderung der Vasokonstriktion beobachtet (Abb. 3.5). Dies legt nahe, dass OAG und deshalb auch DAG spezifisch für die Signalkaskade der akuten HPV sind und hierbei möglicherweise den für die akute HPV essenziellen TRPC6-Kanal aktivieren¹³⁷. Die deutliche OAG-dosisabhängige Erhöhung der durch U46619 induzierten Vasokonstriktion könnte über einen Verstärkermechanismus zustande kommen, bei dem DAG eine entscheidende Rolle spielt. Ob dafür die bekannte Steuerung eines PKC-Isoenzym durch DAG eine Rolle spielt, lässt sich aus den vorliegenden Daten nur vermuten.

Die Ergebnisse der KCl-Versuche unterstreichen die spezifische Hemmung der akuten HPV durch OAG. Die KCl-Vasokonstriktion war nicht durch OAG vermindert. DAG scheint aufgrund dieser Ergebnisse ein spezieller Mediator der HPV zu sein.

Die Daten der R59949-Versuche mit KCl als vasokonstriktorischem Stimulus zusammen mit den oben erläuterten Erklärungsversuchen passen nicht zu den Resultaten der OAG-Versuche (Abb. 3.2 und Abb. 3.6). Da die bisherigen Überlegungen von einer Beteiligung der K_v- und V_oC-Kanäle stromabwärts des

TRPC6-Kanals und damit auch stromabwärts von DAG ausgehen, war eine Inhibition der KCl-Vasokonstriktion hier wie bei R59949 zu erwarten. Ursache für das Ausbleiben einer Inhibition der KCl-induzierten Vasokonstriktion könnte sein, dass VOCC durch die extrazelluläre K^+ -Gabe direkt aktiviert würden und K_V -Kanäle für eine derartige Membrandepolarisation keine Rolle spielten. Daher kann vermutet werden, dass durch diese direkte Wirkung der Membrandepolarisation auf die VOCC die Signalkaskade der HPV keinen Einfluss auf die Leitfähigkeit der VOCC hat und daher keine Inhibition der Vasokonstriktion durch TRPC6-Aktivierung stattfinden kann. Dennoch steht diese Überlegung im Widerspruch zu den Überlegungen zur Hemmung der KCl-Vasokonstriktion durch R59949. Eine tief greifende extrazelluläre Milieuveränderung, die durch Kaliumgabe verursacht wird, kann möglicherweise das Zusammenspiel von PASM-C und Endothel sowie Zellen des Blutes beträchtlich stören. Unspezifische, vielschichtige zelluläre Antworten und Interaktionen könnten die Folge sein, so dass der Einsatz von KCl als Vasokonstriktor für Kontrollversuche gerade vor dem Hintergrund der widersprüchlichen Ergebnisse der R59949 und OAG Versuche kritisch betrachtet werden muss.

Dennoch zeigt die spezifische Hemmung der HPV durch das DAG-Analogon OAG verglichen mit den Resultaten aus den U46619-Versuchen, dass DAG eine bedeutende Rolle für die akute HPV spielen muss. Es liegt nahe, dass DAG als Mediator in der Signalkaskade der HPV möglicherweise Aktivator des für die akute HPV wichtigen TRPC6-Kanals ist. Ein direkter Einfluss des DAGs auf TRPC6 kann durch die hier vorliegenden Untersuchungen allerdings nur vermutet werden. Daher können auch in der Literatur beschriebene direkte Einflüsse anderer Mediatoren, wie beispielsweise ROS (reactive oxygen species) als Mediatoren diskutierter Sauerstoffsensoren wie Mitochondrien und NADPH-Oxidasen, auf TRPC-Kanäle im Rahmen der akuten HPV nicht kategorisch ausgeschlossen werden ³⁶.

4.1.3 U73122 und U73343

PLC produziert aus dem Substrat Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) die Produkte DAG und Inositoltrisphosphat (IP_3) ⁹³. Da die bedeutende Rolle von DAG für die akute HPV im intakten Lungenpräparat nachgewiesen wurde, wurde nun versucht, die PLC pharmakologisch zu inhibieren. Die Ergebnisse der PLC-

Inhibition zeigten, dass die HPV unspezifisch durch Zugabe des aktiven PLC-Inhibitors U73122 inhibiert werden konnte und U73343 als inaktive Kontrollsubstanz kein Einfluss auf die HPV hatte (Abb. 3.8). Neben der akuten HPV wurden auch die Vasokonstriktionen durch das Thromboxananalogon U46619 und KCl durch U73122 inhibiert, wobei bei den Hypoxie- und U46619-Versuchsreihen keine wesentliche Änderung des normoxischen PAP beobachtet werden konnte (Abb. 3.9, Abb. 3.10, Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Bei KCl-Versuchen nahm der normoxische PAP bei höheren U73122-Konzentrationen ab (Abb. 3.13). Geht man davon aus, dass eine Hemmung der HPV, der Vasokonstriktion durch U46619 und KCl nicht durch einen gänzlich unspezifischen toxischen Effekt des U73122 zustande kommt, was bei den hier durchgeführten Experimenten nicht ausgeschlossen werden kann, so sind diese Ergebnisse für die Aufklärung der Signalkaskade der HPV äußerst interessant. Die Hemmung der HPV und der U46619 resp. der KCl induzierten Vasokonstriktion durch U73122 bedeutet nämlich, dass eine PLC-Aktivierung sowohl für die akute HPV als auch für den nicht-spannungsabhängigen, rezeptorgekoppelten Calciumeinstrom (U46619) nötig ist. Die IP_3 -gesteuerte Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, aber auch die $[Ca]_i$ -Erhöhung durch VOCC, wie sie bei der HPV vermutet wird und wahrscheinlich bei der Gabe von KCl-Boli zustande kommt, konnte so gehemmt werden^{19, 114}. Da diese beiden unterschiedlichen Arten der $[Ca]_i$ -Erhöhung durch U73122 gehemmt werden konnten, ist davon auszugehen, dass PLC-Isoenzyme für die akute HPV, aber auch für den rezeptorgekoppelten Calciumeinstrom, wie er durch U46619 zustande kommt, eine essenzielle Rolle spielen. Die PLC-Produkte DAG und IP_3 könnten als stromabwärts gelegene Mediatoren eine Trennung der Signalkaskaden der HPV und der rezeptorgekoppelten Vasokonstriktion bewirken. Diese Überlegung passt zu den oben erwähnten Ergebnissen zur Untersuchung des Einflusses von DAG auf die HPV, bei denen eine spezifische Inhibition der HPV noch möglich war (Abb. 3.1 und Abb. 3.4). Die Auswirkungen auf den normoxischen PAP bei U73122-Gabe passen zur Überlegung, dass durch Inhibition der PLC keine vasokonstriktorisches Substanzen gebildet werden. Außerdem spricht ein gleich bleibendes normoxisches PAP-Niveau dafür, dass die PLC nicht wesentlich zum Basistonus der pulmonalarteriellen Gefäße unter normoxischen Bedingungen beiträgt

und durch die Inhibition der PLC kein Abfall des normoxischen PAP beobachtet werden kann.

Die in der Literatur beschriebene, direkte Assoziation zwischen PLC-Isoenzym PLC- γ und TRPC3, einem TRPC Kanal, der zusammen mit TRPC6 und TRPC7 eine funktionelle Gruppe bildet, scheint aufgrund der Ergebnisse der DAG/DAG-Kinase Untersuchungen für die akute HPV und die Steuerung von TRPC6 keine direkte Rolle zu spielen. Die direkte Beeinflussung der TRPC-Kanäle durch PLC basierend auf Exo- und Endozytosevorgänge während chronischer Hypoxie scheint mit dem Wissen, dass eine PLC für akute Sauerstoffsinaltransduktion eine essenzielle Rolle inne hat, jedoch durchaus interessant ⁸⁶.

PLC, der aufgrund dieser Ergebnisse eine wesentliche Funktion für die Signaltransduktion der akuten HPV und rezeptorgesteuerten Vasokonstriktion zugesprochen werden kann, wird keine Rolle als möglicher O₂-Sensor eingeräumt ¹⁴⁰. Daher müssten weitere Mechanismen stromaufwärts in der Signalkaskade der akuten HPV vorhanden sein, die die diskutierten O₂-Sensoren mit PLC verbinden. Die Beschreibung einer Aktivierung von PLC- γ , einem Isoenzym der PLCs, durch exogene Gabe von H₂O₂, einer reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die durch die vermuteten O₂-Sensoren, wie NADPH-Oxidasen und Mitochondrien, produziert werden kann, lässt vermuten, dass ROS die Signalkaskade der akuten HPV über PLC in Gang setzen könnten ^{35, 86, 156}. Diese Überlegung würde die nachgewiesene Bedeutung von ROS und TRPC6 für die akute HPV zusammenführen und plausibel erklären ^{36, 137, 140}. Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um mögliche Interaktionen von ROS und PLC und deren eventuelle Bedeutung für pulmonale Sauerstoffsensorik und Signaltransduktion zu klären. Auch mögliche Interaktionen zwischen weiteren diskutierten O₂-Sensoren, wie HO-2, B_K-Kaliumkanälen oder Cytochrom P450 Enzymen mit PLC-Isoformen, könnten einen Teil des Signaltransduktionsweges der HPV ausmachen. Daher wurde zumindest die Rolle der HO-2 und des B_K-Kaliumkanals für pulmonale O₂-Sensorik in dieser Dissertation näher untersucht und in Abschnitt 4.3 diskutiert.

Außerdem soll bei der Aufklärung der Signalwege auch berücksichtigt werden, dass möglicherweise andere Phospholipasen ebenfalls eine Rolle bei der TRPC-Kanalaktivierung spielen. Hinsichtlich dieses Punktes wurde eine Beteiligung von

PLD beschrieben, welche die DAG-Produktion aus Phosphatidsäure (PA) bewerkstelligt⁶.

4.1.4 Konzept der Signaltransduktion der akuten HPV

Auf der Grundlage der vorliegenden Daten und bisheriger Untersuchungen lässt sich für die akute HPV das in Abb. 4.1 dargestellte, neue Konzept der O₂-Sensorik und -Signaltransduktion postulieren.

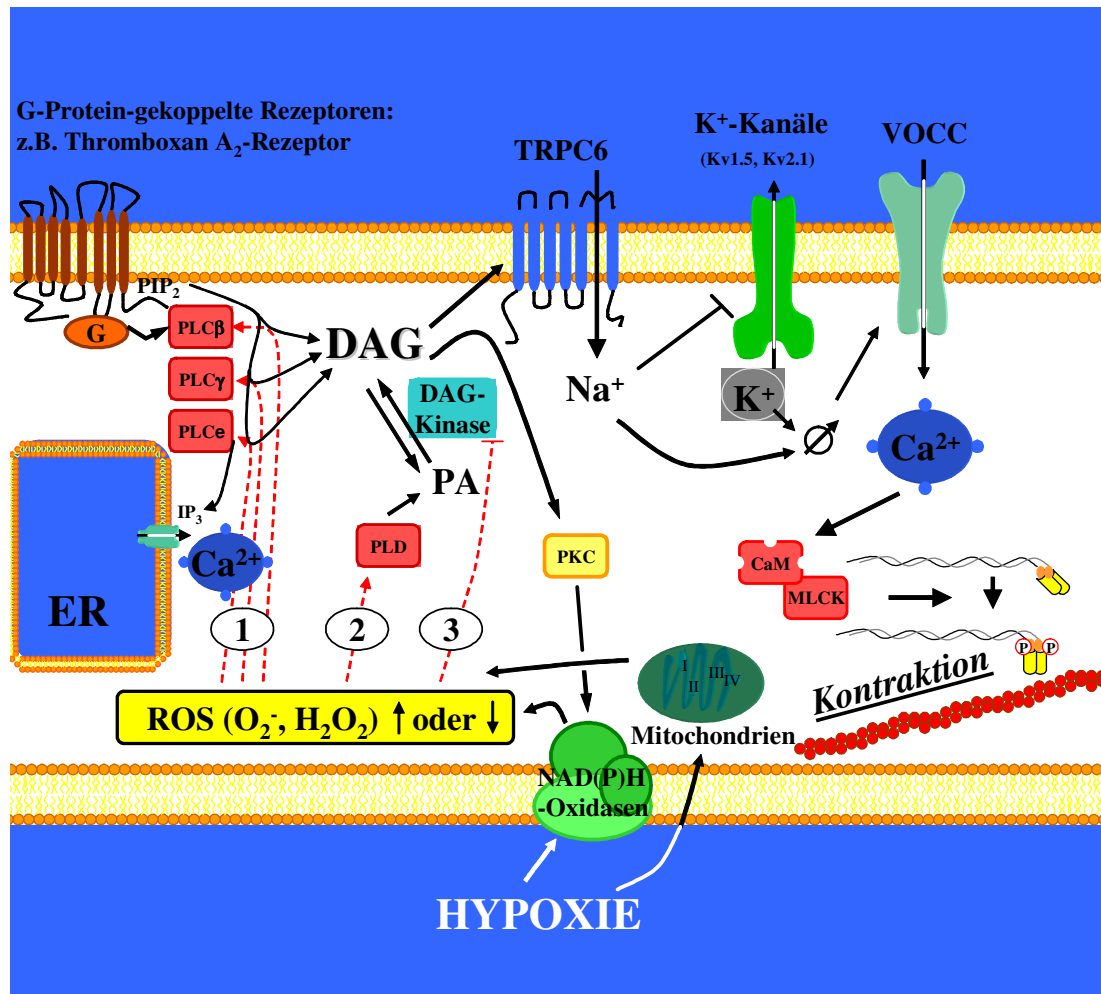


Abb. 4.1: Modell der O₂-Sensorik und -Signaltransduktion der akuten HPV innerhalb PASCs. Hellblaue Areale deuten hohe Ca²⁺-Konzentrationen an (1-2 mM), weiße Areale niedrige Ca²⁺-Konzentrationen (50 nM-200 nM). CaM: Calmodulin, PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, DAG: Diacylglycerol, ER: Endoplasmatisches Retikulum IP₃: Inositol-1,4,5-Trisphosphat, K_{v1.5} und K_{v2.1}: spannungsabhängige Kaliumkanäle, MLCK: myosin-light-chain-kinase, PA: Phosphatidsäure, PKC: Proteinkinase C, PLC: Phospholipase C, PLD: Phospholipase D, TRPC6: transient receptor potential channel 6, VOCC: voltage-operated calcium channels.

Im oben dargestellten Modell induziert Hypoxie eine DAG-Akkumulation, die zu einem Kationeninflux über den TRPC6-Kanal führt. Über den unspezifischen

Kationeninflux können Kaliumkanäle inhibiert werden. Die daraus entstehende Depolarisation der Zellmembran aktiviert VOCC und ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum wird hervorgerufen, wodurch letztlich die Kontraktion der einzelnen PASMC zustande kommt. Die DAG-Akkumulation selbst kommt durch Aktivierung von PLCs (1) oder PLD (2) zustande, welche möglicherweise durch einen ROS-Anstieg oder -Abfall unter Hypoxie aktiviert werden. Auch eine direkte Interaktion von ROS mit der DAG-Kinase ist angedeutet (3). Die ROS-Konzentration hängt wahrscheinlich entscheidend von den als O_2 -Sensoren vermuteten NADPH-Oxidasen und Mitochondrien ab. Die Rolle der PKC für einen Verstärkermechanismus ist ebenfalls dargestellt.

Die Gabe von U46619 führt zur Aktivierung des Thromboxanrezeptors, welcher zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört. Über PLC und IP_3 werden bei U46619-Gabe intrazelluläre Calciumspeicher, wie das endoplasmatische Retikulum (ER), entleert, so dass sich dadurch die für unter Hypoxie vorkommende spezifische Inhibition der HPV mit R59949 und OAG erklären lässt. Auch die unspezifische Inhibition der HPV und der U46619-induzierten Vasokonstriktion durch Gabe des PLC-Inhibitors U73122 wird durch dieses Modell erklärt.

4.2 Pharmakologische Untersuchungen zum Einfluss des TRPC6-Aktivators DAG auf die protrahierte Phase der HPV am Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge

Trotz den Ergebnissen aus Untersuchungen an $\text{TRPC6}^{-/-}$ Mäusen, dass TRPC6 für die protrahierte Phase der HPV keine Rolle spielt, lässt sich eine Beteiligung der TRPC6 steuernden Elemente, wie DAG und PLC an den Signaltransduktionsmechanismen der protrahierten Phase der HPV nicht ausschließen¹³⁷. Auch gerade wegen der klinisch wichtigen Bedeutung dieser Phase der HPV, die als Übergang in die pathophysiologischen Prozesse unter chronischer Hypoxie, wie pulmonales Gefäß-remodelling und pulmonaler Vasokonstriktion im Rahmen einer PH gedeutet werden kann, ist eine Überprüfung der Rolle von DAG und PLC während der protrahierten Phase der HPV wichtig¹⁴⁰.

4.2.1 R59949

Zunächst wurde ein Modus entwickelt, wie der Einfluss von DAG auf die protrahierte Phase der HPV am besten über einen Zeitraum von etwa 3 Stunden pharmakologisch getestet werden konnte.

Die einmalige Gabe des DAG-Kinase-Inhibitor R59949 führte dazu, dass repetitive, akute hypoxische Stimuli über einen Zeitraum von ca. 180 Minuten signifikant gehemmt wurden (Abb. 3.14). Dieses Resultat zeigte, dass der Inhibitor suffizient im System der pulmonalen Perfusion eingesetzt werden kann. Eine gleichmäßige Wirkung bei einmaliger Gabe für den zur Untersuchung der protrahierten HPV benötigten Zeitraum von 3 Stunden konnte somit angenommen werden. Ein komplexer Versuchsmodus mit möglichem Perfusatwechsel und eventueller kontinuierlicher Inhibitorsubstitution wurde aufgrund dieser Ergebnisse nicht benötigt¹⁴³.

Die Untersuchung einer dreistündigen hypoxischen Beatmung der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge ergab bei einer R59949-Konzentration von 10 μ M eine Hemmung der akuten Phase der HPV. Die protrahierte Phase der HPV veränderte sich gegenüber der Kontrolle ohne R59949 nicht signifikant (Abb. 3.15 und Abb.3.16). Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen aus 4.1.1. Auch hier wurde die akute HPV von R59949 inhibiert. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen an TRPC6^{-/-} Mäusen entsprechen ebenfalls den hier erhaltenen Resultaten. Da DAG offensichtlich TRPC6 steuert und dieser Kanal keine Rolle für die protrahierte Phase der HPV spielt, war es zu erwarten, dass auch DAG keine Bedeutung für die protrahierte HPV zukommt^{39, 137}. Allerdings steht diese Annahme im Widerspruch zu der beschriebenen Aktivierung der Hydroxylierung von HIF-1 α bei Gabe von R59949¹¹⁸. An HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von R59949 die Akkumulation von HIF-1 α / β -Dimeren auf posttranslationalem Wege verhindert und Prolylhydroxylasen zu stimulieren vermag. Eingeschränktes Gefäßremodelling an HIF-1^{+/-} Mäusen würde daran denken lassen, dass bei niedrigeren HIF-1 α / β Konzentrationen, wie es auch bei Gabe von R59949 beschrieben wird, der PAP ebenfalls geringer ausfällt^{118, 147}. Nimmt man an, dass die protrahierte Phase der HPV der Beginn der chronischen Veränderungen auf lang andauernde Hypoxie ist, so widersprechen die Ergebnisse aus den vorliegenden Untersuchungen den

Resultaten aus der Literatur hinsichtlich der Wirkung von HIF-1, da keine geringere protrahierte HPV bei Gabe von R59949 beobachtet werden konnte. Vergleicht man Literaturangaben und den vorliegenden eigenen Untersuchungsansatz, so kann vermutet werden, dass Methoden und Materialien eventuell für Unterschiede bezüglich der Wirkung von R59949 verantwortlich sind. So wurde die Wirkung von R59949 auf Prolylhydroxylasen an HeLa-Zellen und nicht an PASMC untersucht ¹¹⁸. HIF-1^{+/-} Mäusen wurden 3 bzw. 6 Wochen unter 10,0 % Sauerstoff gehalten und deren Lungen histologisch untersucht ¹⁴⁷. Dagegen stellt die vorliegende Untersuchung eine pharmakologische und physiologische Untersuchung am perfundierten Lungenpräparat dar. Es handelte sich keinesfalls um eine Langzeitbehandlung der Versuchstiere mit R59949, so dass der beschriebene Einfluss von R59949 auf die für chronische Veränderungen wichtige HIF-1-Akkumulation trotz dieser Ergebnisse durchaus auch für das pulmonale Gefäßsystem möglich ist. Medikamentöse Behandlungen von Mäusen mit speziellen Inhibitoren der DAG-Kinase sind für eine bessere Aussagekraft hinsichtlich dieser Überlegungen zu etablieren, wobei das ubiquitäre Vorkommen von Second-messengern wie DAG, PLC und dem Enzym DAG-Kinase dabei ein weites Spektrum an Nebenwirkungen erwarten lässt, die wiederum einen solchen Versuchansatz erschweren ⁹².

Interaktionen von DAG und DAG-Kinase mit anderen Transkriptionsfaktoren wie c-jun, die für Veränderungen unter chronischer Hypoxie verantwortlich gemacht werden, lassen sich mit der hier durchgeführten Untersuchung mit R59949 nicht nachweisen. Da jedoch nicht klar ist, ob überhaupt schon auf einer transkriptionalen Ebene Veränderungen nach dreistündiger Hypoxie auftreten und diese zu einer Veränderung des PAP beitragen, bedarf es hierfür zunächst anderer Untersuchungstechniken ¹⁴⁹.

Ein Einfluss von DAG bzw. DAG-Kinase durch die Gabe von R59949 auf die diskutierte Ca²⁺-Sensitivierung durch das Rho-Kinasesystem scheint aufgrund einer nicht signifikanten Veränderung der protrahierten HPV gegenüber den dazu durchgeführten Hypoxiekontrollen als unwahrscheinlich ^{79, 96}. Auch an Zellkulturen der osteoblasten-ähnlichen Zelllinie UMR-106 konnte kein Einfluss von DAG über PKC auf das Rho-Kinase-System nachgewiesen werden ⁹¹. Interaktionen zwischen DAG und dem Rho-Kinase-System bezüglich des pulmonalen Kreislaufs wurden bisher noch nicht untersucht.

Die Betrachtung der normoxischen PAP Veränderungen bei einmaliger R59949-Gabe unter normoxischen Bedingungen zeigte ein dem typischen Verlauf der HPV ähnliches Verhalten. Nach einem initialen Anstieg des PAP fiel dieser nach ca. 100 min auf ein Minimum ab und stieg danach wieder knapp unter das Niveau des ersten Maximums an (Abb. 3.17). Der erste Anstieg des PAP durch R59949-Gabe war gegenüber den Kontrollen ohne R59949 signifikant unterschiedlich. Der protrahierte Anstieg, beginnend 100 min nach R59949-Gabe, zeigte keine signifikante Differenz zur Kontrollgruppe. Diese Beobachtung spricht ebenfalls dafür, dass DAG für die protrahierte Phase der HPV keine Rolle spielt. Veränderte DAG-Konzentrationen zeigen offensichtlich nach einer gewissen Zeit keine weitere Wirkung auf den normoxischen PAP, obwohl die Inhibition der Vasoreaktion bei akuten hypoxischen Stimuli im gleichen Zeitraum bei gleicher DAG-Konzentration nicht nachgelassen hatte (Abb. 3.14). Um diese Beobachtung zu erklären, muss daher ein anderer, DAG- und TRPC6-unabhängiger Signaltransduktionsweg der protrahierten Phase der HPV postuliert werden.

Aufgrund dieser Untersuchungen können die Ergebnisse aus Untersuchungen an TRPC6^{-/-} Mäusen bestätigt und erweitert werden. DAG scheint, wie auch TRPC6, keinen Einfluss auf die verzögerte, protrahierte Phase der HPV zu haben. Da TRPC6 für die akute HPV essenziell und DAG das steuernde Element von TRPC6 ist, müssen zumindest zwei verschiedene Signalwege für Hypoxie im pulmonalen Gefäßsystem angenommen werden. Die Untersuchung spricht also dafür, dass neben mehreren möglichen O₂-Sensoren auch mehrere, zumindest aber zwei, O₂-Signaltransduktionswege innerhalb einer PASMC existieren.

4.3 HO-2 und spannungsabhängiger Ca²⁺-aktivierter Kaliumkanal (B_K) als möglicher O₂-Sensorkomplex

Da trotz intensiver Forschung die Sauerstoffsensoren und die Signaltransduktionswege der HPV noch nicht vollständig geklärt sind, sollte im Rahmen dieser Dissertation auf Basis physiologischer und histologischer Untersuchungen die Bedeutung von HO-2 und B_K-Kanal für Sauerstoffsensorik und die HPV näher untersucht werden. Gerade vor dem Hintergrund, dass HO-2 und ein

spannungsabhängiger calcium-aktivierter Kaliumkanal (B_K) in Glomuszellen eine Bedeutung als Sauerstoffsensorkomplex haben ¹⁴⁵, wurde eine tierexperimentelle Untersuchung der Rolle von HO-2 und B_K -Kanal hinsichtlich der akuten und protrahierten Phase der HPV als auch bezüglich chronischer Hypoxie an transgenen HO-2- und B_K -Tieren für sinnvoll gehalten und durchgeführt.

4.3.1 Akute und protrahierte Phase der HPV

Sowohl B_K als auch HO-2 Knockout-Mäuse wurden im Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge untersucht. In der akuten und protrahierten Phase der HPV zeigten die $B_K^{-/-}$ Mäuse keine Veränderungen des PAP gegenüber den Wildtypkontrollen (Abb. 3.18). Gleiches gilt für die Untersuchungen an HO-2^{-/-} und HO-2^{+/+} Mäusen. Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen festgestellt (Abb. 3.19). Unterschiede bei Vasokonstriktion durch U46619 verglichen mit der Vasokonstriktion durch Hypoxie bestanden ebenfalls für HO-2- und B_K -Kanal-defiziente Mäuse nicht (Abb. 3.20 und Abb. 3.21).

Diese Ergebnisse implizieren, dass der als Sauerstoffsensor vorgeschlagene Komplex aus HO-2 und B_K -Kaliumkanal im pulmonalen Kreislauf keine Rolle für akute und protrahierte Sauerstoffsensorik spielt. Eine Bedeutung von HO-2 und B_K -Kanal für O₂-Sensorik außerhalb der Lunge kann mit diesem Untersuchungsbefund allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher besteht prinzipiell keine Diskrepanz zu den Ergebnissen zur Rolle von HO-2 und B_K -Kanal in Glomuszellen ^{41, 145}. Geht man von universellen O₂-Sensormechanismen aus, d.h., dass O₂-Sensormechanismen in Lunge, Glomuszellen etc. dieselben sind, so stehen die hier gezeigten Resultate im Einklang mit Ergebnissen, die zeigen, dass sowohl HO-2-defiziente Mäuse keine eingeschränkte O₂-Sensitivität in Glomuszellen besitzen als auch die pharmakologische Blockade des B_K -Kanals kein Einfluss auf die O₂-Antwort hat ⁸⁴. Dagegen widersprechen die Daten dieser Dissertation den Untersuchungen von Adachi und Kollegen, die bei HO-2^{-/-} Mäusen ein Ventilation-Perfusionsungleichgewicht beschreiben. Hierbei erscheinen deren Ergebnisse jedoch als äußerst fragwürdig, da neben der dort beschriebenen überaus schwierig durchzuführenden und komplizierten Methodik kein direkter Nachweis eines so

genannten „mismatch“, eines Perfusions-Ventilationsungleichgewichts, erbracht werden konnte³.

Trotz des eindeutigen Ergebnisses, dass weder HO-2 noch B_K-Kanal für pulmonale O₂-Sensorik und die akute und protrahierte Phase der HPV essenziell sind, kann eine Interaktion der HO-2 mit B_K-Kanälen mit den vorliegenden Resultaten nicht ausgeschlossen werden^{41, 117}. Auch eine Beteiligung von CO als Botenstoff zwischen HO-2 und B_K-Kanal kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Untersuchungen mittels yeast-two-hybrid-screening erbrachten dahingehend jedoch ebenfalls kein Nachweis für einen vorliegenden HO-2/B_K-Komplex⁹⁸. Falls ein solcher dennoch im pulmonalen Gefäßsystem vorliegt, so ist aufgrund der hier erbrachten Datenlage eine Irrelevanz für akute und protrahierte O₂-Sensorik anzunehmen.

Bezüglich der Untersuchung der HO-2-defizienten Mäusen muss bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass Isoenzyme (HO-1, HO-3) möglicherweise die Funktion des sonst konstitutionell exprimierten HO-2-Proteins übernehmen¹⁰⁹. Grundsätzlich gilt diese Überlegung für alle Experimente mit Knockouttieren. Spezielle Aufgaben könnten innerhalb zellulärer Signalwege von anderen funktionellen Einheiten übernommen werden, so dass ein Ausschalten eines einzelnen Gens keine funktionellen Folgen für die Zelle und schließlich für den Organismus hat.

Bei dem Vergleich der verschiedenen Ergebnisse zur HO-2 und zum B_K-Kanal muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass bei den bisher vorliegenden Untersuchungen keine einheitlichen Methoden für die Untersuchung der Rolle dieser beiden Proteine für O₂-Sensorik verwendet wurden. Auch sollte zwischen O₂-Sensorik in Glomuszellen und pulmonalem Gefäßsystem deutlich unterschieden werden, da bisher kein Nachweis für einen generell vorkommenden Mechanismus der O₂-Sensorik vorliegt.

Da HO-2 respektive B_K-Kanal keine Rolle für akute und protrahierte pulmonale O₂-Sensorik und O₂-Signaltransduktion spielen, scheinen daher eher andere O₂-Sensormechanismen wie NADPH-Oxidasen und Mitochondrien für akute und protrahierte Sauerstoffsensorik in Frage zu kommen^{134, 138, 140, 143}.

4.3.2 Rolle von B_K-Kanal und HO-2 in chronischer Hypoxie

Die Wirkung von dreiwöchiger Hypoxie auf den pulmonalen Kreislauf von B_K und HO-2-defizienten Tieren wurde durch physiologische und histologische Untersuchungen quantifiziert (3.3.3 bis 3.3.6). Sowohl bei B_K^{-/-} als auch bei HO-2^{-/-} Mäusen konnte bei der histologischen Untersuchung verglichen mit den entsprechenden Wildtypkontrollen kein wesentlicher Unterschied im pulmonalen Gefäß-remodelling festgestellt werden (s. Abb. 3.31 und Abb. 3.32). Auch die physiologischen Messungen des RVSP und der Herzratio, dem Verhältnis aus der Masse des rechten Ventrikels und der Masse des linken Ventrikels plus Septum, ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Knockout- und Wildtyptieren.

Außerdem wurde direkt nach der RVSP-Messung von allen untersuchten Tieren der Hämatokritwert bestimmt. Dies ergab bei allen in Hypoxie gehaltenen Tieren eine signifikante Erhöhung des Hämatokrits unabhängig davon, ob die Tiere transgene Mäuse oder Wildtypkontrolltiere waren. Der Vergleich des Hämatokrits unter Hypoxie untereinander ergab außerdem keine Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen in der B_K- und HO-2-Versuchsreihe.

Diese Ergebnisse zeigen, dass B_K-Kanal und HO-2 auch für O₂-Sensorik unter chronische Hypoxie keine Rolle spielen. Auch auf pulmonale Umbauprozesse, wie sie unter chronischer Hypoxie stattfinden, haben die untersuchten zellulären Proteine offensichtlich ebenso wenig Einfluss, wie diese auf die Vasokonstriktion unter akuter und protrahierter Hypoxie keinen effektiven Einfluss haben.

Ein Vergleich mit anderen Untersuchungen fällt hinsichtlich der chronischen Hypoxie und der Bedeutung von B_K-Kanal und HO-2 schwer, da bis heute keine Veröffentlichungen für B_K-Kanal und HO-2 bezüglich chronischer Hypoxie vorliegen.

Rein methodisch ist der histologisch-morphologische Nachweis pulmonaler Gefäßveränderungen unter Hypoxie eindeutig. Aber auch die Messung des RVSP und der Herzratio unter Berücksichtigung der Gewichte jeweils beider Ventrikel sind ein gutes Maß für den pulmonalen Gefäßwiderstand. Widerstandsveränderungen, die das pulmonale Remodelling bzw. pulmonale Vasokonstriktionen nach sich ziehen, können so gut erfasst werden und als Indikator für pulmonale Gefäßveränderungen dienen.

Die Messungen des Hämatokrit dagegen spielen für die Interpretation der pulmonalen Reaktionen auf Hypoxie nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr sind Änderungen des Hämatokrit ein Indiz für Anpassungsvorgänge auf chronische Hypoxie, die im systemischen Abschnitt des Kreislaufs stattfinden. Bei verminderten systemischen Sauerstoffpartialdrücken wird in Endothelzellen von Nierentubuli Erythropoetin gebildet, welches wiederum dafür sorgt, dass im Knochenmark die Produktion von Erythrozyten und somit auch der Hämatokritwert erhöht wird⁴⁰. Da sich die Hämatokritwerte der transgenen Tiere nicht von den Werten der Wildtypkontrollen bei B_K und HO-2 Mäusen unterscheiden, lässt dies darauf schließen, dass renale O₂-Sensoren unabhängig von B_K-Kanal und HO-2 agieren. Dies führt zur Annahme, dass die beschriebene Regulation der Erythropoetinproduktion durch den Transkriptionsfaktor HIF-1, welcher auch für pulmonales Gefäß-remodelling unter chronischer Hypoxie von Bedeutung ist, nicht durch HO-2- oder B_K-Kanalaktivitäten verändert wird und kein Zusammenhang mit HIF-1 besteht^{40, 107, 108, 147}.

Aus den hier vorliegenden Ergebnissen kann für B_K-Kanal und HO-2 anhand der physiologischen und histologischen Untersuchung kein Nachweis für eine mögliche Beteiligung an pulmonalen O₂-Sensor- und O₂-Signaltransduktionsmechanismen unter akuter, protrahierter und chronischer Hypoxie erbracht werden. Daher ist auch eine bedeutende Rolle von B_K-Kanal und HO-2 in pathophysiologischen Prozessen, die zur pulmonalen Hypertonie führen, nicht anzunehmen.

5. Zusammenfassung

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) ist ein bedeutender Mechanismus, welcher den pulmonalen Gasaustausch optimiert, indem der pulmonale Blutfluss an die alveoläre Ventilation angepasst wird. Trotz intensiver Forschung seit der Erstbeschreibung durch von Euler und Liljestrand im Jahre 1946 konnten bis heute die Sauerstoffsensormechanismen und Signaltransduktionswege der akuten, protrahierten und chronischen hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion nicht vollständig geklärt werden.

Es gilt als gesichert, dass die HPV durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) zustande kommt. Die Tatsache, dass akute Hypoxie in isolierten PASMC eine $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung und Kontraktion auslöst, zeigt, dass diese sowohl als Sensor- als auch Effektorzelle der akuten HPV gelten. NADPH-Oxidasen, Mitochondrien, Hämoxxygenase-2 (HO-2) und eine Reihe von Ca^{2+} - und K^+ -Kanälen werden als in Frage kommende O_2 -Sensor- und -Signaltransduktionsmechanismen der HPV diskutiert. Neuere Untersuchungen konnten eine Schlüsselrolle des transient receptor potential channels 6 (TRPC6) für die akute HPV belegen.

Um die Steuerung von TRPC6-Kanälen durch Diacylglycerol (DAG) während der HPV zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Dissertation die Rolle des potenziellen TRPC6-Aktivators DAG an isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslungen mittels pharmakologischer Beeinflussung des DAG-Stoffwechsels durch R59949 (DAG-Kinase-Inhibitor), 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) (DAG-Analogon) und U73122 (PLC-Inhibitor) überprüft. Es zeigte sich, dass R59949, OAG und U73122 eine Hemmung der akuten HPV provozieren, wobei diese für R59949 und OAG gegenüber der Vasokonstriktion mit dem Thromboxananalogon U46619 spezifisch war. Aufgrund dieser Resultate konnte eine entscheidende Rolle von DAG respektive PLC als Bestandteil der Signaltransduktionskaskade der akuten HPV belegt und die Beeinflussung des TRPC6-Kanals durch DAG als „upstream-Mechanismus“ der Signalkaskade der akuten HPV postuliert werden. Eingebunden in den aktuellen Kenntnisstand konnte so ein neues Modell der O_2 -Sensor- und Signaltransduktionswege erstellt werden.

Weiterhin wurde ein Versuchsmodus etabliert, um die Rolle von DAG auf die protrahierte Phase der HPV zu untersuchen. Es zeigte sich, dass R59949 – im Gegensatz zur akuten HPV – die protrahierte Phase der HPV nicht beeinflusst. Daraus konnte postuliert werden, dass DAG, wie auch TRPC6, keine Rolle für die als Übergang in chronische Hypoxie gedeutete protrahierte Phase der HPV spielt. Diese Resultate unterstützten die Annahme, dass für die akute und protrahierte Phase der HPV zwei verschiedene O₂-Sensor- und Signaltransduktionswege existieren.

Weiterhin wurde das kürzlich diskutierte Modell von HO-2 und spannungsabhängigem Ca²⁺-aktiviertem Kaliumkanal (B_K) als universeller O₂-Sensormechanismus in der vorliegenden Dissertation hinsichtlich des pulmonalen Gefäßbettes untersucht. HO-2- und B_K-Kanal-defiziente Mäuselungen zeigten keinen Unterschied in der Stärke der akuten und protrahierten Phase der HPV im Vergleich mit entsprechenden Wildtypen. Darüber hinaus bestand kein Unterschied hinsichtlich des pulmonalen Hochdrucks, welcher sich nach 3-wöchiger, chronischer Hypoxie sowohl in Wildtyp- als auch in HO-2- respektive B_K-Kanal-defizienten Mäusen ausprägte und mittels Messung der rechtsventrikulären Drücke (RVSP), Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie und histologischer Untersuchung der Muskularisierung pulmonalarterieller Gefäße quantifiziert wurde. Weder für akute und protrahierte noch für chronische Hypoxie kommt somit das Modell von HO-2 und B_K-Kanal als O₂-Sensormechanismus innerhalb des pulmonalen Gefäßbettes in Frage.

6. Summary

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is an important mechanism, optimizing pulmonary gas exchange by matching pulmonary blood flow to alveolar ventilation. In spite of intensive research since its first description by von Euler and Liljestrand in 1946, hitherto, oxygen sensing and signal transduction pathways of acute, sustained and chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction are not completely elucidated.

It is well accepted that acute HPV is induced by an increase of the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC). As isolated PASMC show an increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ as well as a contraction under hypoxic conditions, those are considered to be sensor as well as effector cells of acute HPV.

NADPH-oxidases, mitochondria, heme oxygenase 2 (HO-2), Ca^{2+} -channels and K^{+} -channels are discussed as O_2 -sensor and signal transduction mechanisms. In addition, recent studies could show, that transient receptor potential channel 6 (TRPC6) plays an essential role in acute HPV.

Hence, this dissertation investigated diacylglycerol (DAG) as possible TRPC6 activator. In isolated, perfused and ventilated mice lungs DAG metabolism was pharmacologically influenced by R59949 (DAG-kinase-inhibitor), 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) (DAG analog) and U73122 (phospholipase inhibitor).

Inhibition of acute HPV could be induced by R59949, OAG and U73122, whereas the inhibition of HPV was specific for R59949 and OAG, compared with vasoconstrictions induced by thromboxan mimetic U46619. Due to these results an indispensable role of DAG and phospholipase C (PLC) as integral part of O_2 signalling and signal transduction mechanisms of acute HPV could be demonstrated. Moreover, the regulation of TRPC6 through DAG as an upstream mechanism in acute HPV signal transduction could be postulated. Against the current scientific background a new model of O_2 sensor and signal transduction could be developed.

Furthermore, an experimental mode was established to investigate the role of DAG in sustained HPV. In contrast to acute HPV, R59949 did not influence the sustained phase of HPV. Thus, it could be postulated that DAG, as shown for TRPC6 in other studies, plays no role in (supposed as transition to chronic hypoxia) sustained HPV.

These results strongly support the assumption, that different sensor and signal transduction pathways are active during acute and the sustained HPV.

In addition, the recent model of HO-2 and large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (B_K) channel as universal O_2 sensor mechanism was investigated regarding the pulmonary vasculature system. Experiments in isolated, perfused and ventilated lungs of HO-2 and B_K deficient mice showed no difference in strength of acute and sustained phases of HPV, compared with corresponding wild type mice. Besides this, there was no difference in development of pulmonary hypertension after 3 weeks of chronic hypoxia, when both HO-2 deficient as B_K deficient mice were compared with wild type mice by assessment of right ventricular systolic pressure (RVSP), right ventricular hypertrophy, and the degree of pulmonary vasculature muscularisation. Thus most likely, neither for acute and sustained nor for chronic hypoxia HO-2 and B_K channel are a relevant O_2 -sensor mechanism within the pulmonary vasculature system.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Aaronson PI. TRPC Channel upregulation in chronically hypoxic pulmonary arteries: the HIF-1 bandwagon gathers steam. *Circ Res* 2006 June 23;98(12):1465-7.
- (2) Aaronson PI, Robertson TP, Knock GA, Becker S, Lewis TH, Snetkov V, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. *J Physiol* 2006 January 1;570, 53-8.
- (3) Adachi T, Ishikawa K, Hida W, Matsumoto H, Masuda T, Date F, Ogawa K, Takeda K, Furuyama K, Zhang Y, Kitamuro T, Ogawa H, Maruyama Y, Shibahara S. Hypoxemia and blunted hypoxic ventilatory responses in mice lacking heme oxygenase-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 July 23;320(2):514-22.
- (4) Aguirre JJ, Morrell NW, Long L, Clift P, Upton PD, Polak JM, Wilkins MR. Vascular remodeling and ET-1 expression in rat strains with different responses to chronic hypoxia. *Am J Physiol* 2000 May;278(5):L981-L987.
- (5) Albarwani S, Robertson BE, Nye PC, Kozlowski RZ. Biophysical properties of Ca^{2+} - and Mg-ATP-activated K^{+} channels in pulmonary arterial smooth muscle cells isolated from the rat. *Pflügers Arch* 1994 October;428(5-6):446-54.
- (6) Albert AP, Piper AS, Large WA. Role of phospholipase D and diacylglycerol in activating constitutive TRPC-like cation channels in rabbit ear artery myocytes. *J Physiol* 2005 August 1;566(Pt 3):769-80.
- (7) Andrivet P, Cadranel J, Housset B, Herigault R, Harf A, Adnot S. Mechanisms of impaired arterial oxygenation in patients with liver cirrhosis and severe respiratory insufficiency. Effects of indomethacin. *Chest* 1993 February;103(2):500-7.
- (8) Archer SL, London B, Hampl V, Wu X, Nsair A, Puttagunta L, Hashimoto K, Waite RE, Michelakis ED. Impairment of hypoxic pulmonary

- vasoconstriction in mice lacking the voltage-gated potassium channel $K_{v1.5}$. *FASEB J* 2001 August;15(10):1801-3.
- (9) Archer SL, Souil E, nh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El YA, Nguyen-Huu L, Reeve HL, Hampl V. Molecular identification of the role of voltage-gated K^+ channels, $K_{v1.5}$ and $K_{v2.1}$, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest* 1998 June 1;101(11):2319-30.
- (10) Bennie RE, Packer CS, Powell DR, Jin N, Rhoades RA. Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am J Physiol* 1991 August;261:L156-L163.
- (11) Bergdahl A, Gomez MF, Wihlborg AK, Erlinge D, Eyjolfson A, Xu SZ, Beech DJ, Dreja K, Hellstrand P. Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: correlation with store-operated Ca^{2+} entry. *Am J Physiol* 2005 April;288(4):C872-C880.
- (12) Bradford JR, Dean HP. The Pulmonary Circulation. *J Physiol* 1894 March 22;16(1-2):34-158.
- (13) Busse R. Kreislauf, in: Schmidt RF (Hrsg.), Lang F, Thews G: *Physiologie des Menschen*. 29. Auflage. Springer. Heidelberg, 657-658. 2004.
- (14) Cornfield DN, Reeve HL, Tolarova S, Weir EK, Archer S. Oxygen causes fetal pulmonary vasodilation through activation of a calcium-dependent potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 July 23;93(15):8089-94.
- (15) Cornfield DN, Stevens T, McMurtry IF, Abman SH, Rodman DM. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993 July;265:L53-L56.
- (16) Cornfield DN, Stevens T, McMurtry IF, Abman SH, Rodman DM. Acute hypoxia causes membrane depolarization and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1994 April;266:L469-L475.

-
- (17) Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol* 2000 September;279(3):L429-L438.
- (18) Dietrich A, Chubakov V, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T. Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacol Ther* 2006 December;112(3):744-60.
- (19) Dietrich A, Kalwa H, Fuchs B, Grimminger F, Weissmann N, Gudermann T. In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium* 2007 August;42(2):233-44.
- (20) Dietrich A, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T. The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflugers Arch* 2005 October;451(1):72-80.
- (21) Dietrich A, Mederos YS, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaya G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 2005 August;25(16):6980-9.
- (22) Dipp M, Nye PC, Evans AM. Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 2001 August;281(2):L318-L325.
- (23) Domino KB, Chen L, Alexander CM, Williams JJ, Marshall C, Marshall BE. Time course and responses of sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction in the dog. *Anesthesiology* 1984 June;60(6):562-6.
- (24) Du W, Frazier M, McMahon TJ, Eu JP. Redox activation of intracellular calcium release channels (ryanodine receptors) in the sustained phase of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. *Chest* 2005 December;128(6 Suppl):556S-8S.
- (25) Emery CJ. Vascular remodelling in the lung. *Eur Respir J* 1994 February;7(2):217-9.

-
- (26) Estacion M, Li S, Sinkins WG, Gosling M, Bahra P, Poll C, Westwick J, Schilling WP. Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. *J Biol Chem* 2004 May 21;279(21):22047-56.
- (27) Estacion M, Sinkins WG, Jones SW, Applegate MA, Schilling WP. Human TRPC6 expressed in HEK 293 cells forms non-selective cation channels with limited Ca^{2+} permeability. *J Physiol* 2006 April 15;572(Pt 2):359-77.
- (28) Fedde MR. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poult Sci* 1998 August;77(8):1130-8.
- (29) Firth AL, Remillard CV, Yuan JX. TRP channels in hypertension. *Biochim Biophys Acta* 2007 August;1772(8):895-906.
- (30) Freichel M, Vennekens R, Olausson J, Stolz S, Philipp SE, Weissgerber P, Flockerzi V. Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J Physiol* 2005 August 15;567(Pt 1):59-66.
- (31) French RJ, Wells JB. Sodium ions as blocking agents and charge carriers in the potassium channel of the squid giant axon. *J Gen Physiol* 1977 December;70(6):707-24.
- (32) Gaines DI, Fallon MB. Hepatopulmonary syndrome. *Liver Int* 2004 October;24(5):397-401.
- (33) Ghofrani HA, Rosenkranz S, Grimminger F. Future aspects of the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Dtsch Med Wochenschr* 2006 December 8;131(49 Suppl 9):S338-S340.
- (34) Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Weissmann N, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F. Hypoxia- and non-hypoxia-related pulmonary hypertension - established and new therapies. *Cardiovasc Res* 2006 October 1;72(1):30-40.
- (35) Gonzalez-Pacheco FR, Caramelo C, Castilla MA, Deudero JJ, Arias J, Yague S, Jimenez S, Bragado R, varez-Arroyo MV. Mechanism of vascular smooth

- muscle cells activation by hydrogen peroxide: role of phospholipase C gamma. *Nephrol Dial Transplant* 2002 March;17(3):392-8.
- (36) Groschner K, Rosker C, Lukas M. Role of TRP channels in oxidative stress. *Novartis Found Symp* 2004;258:222-30.
- (37) Gunther A, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W. Pathophysiology of acute lung injury. *Semin Respir Crit Care Med* 2001 June;22(3):247-58.
- (38) Hall J, Jones TH, Channer KS, Jones RD. Mechanisms of agonist-induced constriction in isolated human mesenteric arteries. *Vascul Pharmacol* 2006 June;44(6):427-33.
- (39) Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 1999 January 21;397(6716):259-63.
- (40) Hopfl G, Ogunshola O, Gassmann M. Hypoxia and high altitude. The molecular response. *Adv Exp Med Biol* 2003;543:89-115.
- (41) Hoshi T, Lahiri S. Cell biology. Oxygen sensing: it's a gas! *Science* 2004 December 17;306(5704):2050-1.
- (42) Huang JS, Ramamurthy SK, Lin X, Le Breton GC. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cell Signal* 2004 May;16(5):521-33.
- (43) Hulme JT, Coppock EA, Felipe A, Martens JR, Tamkun MM. Oxygen sensitivity of cloned voltage-gated K⁺ channels expressed in the pulmonary vasculature. *Circ Res* 1999 September 17;85(6):489-97.
- (44) Jabr RI, Toland H, Gelband CH, Wang XX, Hume JR. Prominent role of intracellular Ca²⁺ release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 1997 September;122(1):21-30.
- (45) Jacobs ER, Zeldin DC. The lung HETEs (and EETs) up. *Am J Physiol* 2001 January;280(1):H1-H10.

-
- (46) Jensen KS, Micco AJ, Czartolomna J, Latham L, Voelkel NF. Rapid onset of hypoxic vasoconstriction in isolated lungs. *J Appl Physiol* 1992 May;72(5):2018-23.
- (47) Jin N, Packer CS, Rhoades RA. Pulmonary arterial hypoxic contraction: signal transduction. *Am J Physiol* 1992 July;263:L73-L78.
- (48) Jolin A, Bjertnaes L. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the adult respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1991;95:40-52.
- (49) Kato M, Staub NC. Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia. *Circ Res* 1966 August;19(2):426-40.
- (50) Kemp PJ. Hemeoxygenase-2 as an O₂ sensor in K⁺ channel-dependent chemotransduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 December 9;338(1):648-52.
- (51) Kemp PJ. Detecting acute changes in oxygen: will the real sensor please stand up? *Exp Physiol* 2006 September;91(5):829-34.
- (52) Kiselyov K, Chen J, Rbaibi Y, Oberdick D, Tjon-Kon-Sang S, Shcheynikov N, Muallem S, Soyombo A. TRP-ML1 is a lysosomal monovalent cation channel that undergoes proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 2005 December 30;280(52):43218-23.
- (53) Knowlton FP, Starling EH. The influence of variations in temperature and blood-pressure on the performance of the isolated mammalian heart. *J Physiol* 1912 May 6;44(3):206-19.
- (54) Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, Olson EN. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest* 2006 December;116(12):3114-26.
- (55) Leach RM, Robertson TP, Twort CH, Ward JP. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1994 March;266:L223-L231.

-
- (56) Lin MJ, Leung GP, Zhang WM, Yang XR, Yip KP, Tse CM, Sham JS. 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. *Circ Res* 2004 September 3;95(5):496-505.
- (57) Littler CM, Morris KG, Jr., Fagan KA, McMurtry IF, Messing RO, Dempsey EC. Protein kinase C-epsilon-null mice have decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 2003 April;284(4):H1321-H1331.
- (58) Liu D, Scholze A, Zhu Z, Krueger K, Thilo F, Burkert A, Streffer K, Holz S, Harteneck C, Zidek W, Tepel M. Transient receptor potential channels in essential hypertension. *J Hypertens* 2006 June;24(6):1105-14.
- (59) Lopez-Barneo J, del TR, Levitsky KL, Chiara MD, Ortega-Saenz P. Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J Appl Physiol* 2004 March;96(3):1187-95.
- (60) Lyrene RK, Philips JB, III. Control of pulmonary vascular resistance in the fetus and newborn. *Clin Perinatol* 1984 October;11(3):551-64.
- (61) Madden JA, Dawson CA, Harder DR. Hypoxia-induced activation in small isolated pulmonary arteries from the cat. *J Appl Physiol* 1985 July;59(1):113-8.
- (62) Madden JA, Vadula MS, Kurup VP. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992 September;263:L384-L393.
- (63) Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54.
- (64) Mark A. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Essays Biochem* 2007;43:61-76.

-
- (65) McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997 July 15;247(2):725-32.
- (66) McMurtry IF. BAY K 8644 potentiates and A23187 inhibits hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *Am J Physiol* 1985 October;249:H741-H746.
- (67) McMurtry IF, Davidson AB, Reeves JT, Grover RF. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ Res* 1976 February;38(2):99-104.
- (68) Mirzabeigi E, Johnson C, Ternian A. One-lung anesthesia update. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2005 September;9(3):213-26.
- (69) Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005 February 22;2005(272):re3.
- (70) Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989 April;2(4):1313-23.
- (71) Motley HL, Cournand A, Werko L, Himmelstein A, Dresdale D. The influence of short periods of induced acute anoxia upon pulmonary artery pressures in man. *Am J Physiol* 1947;150: 315-320.
- (72) Mukerji N, Damodaran TV, Winn MP. TRPC6 and FSGS: the latest TRP channelopathy. *Biochim Biophys Acta* 2007 August;1772(8):859-68.
- (73) Naeije R. Pulmonary vascular function. In Peacock AJ, Rubin LJ (editors): *Pulmonary circulation. Diseases and their treatment*, 2nd edition, published by. Arnold, London , 3-11. 2004.
- (74) Nagendran J, Stewart K, Hoskinson M, Archer SL. An anesthesiologist's guide to hypoxic pulmonary vasoconstriction: implications for managing single-lung anesthesia and atelectasis. *Curr Opin Anaesthesiol* 2006 February;19(1):34-43.

-
- (75) Nakayama H, Wilkin BJ, Bodi I, Molkentin JD. Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *FASEB J* 2006;20: 1660-1670.
- (76) Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995 April;268:C799-C822.
- (77) Nilius B. TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* 2007 August;1772(8):805-12.
- (78) Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007 January;87(1):165-217.
- (79) Oka M, Homma N, Taraseviciene-Stewart L, Morris KG, Kraskauskas D, Burns N, Voelkel NF, McMurtry IF. Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 2007 March 30;100(6):923-9.
- (80) Olschewski A. Hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypertension. In: Peacock AJ and Rubin LJ (editors): *Pulmonary circulation. Diseases and their treatment*, 2nd edition, published by. Arnold, London , 33-44. 2004.
- (81) Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morty RE, Brau ME, Weir EK, Kwapiszewska G, Klepetko W, Seeger W, Olschewski H. Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 2006 April 28;98(8):1072-80.
- (82) Olson KR, Russell MJ, Forster ME. Hypoxic vasoconstriction of cyclostome systemic vessels: the antecedent of hypoxic pulmonary vasoconstriction? *Am J Physiol* 2001 January;280(1):R198-R206.
- (83) Ortega-Saenz P, Garcia-Fernandez M, Pardal R, Alvarez E, Lopez-Barneo J. Studies on glomus cell sensitivity to hypoxia in carotid body slices. *Adv Exp Med Biol* 2003;536:65-73.

-
- (84) Ortega-Saenz P, Pascual A, Gomez-Diaz R, Lopez-Barneo J. Acute oxygen sensing in heme oxygenase-2 null mice. *J Gen Physiol* 2006 October;128(4):405-11.
- (85) Owsianik G, D'hoedt D, Voets T, Nilius B. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2006;156:61-90.
- (86) Patterson RL, van Rossum DB, Nikolaidis N, Gill DL, Snyder SH. Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem Sci* 2005 December;30(12):688-97.
- (87) Peake MD, Harabin AL, Brennan NJ, Sylvester JT. Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species. *J Appl Physiol* 1981 November;51(5):1214-9.
- (88) Peng W, Hoidal JR, Farrukh IS. Role of a novel KCa opener in regulating K⁺ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 April;20(4):737-45.
- (89) Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1992 April;262:C882-C890.
- (90) Prabhakar NR, Dinerman JL, Agani FH, Snyder SH. Carbon monoxide: a role in carotid body chemoreception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 March 14;92(6):1994-7.
- (91) Radeff JM, Nagy Z, Stern PH. Rho and Rho kinase are involved in parathyroid hormone-stimulated protein kinase C alpha translocation and IL-6 promoter activity in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2004 November;19(11):1882-91.
- (92) Rando RR, Kishi Y. Structural basis of protein kinase C activation by diacylglycerols and tumor promoters. *Biochemistry* 1992 March 3;31(8):2211-8.

-
- (93) Rebecchi MJ, Pentyala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 2000 October;80(4):1291-335.
- (94) Riesco-Fagundo AM, Perez-Garcia MT, Gonzalez C, Lopez-Lopez JR. O₂ modulates large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels of rat chemoreceptor cells by a membrane-restricted and CO-sensitive mechanism. *Circ Res* 2001 August 31;89(5):430-6.
- (95) Robertson TP, Aaronson PI, Ward JP. Ca²⁺ sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent. *Am J Physiol* 2003 June;284(6):L1121-L1126.
- (96) Robertson TP, Dipp M, Ward JP, Aaronson PI, Evans AM. Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. *Br J Pharmacol* 2000 September;131(1):5-9.
- (97) Robertson TP, Hague D, Aaronson PI, Ward JP. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J Physiol* 2000 June 15;525 Pt 3:669-80.
- (98) Roth M, Rupp M, Hofmann S, Mittal M, Fuchs B, Sommer N, Parajuli N, Quanz K, Schubert D, Dony E, Schermuly RT, Ghofrani HA, Sausbier U, Rutschmann K, Wilhelm S, Seeger W, Ruth P, Grimminger F, Sausbier M, Weissmann N. Heme oxygenase-2 and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: lung vascular effects of hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 August 15;180(4):353-64.
- (99) Rothberg BS. Allosteric modulation of ion channels: the case of maxi-K. *Sci STKE* 2004 April 6;2004(227):e16.
- (100) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 January 29;239(4839):487-91.

-
- (101) Salvaterra CG, Goldman WF. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993 March;264:L323-L328.
- (102) Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F, Korth M, Shipston MJ, Knaus HG, Wolfer DP, Pedroarena CM, Storm JF, Ruth P. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca^{2+} -activated K^{+} channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 June 22;101(25):9474-8.
- (103) Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005 October;115(10):2811-21.
- (104) Seeger W, Gunther A, Walmrath HD, Grimminger F, Lasch HG. Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome. Pathogenetic role and therapeutic prospects. *Clin Invest* 1993 March;71(3):177-90.
- (105) Seeger W, Lasch HG. Septic lung. *Rev Infect Dis* 1987 September;9 Suppl 5:S570-S579.
- (106) Seeger W, Lasch HG. Respiratory insufficiency. *Internist (Berl)* 1995 April;36(4):318-26.
- (107) Semenza GL. Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994 October;8(5):863-84.
- (108) Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000 April;88(4):1474-80.
- (109) Shibahara S, Han F, Li B, Takeda K. Hypoxia and heme oxygenases: oxygen sensing and regulation of expression. *Antioxid Redox Signal* 2007 December;9(12):2209-25.

-
- (110) Shirai M, Sada K, Ninomiya I. Effects of regional alveolar hypoxia and hypercapnia on small pulmonary vessels in cats. *J Appl Physiol* 1986 August;61(2):440-8.
- (111) Skovgaard N, Abe AS, Andrade DV, Wang T. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in reptiles: a comparative study of four species with different lung structures and pulmonary blood pressures. *Am J Physiol* 2005 November;289(5):R1280-R1288.
- (112) Soboloff J, Spassova M, Xu W, He LP, Cuesta N, Gill DL. Role of endogenous TRPC6 channels in Ca^{2+} signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 December 2;280(48):39786-94.
- (113) Staub NC. Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 1985 October;88(4 Suppl):240S-5S.
- (114) Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 1983 November 3;306(5938):67-9.
- (115) Sutters M, Germino GG. Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular genetics and pathophysiology. *J Lab Clin Med* 2003 February;141(2):91-101.
- (116) Sweeney M, Yu Y, Platoshyn O, Zhang S, McDaniel SS, Yuan JX. Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca^{2+} entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol* 2002 July;283(1):L144-L155.
- (117) Tang XD, Xu R, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T. Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature* 2003 October 2;425(6957):531-5.
- (118) Temes E, Martin-Puig S, costa-Iborra B, Castellanos MC, Feijoo-Cuaresma M, Olmos G, Aragonés J, Landazuri MO. Activation of HIF-prolyl hydroxylases by R59949, an inhibitor of the diacylglycerol kinase. *J Biol Chem* 2005 June 24;280(25):24238-44.

-
- (119) Theissen IL, Meissner A. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Anaesthesist* 1996 July;45(7):643-52.
- (120) Tolins M, Weir EK, Chesler E, Nelson DP, From AH. Pulmonary vascular tone is increased by a voltage-dependent calcium channel potentiator. *J Appl Physiol* 1986 March;60(3):942-8.
- (121) Von Euler US, Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 1946;12: 301-320.
- (122) Vadula MS, Kleinman JG, Madden JA. Effect of hypoxia and norepinephrine on cytoplasmic free Ca^{2+} in pulmonary and cerebral arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993 December;265:L591-L597.
- (123) Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007;76:387-417.
- (124) Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL. Control of TRPC and store-operated channels by protein kinase C. *Novartis Found Symp* 2004;258:172-85.
- (125) Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochowitz Z, Boettger MB, Beck GE, Englehardt RK, Carmi R, Sheffield VC. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* 2002 June;31(2):171-4.
- (126) Wang J, Juhaszova M, Rubin LJ, Yuan XJ. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K^{+} channel alpha subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1997 November 1;100(9):2347-53.
- (127) Wang J, Shimoda LA, Weigand L, Wang W, Sun D, Sylvester JT. Acute hypoxia increases intracellular Ca^{2+} in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative Ca^{2+} entry. *Am J Physiol* 2005 June;288(6):L1059-L1069.
- (128) Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and

- elevated intracellular Ca^{2+} in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2006 June 23;98(12):1528-37.
- (129) Ward JP, Aaronson PI. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: can anyone be right? *Respir Physiol* 1999 May 3;115(3):261-71.
- (130) Waypa GB, Guzy R, Mungai PT, Mack MM, Marks JD, Roe MW, Schumacker PT. Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 2006 October 27;99(9):970-8.
- (131) Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* 2005 January;98(1):404-14.
- (132) Weigand L, Foxson J, Wang J, Shimoda LA, Sylvester JT. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by antagonists of store-operated Ca^{2+} and nonselective cation channels. *Am J Physiol* 2005 July;289(1):L5-L13.
- (133) Weir EK, Archer SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J* 1995 February;9(2):183-9.
- (134) Weir EK, Lopez-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL. Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med* 2005 November 10;353(19):2042-55.
- (135) Weir EK, Olschewski A. Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia. *Cardiovasc Res* 2006 September 1;71(4):630-41.
- (136) Weissmann N, Akkayagil E, Quanz K, Schermuly RT, Ghofrani HA, Fink L, Hanze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F. Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2004 January 15;139(2):191-202.
- (137) Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T. Classical transient

- receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 December 12;103(50):19093-8.
- (138) Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am J Physiol* 2001 August;281(2):L314-L317.
- (139) Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol* 1995 May;100(2):159-69.
- (140) Weissmann N, Sommer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 2006 September 1;71(4):620-9.
- (141) Weissmann N, Tadic A, Hanze J, Rose F, Winterhalder S, Nollen M, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H₂O₂? *Am J Physiol* 2000 October;279(4):L683-L690.
- (142) Weissmann N, Voswinckel R, Hardebusch T, Rosseau S, Ghofrani HA, Schermuly R, Seeger W, Grimminger F. Evidence for a role of protein kinase C in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1999 January;276:L90-L95.
- (143) Weissmann N, Zeller S, Schafer RU, Turowski C, Ay M, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, Grimminger F. Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006 April;34(4):505-13.
- (144) West JB, Dollery CT, Naimark A. Distribution of blood flow in isolated lung; relation to vascular and alveolar pressures. *J Appl Physiol* 1964 July;19:713-24.

- (145) Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C, Kemp PJ. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 2004 December 17;306(5704):2093-7.
- (146) Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005 June 17;308(5729):1801-4.
- (147) Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Invest* 1999 March;103(5):691-6.
- (148) Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 September 21;101(38):13861-6.
- (149) Yu Y, Platoshyn O, Zhang J, Krick S, Zhao Y, Rubin LJ, Rothman A, Yuan JX. c-Jun decreases voltage-gated K⁺ channel activity in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation* 2001 September 25;104(13):1557-63.
- (150) Yuan XJ. Voltage-gated K⁺ currents regulate resting membrane potential and [Ca²⁺]_i in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res* 1995 August;77(2):370-8.
- (151) Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993 February;264:L116-L123.
- (152) Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1990 August;259:H281-H289.

-
- (153) Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Inhibition of cytochrome P-450 reduces voltage-gated K^+ currents in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol* 1995 January;268:C259-C270.
- (154) Zamboni L, DeMartino L. Buffered picric acid-formaldehyde: a new, rapid, fixative for electron microscopy. *J Cell Biol* 1967;35: 148A.
- (155) Zapol WM, Snider MT. Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *N Engl J Med* 1977 March 3;296(9):476-80.
- (156) Zhao J, Zhao B, Wang W, Huang B, Zhang S, Miao J. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and ROS were involved in chicken blastodisc differentiation to vascular endothelial cells. *J Cell Biochem* 2007 October 1;102(2):421-8.
- (157) Zhu D, Birks EK, Dawson CA, Patel M, Falck JR, Presberg K, Roman RJ, Jacobs ER. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is modified by P-450 metabolites. *Am J Physiol* 2000 October;279(4):H1526-H1533.

Veröffentlichungen des Autors

Originalarbeiten:

Roth M, Rupp M, Hofmann S, Mittal M, Fuchs B, Sommer N, Parajuli N, Quanz K, Schubert D, Dony E, Schermuly RT, Ghofrani HA, Sausbier U, Rutschmann K, Wilhelm S, Seeger W, Ruth P, Grimminger F, Sausbier M, Weissmann N. **Heme oxygenase-2 and large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: lung vascular effects of hypoxia.** *Am J Respir Crit Care Med* 2009 August 15;180(4):353-64.

eingereicht:

Fuchs B, Rupp M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T, Dietrich A, Weissmann N. **Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via classical transient receptor potential channel 6.** *Eur Respir J* 2010.

Abstracts:

Markus Rupp, Alexander Dietrich, Beate Fuchs, Herman Kalwa, Ralph Schermuly, Hossein Ardeschir Ghofrani, Werner Seeger, Friedrich Grimminger, Thomas Gudermann, Norbert Weißmann. **Steuerung des Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) – Schlüsselstelle der hypoxischen Vasokonstriktion (HPV).** 49. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, 9. bis 12. April 2008 in Lübeck.

Simone Hoffmann, Markus Roth, Markus Rupp, Manish Mittal, Ralph Schermuly, Hossein Ardeschir Ghofrani, Werner Seeger, Friedrich Grimminger, Norbert Weißmann. **Regulation von Hämoxxygenase 2 und MaxiK α ; in Lungen von hypoxiebehandelten Mäusen.** 49. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, 9. bis 12. April 2008 in Lübeck.

B.Fuchs, M.Rupp, A.Dietrich, H.Kalwa, R.T.Schermuly, H.A.Ghofrani1, N.Sommer, W.Seeger, T.Gudermann, F.Grimminger, N.Weissmann. **Regulation of TRPC6 in the acute phase of hypoxic pulmonary vasoconstriction.** *American Thoracic Society Annual Meeting: San Diego, CA, May 15-20, 2009.*

M. Roth, M. Rupp, S. Hofmann, M. Mittal, N. Sommer, K. Quanz, D. Schubert, E. Dony, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, U. Sausbier, K. Rutschmann, S. Wilhelm, W. Seeger, P. Ruth, F. Grimminger, M. Sausbier, and N. Weissmann. **Vascular effects of heme oxygenase-2 and the B_K-channel in acute, sustained, and chronic alveolar hypoxia.** *American Thoracic Society Annual Meeting: San Diego, CA, May 15-20, 2009.*

B.Fuchs, A.Dietrich, M.Rupp, H.Kalwa, R.T.Schermuly, H.A.Ghofrani, N.Sommer, W.Seeger, F.Grimminger, T.Gudermann, N.Weissmann. **DAG-dependent regulation of TRPC6 in hypoxic pulmonary vasoconstriction.** *19th Annual Congress of the European Respiratory Society, Vienna, September 12–16, 2009.*

Fuchs B, Dietrich A, Rupp M, Schermuly RT, Ghofrani HA, Sommer N1, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T, Weissmann N. **DAG-abhängige Regulierung des TRPC6-Ionenkanals bei akuter hypoxischer pulmonaler Vasokonstriktion.** *Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin – Herbsttreffen Sektion Zellbiologie: München, 25.Oktober 2009.*

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

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

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. N. Weißmann und Herrn Prof. Dr. W. Seeger, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Themenstellung der vorliegenden Arbeit, die Möglichkeit zur Durchführung der wissenschaftlichen Tätigkeit im Rahmen eines Projekts des Sonderforschungsbereiches „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ und die finanzielle Unterstützung bedanken.

Prof. Dr. Weißmann danke ich darüber hinaus für die exzellente Betreuung, die fachliche Kompetenz, die Motivation und die Begeisterung, die er mir für das vorliegende Themengebiet in interessanten Diskussionrunden vermittelt hat.

Dr. Markus Roth und Dr. Natascha Sommer bin ich für zahlreiche Hilfestellungen, inhaltliche Diskussionen und unverzichtbaren fachlichen Rat sehr dankbar. Ihre freundschaftliche Zusammenarbeit hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Akylbek Sydykov, Nirmal Parajuli, Dominic Schubert, Anette Hanschke und Karin Quanz seien für die hervorragende Einarbeitung, stete Geduld und ausgezeichnete Unterstützung bei der Durchführung der Experimente gedankt.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des „Labor Seeger“ und der Arbeitsgruppe Weißmann für das professionelle, freundliche und engagierte Arbeitsklima.

Zum Schluss gilt ein besonderer Dank meinen lieben Eltern Horst und Ute, die mich während des Studiums und der Dissertation jederzeit finanziell und vor allem seelisch und moralisch unterstützt haben. Sie sind der Rückhalt in allen Lebenslagen auf den ich ganz besonders Stolz bin.

Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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 oder nicht 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.“

Gießen, den 13.02.2010

Markus Rupp