

# **Zirkulierende apoptotische Signale während akuter und chronischer Höhenexposition der kirgisischen Population**

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

vorgelegt von Platzek, Simon Maximilian  
aus Rastatt

Gießen (2021)

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Cardio-Pulmonary Institute (CPI)

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Theo Schermuly

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. Henning Gall

Tag der Disputation: 24.11.2021

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Kardiopulmonales System.....	1
1.1.1	Grundlegende Anatomie des Respirationstrakts .....	1
1.1.2	Respiration .....	2
1.1.3	Anschluss des Kardiopulmonalen Systems an die Gesamtzirkulation.....	4
1.1.4	Systematik der Blutgefäße .....	6
1.1.5	Physiologie der pulmonalen Strombahn .....	7
1.2	Pulmonale Hypertonie.....	8
1.2.1	Gruppe 3 der Pulmonalen Hypertonie.....	12
1.3	Bedingungen in großen Höhen und Umwelthyperoxie.....	18
1.4	Akute und chronische Effekte von Hypoxie auf den pulmonalen Kreislauf...20	
1.4.1	Akklimatisation vs. Adaptation.....	21
1.4.2	Akut höheninduzierte Herzkreislaufstörungen.....	22
1.4.3	Chronisch höheninduzierte Erkrankungen .....	24
1.5	Apoptose.....	24
1.5.1	Dysregulierte Apoptose.....	25
1.6	Biomarker.....	27
1.6.1	Kardiopulmonale Marker .....	27
1.6.2	Apoptotische Marker.....	27
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	34
<b>2</b>	<b>Materialien &amp; Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.1	Materialien .....	35
2.1.1	Labortechnische Apparaturen & Instrumente .....	35
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien & Substanzen .....	37
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	38
2.1.4	Puffer, Medien & Lösungen.....	39

## Inhaltsverzeichnis

2.1.5	Kits & Assays.....	40
2.1.6	PCR-Primer .....	41
2.1.7	Software & Websites.....	41
2.1.8	Probenmaterial .....	42
2.2	Methoden.....	43
2.2.1	Histologie .....	43
2.2.1.1	Herstellung eines histologischen Präparats .....	43
2.2.1.2	Histologische Färbungen.....	43
2.2.2	Zellkultur.....	46
2.2.2.1	Splitting .....	46
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
2.2.3.1	Vorbereitungen der Zellkultur.....	47
2.2.3.2	Versuchsaufbau .....	48
2.2.3.3	RNA-Isolation & cDNA-Synthese.....	48
2.2.3.4	Quantitative Real time-PCR (qRT-PCR).....	49
2.2.3.5	Berechnung der relativen mRNA-Expression.....	51
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	51
2.2.5	Apoptose- und Proliferationsassays .....	52
2.2.6	Studiendesign der Humanexperimente.....	53
2.2.7	Anthropometrische Datenerhebung und Echokardiographie .....	55
2.2.8	Plasmaseparation.....	55
2.2.9	ELISA.....	56
2.2.9.1	Testprinzip eines Sandwich-ELISAs .....	56
2.2.9.2	Testprinzip eines kompetitiven ELISAs .....	57
2.2.10	Datenanalyse .....	58
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
3.1	Pulmonalvaskuläres <i>Remodeling</i> unter Hypoxie.....	59

3.2	Variation der Genexpression verschiedener apoptotischer Marker in humanen PSMCs nach hypoxischer Inkubation .....	61
3.3	Zirkulierende Profile apoptotischer Marker in humanen Probanden unter Exposition gegenüber großen Höhen .....	64
3.3.1	Zirkulierende Profile apoptotischer Marker während akuter Höhenexposition kirgisischer Freiwilliger .....	64
3.3.2	Zirkulierende Profile apoptotischer Marker in kirgisischen Hoch- und Flachlandbewohnern .....	68
3.4	Zirkulierende FasL-Konzentrationen sind in kirgisischen Populationen negativ mit TRG-Werten korreliert.....	71
3.5	Fas-Ligand vermittelt pro-apoptische und anti-proliferative Effekte in humanen PSMCs .....	72
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>75</b>
4.1	Generelle Ergebnisse.....	75
4.2	Apoptische Signale als Zielproteine von Interesse .....	75
4.3	Strukturelle Veränderungen pulmonaler Gefäßwände unter Hypoxie.....	77
4.4	Experimentelles Design der in vitro-Studien .....	78
4.5	mRNA-Expressionsprofil verschiedener apoptotischer Marker .....	79
4.6	Experimentelles Design der Humanstudien .....	83
4.7	Plasmakonzentration zirkulierender Marker in akut und chronisch höhenexponierten Probanden .....	85
4.8	Apoptische und proliferative Effekte Fas-Ligands auf hPSMCs.....	87
4.9	FasL im Kontext höheninduzierter PH.....	88
4.10	Fazit & zukünftige Perspektiven .....	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>103</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>10</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>104</b>
<b>11</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>141</b>
<b>12</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>152</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>153</b>



# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Kardiopulmonales System**

Die Funktionseinheit des kardiopulmonalen Systems, bestehend aus dem Herzen (*Cor*) sowie der Lunge (*Pulmo*), ist von entscheidender Bedeutung für den menschlichen Organismus, da dessen Zusammenspiel die Versorgung aller Gewebe mit dem für ihren Stoffwechsel notwendigen Sauerstoff (O<sub>2</sub>) gewährleistet [14]. Dieser wird im Zuge des Gasaustauschs (äußere Atmung) in der Lunge aufgenommen und über den Kreislauf, der durch die Pumpfunktion des Herzens aufrecht erhalten wird, in die Peripherie transportiert [14]. Dort steht er den Zellen der einzelnen Organe zur Energiegewinnung (innere Atmung) und damit der Erhaltung ihrer Organfunktion zur Verfügung [14]. Im gleichen Zug findet der Transport des in den Geweben während des Stoffwechsels angefallenen Kohlenstoffdioxids (CO<sub>2</sub>) von der Peripherie zurück in den pulmonalen Kreislauf statt, um in der Lunge abgeatmet zu werden [14].

### **1.1.1 Grundlegende Anatomie des Respirationstrakts**

Topographisch befindet sich das paarig angelegte, zentrale Atmungsorgan der Lunge im Brustkorb (*Thorax*) des Menschen [14]. Hier liegen die beiden Lungenflügel (*Pulmo dexter et sinister*), getrennt durch den nach medial angrenzenden Mittelfellraum (*Mediastinum*) und das dort befindliche Herz, in ihrer jeweiligen Pleurahöhle (*Cavitas pleuralis*), die nach ventrolaterodorsal durch die Innenseite des Thorax begrenzt wird [320]. Nach kaudal sitzen sie mit ihrer konkaven Basis der Zwerchfellkuppel auf und überragen mit ihrem konvexen Anteil (*Apex pulmonis*) die obere Thoraxapertur um wenige cm nach kranial [320].

Mit Ausnahme des Hilus sind die beiden Lungen vollständig von einer glatten Serosa, dem Lungenfell (*Pleura visceralis*) überzogen [58]. Dieses ist durch den Pleuraspalt vom die Innenseite des Thorax auskleidenden Rippenfell (*Pleura parietalis*) getrennt [58]. Gemeinsam gewährleisten die beiden Pleurablätter mit der von ihnen sezernierten serösen Flüssigkeit die Verschieblichkeit der Lunge und sind somit von entscheidender Bedeutung für die Atemmechanik [14, 58]. Das medial gelegene *Hilum pulmonis*, an dem die beiden Pleurablätter miteinander verschmelzen, bildet den Übergang aller in das Lungenparenchym ein- und austretender Strukturen (inkl. Blutgefäßen, Bronchien, Nerven und Lymphgefäßen) [14].

Das durch den sich dichotom verzweigenden Bronchialbaum und seine begleitenden

Blutgefäße gebildete Lungengewebe lässt sich makroskopisch in sichtbare Lungenlappen unterteilen, die durch Aufzweigung der Hauptbronchien (*Bronchi principales*) in mehrere Lappenbronchien (*Bronchi lobares*) entstehen [320]. Entsprechend der Anzahl ihrer Lappenbronchien besitzt die rechte Lunge drei Lappen (*Lobi*), einen Ober- (*Lobus superior*), einen Mittel- (*Lobus medius*) und einen Unterlappen (*Lobus inferior*), die linke Lunge hingegen nur zwei, einen Ober- (*Lobus superior*) und einen Unterlappen (*Lobus inferior*) [320]. Die einzelnen Lappen der Lungen werden durch Fissuren voneinander getrennt, damit sie sich im Zuge der Atmung ausdehnen und gegeneinander verschieben können [320]. Weiterhin unterteilt sich die Lunge durch die Verzweigung der Lappen- in Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*) in bindegewebig begrenzte, makroskopisch nicht sichtbare Lungensegmente (*Segmenti*) [320]. Die rechte Lunge besitzt zehn, die linke Lunge durch die Ausdehnung des Herzens und des dadurch fehlenden siebten Segments (*Segmentum mediobasale*) nur neun Segmente [320].

### 1.1.2 Respiration

Der Prozess der äußeren Atmung (*Respiration*), bestehend aus der Oxygenierung sowie der Decarboxylierung des vom rechten Herzen kommenden Blutes, als Hauptaufgabe der Lunge bedarf der Teilschritte der Ventilation, Perfusion und Diffusion [14].

#### Ventilation

Zur Belüftung (*Ventilation*) der am Gasaustausch beteiligten Lungenpartien mit sauerstoffreicher und kohlenstoffdioxidarmer Umgebungsluft sind diese auf ihr luftleitendes System angewiesen [102]. Dieses wird weiterhin in einen rein konduktiven (luftleitenden) sowie einen respiratorischen (am Gasaustausch beteiligten) Abschnitt unterteilt [14]. Der konduktive Abschnitt, der maßgeblich den Totraumanteil des Atemzugvolumens (150-170 mL) bestimmt, beginnt zunächst extrathorakal mit der Nasen- (*Cavitas nasi*) bzw. Mundhöhle (*Cavitas oris*) und wird anschließend über deren Vereinigung im Rachen (*Pharynx*), den Kehlkopf (*Larynx*) und die Luftröhre (*Trachea*) fortgesetzt [320]. Diese teilt sich intrathorakal zunächst an der Trachealbifurkation (*Bifurcatio tracheae*) in einen rechten und linken Hauptbronchus (*Bronchus principales dexter et sinister*), der sich (wie bereits im Abschnitt 1.1.1 beschrieben) über die Lappenbronchien weiter in Segmentbronchien aufteilt [320]. Als weitere Teilungsschritte folgen Subsegmentbronchien und *Bronchioli*, bis das konduktive Segment nach ca. 16 Teilungsgenerationen mit den *Bronchioli terminales* endet [102, 254] und das respiratorische Segment mit den *Bronchioli respiratorii* beginnt [215]. Alle von einem *Bronchiolus terminales* versorgten Abschnitte

## Einleitung

einschließlich der noch folgenden Alveolargänge (*Ductuli alveolares*) und Alveolarsäckchen (*Sacculi alveolares*) sind mit Alveolen besetzt und nehmen damit am Gasaustausch teil [14, 260]. Insgesamt besitzt der Mensch ca. 300-400 Millionen Alveolen [14], die durch die Atembewegung und das so entstehende Druckgefälle innerhalb der Atemwege mit Umgebungsluft belüftet werden [274].

### Perfusion

Die Perfusion der Lunge wird durch das blutleitende System des kleinen Kreislaufs (Lungenkreislauf) gewährleistet [14]. Dieser führt sauerstoffarmes Blut ausgehend vom rechten Herzen über den *Truncus pulmonalis* in die sich noch im Mediastinum teilende und die Lungen versorgende rechte und linke Pulmonalarterie (*A. pulmonalis dextra et sinistra*) [14]. Nach Eintritt durch den Hilus teilt sich die *A. pulmonalis* intrapulmonal, dem Verlauf der entsprechenden Bronchien folgend und eng mit diesen verbunden, weiter auf [14], bis ihre Strombahn schließlich im dichtmaschigen, perialveolären Kapillarnetz endet [102, 164]. Dort findet der Gasaustausch zwischen den Lungenkapillaren und dem eng angrenzenden Alveolarraum statt [164].

### Diffusion

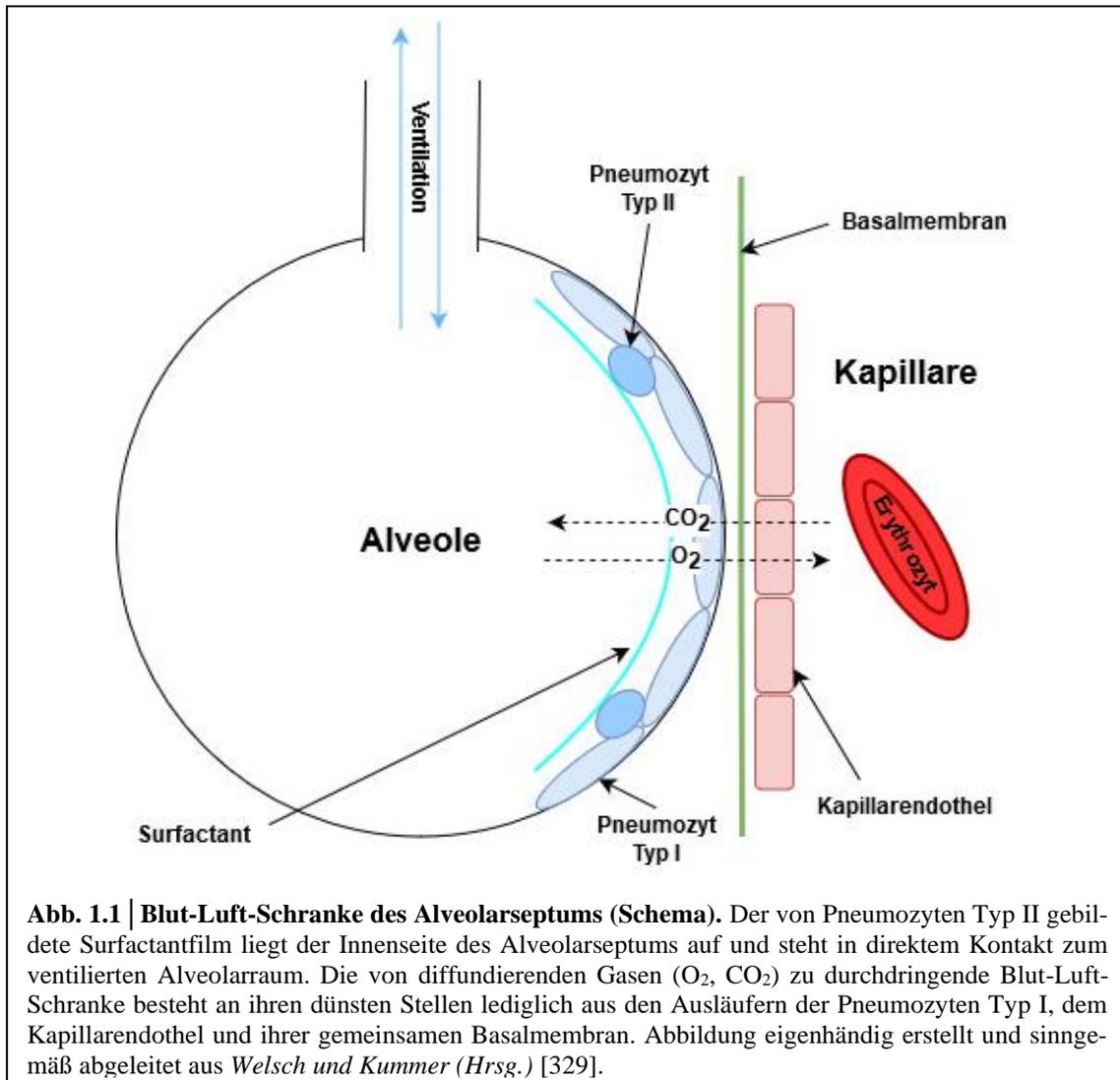
Atemgase diffundieren in der Lunge von den Alveolen ins Blut der Kapillaren und umgekehrt, wobei die Partialdruckdifferenz des jeweiligen Gases die treibende Kraft des Gasaustauschs darstellt [274]. Der Diffusionsstrom ( $J_{Gas}$ ) folgt dabei dem Fick'schen Diffusionsgesetz [274]:

$$J_{Gas} = \frac{K * F}{d} * \Delta P_{Gas}$$

$J_{Gas}$ : Diffusionsstrom,  $K$ : Krogh-Diffusionskoeffizient,  $F$ : Diffusionsfläche,  $d$ : Dicke der Diffusionsschicht,  $\Delta P_{Gas}$ : Partialdruckdifferenz des diffusiblen Gases.

Entlang seines Diffusionsgradienten diffundiert  $O_2$  folglich aus der Atemluft ins Blut ( $pO_2$  arteriell  $\approx 40$  mmHg,  $pO_2$  alveolär  $\approx 100$  mmHg), wohingegen  $CO_2$  vom kapillären Blut in den Alveolarraum diffundiert ( $pCO_2$  arteriell  $\approx 46$  mmHg,  $pCO_2$  alveolar  $\approx 40$  mmHg) [254, 274]. Dabei wird die zu überwindende Diffusionsstrecke ( $d$ ) (Blut-Luft-Schranke) durch den Aufbau der Alveolarwand bestimmt. Diese besteht an ihren dünnsten Stellen lediglich aus Kapillarendothel, den Ausläufern der Pneumozyten Typ I, sowie einer gemeinsamen Basallamina und hat im Mittel nur eine Breite von etwa  $0,6 \mu m$  [164]. Die Diffusionsstrecke von Alveole zum Erythrozyten erhöht sich jedoch durch den von

Pneumozyten Typ II gebildeten, oberflächenaktiven Surfactantfilm und das auf Kapillarseite zu durchlaufende Blutplasma auf etwa  $1,1 \mu\text{m}$  (**Abb. 1.1**) [164]. Neben einer kurzen Diffusionsstrecke erfordert ein effektiver Diffusionsprozess zusätzlich eine erhebliche Austauschfläche, die in der Lunge mit einer Fläche von ca.  $80\text{-}140 \text{ m}^2$  gegeben ist [254]. Aufgrund dieser günstigen Begebenheiten ist die aufgenommene  $\text{O}_2$ -Menge beim Gesunden durch den raschen Ausgleich der Sauerstoffpartialdrücke keineswegs diffusionslimitiert. Vielmehr handelt es sich um einen perfusionslimitierten Gasaustausch [274].

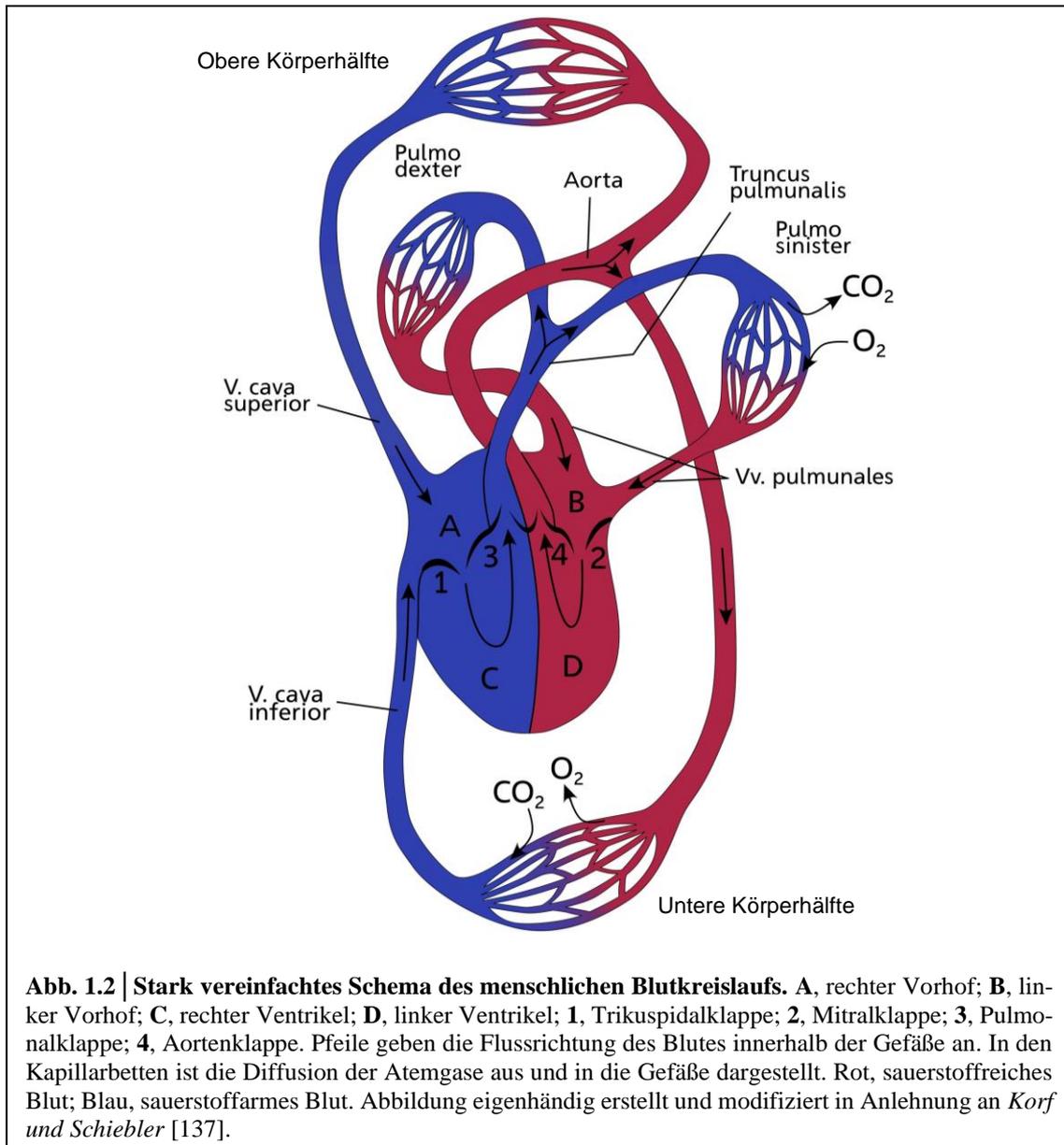


### 1.1.3 Anschluss des Kardiopulmonalen Systems an die Gesamtzirkulation

Im Anschluss an das perialveoläre Kapillarbett verlässt das nun oxygenierte und decarboxylierte Blut die Lunge zunächst über postkapilläre Venolen, die sich im weiteren Verlauf zunächst zwischen den Azini und später im intersegmentalen Bindegewebe zu immer größeren Venen vereinen [58]. All diese fließen im Hilus der beiden Lungen zu je zwei Pulmonalvenen (*Vv. pulmonales*) zusammen, die daraufhin klappenlos im linken Vorhof

## Einleitung

(*Atrium sinister*) münden [58]. Von dort aus gelangt das Blut über die Mitralklappe (*Valva atrioventriculare sinister*) in die linke Kammer (*Ventriculus sinister*) um anschließend während der Systole über die Aortenklappe (*Valva aortae*) in die Hauptschlagader (*Aorta*) und den systemischen Kreislauf ausgeworfen zu werden [14]. Hier verzweigt sich der Gefäßbaum erneut, um über kleinere Arterien und Arteriolen schließlich zum Kapillarbett der peripheren Gewebe zu gelangen [14]. Dort diffundiert Sauerstoff seinem Diffusionsgradienten folgend ins Gewebe und das Blut wird mit  $\text{CO}_2$  angereichert [274].

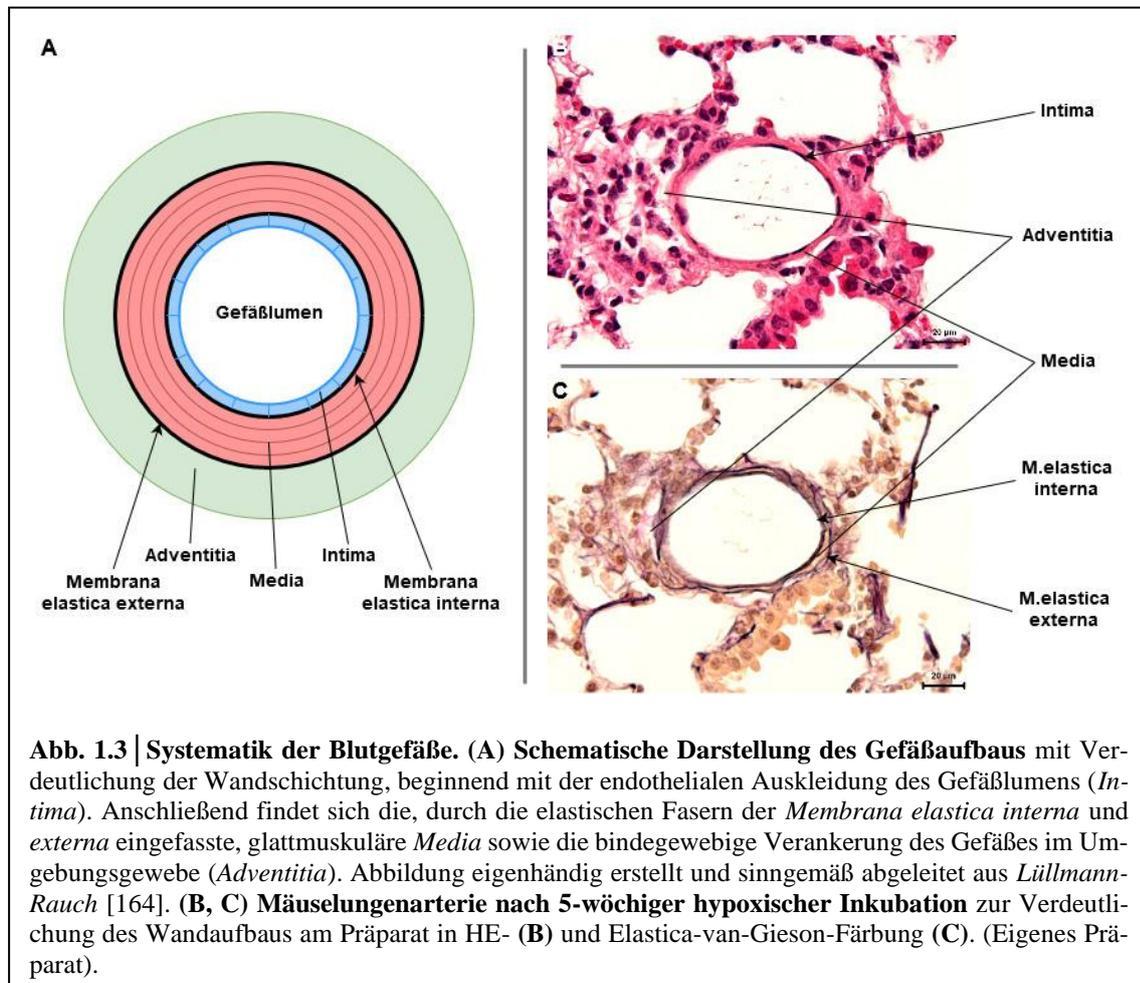


Die sich im Anschluss an die Kapillaren bildenden Venen transportieren nun folglich  $\text{O}_2$ -armes und  $\text{CO}_2$ -reiches Blut, welches über die obere und untere Hohlvene (*V. cava superior et inferior*) in den rechten Vorhof (*Atrium dexter*) gelangt [14]. Von dort aus strömt

es durch die Trikuspidalklappe (*Valva atrioventriculare dexter*) in die rechte Kammer (*Ventriculus dexter*) und weiter über die Pulmonalklappe (*Valva pulmonalis*) und den *Truncus Pulmonalis* in die beiden Pulmonalarterien (*Aa. pulmonales*) [14]. In der Lunge angekommen wird das Blut erneut mit Sauerstoff aufgesättigt und der Kreislauf schließt sich [14] (**Abb. 1.2**). Die Kenntnis der Kreislaufverhältnisse des Körpers ist insbesondere von Bedeutung, um sich die konsekutive Beteiligung von Herz und Lunge im Zuge der Erkrankungen des kardiopulmonalen Systems zu vergegenwärtigen [102, 137].

#### 1.1.4 Systematik der Blutgefäße

Die Systematik der Blutgefäße lässt sich prinzipiell, mit Ausnahme einiger Segmente der Endstrombahn, auf alle Gefäße des menschlichen Organismus anwenden [164]. Angrenzend an das Lumen des Gefäßes findet sich zunächst die *Tunica intima*, eine einschichtige, lückenlose Endothelschicht mit schmalem, subendothelialelem Bindegewebsanteil, die der Abgrenzung des Intravasalraumes vom umgebenden Gewebe dient [164]. Je nach vorherrschendem Gewebe der angrenzenden *Tunica media* lassen sich zwei Gefäßtypen des arteriellen Systems differenzieren [164]. So besitzen überwiegend herznahe Arterien des elastischen Typs ein ausgeprägtes, zweidimensionales Flechtwerk elastischer Fasern, das den glattmuskulären Kern der *Tunica media* nach innen (*Membrana elastica interna*) und nach außen (*Membrana elastica externa*) begrenzt [164]. Wohingegen dieses bei den sich anschließenden Arterien des muskulären Typs zu Gunsten der zur Regulation der Gefäßweite zirkulär verlaufenden glatten Muskulatur deutlich schwächer ausfällt [164]. Den Abschluss des Gefäßes nach außen bildet die *Tunica externa/adventitia*, eine Bindegewebsschicht, die das Gefäß im umgebenden Gewebe verankert [164] (**Abb. 1.3**). Auch wenn Venen prinzipiell die gleiche Wandschichtung aufweisen, ist diese dort häufig weniger deutlich ausgeprägt [164]. Je weiter sich Gefäße des arteriellen Systems der kapillären Endstrombahn nähern, desto mehr weichen diese Strukturen auf [102, 164]. So besteht die Wandung der dort vorzufindenden Kapillaren typischerweise nur noch aus Endothel, der begleitenden Basallamina und einigen wenigen Perizyten, die zur Stabilisierung der Kapillarwand und Differenzierung des Endothels beitragen [164]. Durch diesen Aufbau mit seiner geringen Wandstärke und die riesige Gesamtoberfläche aller Kapillaren werden ideale Diffusionsbedingungen für den dort stattfindenden Gasaustausch geschaffen [164].



### 1.1.5 Physiologie der pulmonalen Strombahn

Die pulmonale Zirkulation zeichnet sich physiologischerweise durch einen hohen Blutfluss sowie niedrige vaskuläre Widerstände aus [169]. Es handelt sich also um ein Niederdrucksystem, das die Blut-Gas-Barriere vor erhöhten intravasalen Drücken schützen und damit einer alveolaren Ödembildung vorbeugen soll [102, 191]. Die Druckverhältnisse innerhalb eines Gefäßsystems lassen sich durch das Ohm'sche Gesetz beschreiben [274]:

$$\dot{Q} = \frac{\Delta P}{R}$$

$\dot{Q}$ : Blutfluss,  $\Delta P$ : Perfusionsdruck,  $R$ : Strömungswiderstand

Der Strömungswiderstand ( $R$ ) des Gefäßsystems ergibt sich dabei näherungsweise durch die Anwendung des Hagen-Poiseuille'schen Gesetzes [274]:

$$R = \frac{l * \eta * 8}{r^4 * \pi}$$

$R$ : Strömungswiderstand,  $l$ : Gefäßlänge,  $\eta$ : Viskosität der Strömungsflüssigkeit,  $r$ : Gefäßradius

Nach Kürzung aller der für den menschlichen Blutkreislauf als konstant anzusehenden Parameter lässt sich die enorme Auswirkung einer Änderung des Gefäßradius auf die Druck- und Flussverhältnisse eines Gefäßes darstellen, da sich der Gefäßwiderstand umgekehrt proportional zu dessen vierter Potenz verhält [102, 274]:

$$R \sim \frac{1}{r^4}$$

*R: Strömungswiderstand, r: Gefäßradius*

Durch diese mathematische Beziehung lässt sich der erhebliche Einfluss pulmonaler Vasokonstriktion sowie des pulmonalvaskulären *Remodelings* mit einer Einengung des Gefäßlumens, wie es beispielsweise im Rahmen der Pulmonalen Hypertonie (PH) auftritt [252], auf den vom rechten Ventrikel aufzubringenden Blutdruck (sog. rechtsventrikuläre Nachlast) verdeutlichen [102, 215].

Physiologischerweise tritt eine solche pulmonale Gefäßverengung im Rahmen der von *Euler* und *Liljestrand* beschriebenen hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (HPV, Euler-Liljestrand-Mechanismus) auf [67]. Während die Gefäße des Körperkreislaufs auf Hypoxie (Sauerstoffmangel) mit einer Dilatation, zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung des umliegenden Gewebes, reagieren [313], antworten die Gefäße des Lungenkreislaufs auf einen solchen Reiz mit Vasokonstriktion [323]. Dieser Mechanismus dient dem Ausgleich lokaler Ventilations-Perfusions-Missverhältnisse. So wird Blut durch den lokal erhöhten Gefäßtonus in besser ventilierte und damit sauerstoffreichere Gebiete der Lunge umgeleitet, um größere intrapulmonale Shuntflüsse zu vermeiden und die O<sub>2</sub>-Aufsättigung des Blutes zu optimieren [274]. Dieser physiologisch wichtige Anpassungsmechanismus lässt sich bereits bei geringer Hypoxie (pO<sub>2</sub> alveolär < 100 mmHg) [327] auslösen und ist unter normoxischen Bedingungen vollständig reversibel [325]. Jedoch kommt es mit zunehmender Chronifizierung der HPV zum Verlust dieser Reversibilität [249]. So kann chronisch hypoxische Exposition, wie beispielsweise während chronischer Höhenthalte oder im Rahmen chronisch hypoxischer Lungenerkrankungen (z.B. COPD), aufgrund der globalen Affektion aller Lungenabschnitte zu irreversibler, globaler, pulmonaler Vasokonstriktion und damit neben weiteren Faktoren zur Ausbildung einer PH führen [102, 326].

## 1.2 Pulmonale Hypertonie

Unter dem Begriff der Pulmonalen Hypertonie (PH) werden verschiedene Krankheitsbilder subsumiert, deren Gemeinsamkeit in einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks

(*pulmonary arterial pressure*, PAP) besteht [107]. Die bisherige, durch die Ende 2015 veröffentlichten ESC/ERS-Leitlinien und andere internationale Empfehlungen beschriebene, Definition der PH besteht aus einer invasiv gemessenen Erhöhung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (mPAP) auf  $\geq 25$  mmHg in Ruhe [81]. Durch das 2018 abgehaltene 6<sup>th</sup> *world symposium on pulmonary hypertension* (WSPH) wurde jedoch eine Modifikation dieser hämodynamischen Definition im Sinne einer Senkung des Schwellenwerts auf  $\geq 20$  mmHg vorgeschlagen [270]. Dabei soll für präkapilläre Formen der PH (Gruppen 1, 3, 4, 5; **Tab. 1.2**) zusätzlich ein pulmonaler Gefäßwiderstand (*pulmonary vascular resistance*, PVR)  $\geq 3$  Wood-Einheiten (WE) gefordert sein [82]. Im Falle der postkapillären PH (Gruppen 2, 5; **Tab. 1.2**), die sich durch einen pulmonalarteriellen Wedge-Druck (PAWP)  $> 15$  mmHg auszeichnet, wird weiterhin in eine isoliert postkapilläre Form (IpcPH) mit einer PVR  $< 3$  WE und einer kombiniert post- und präkapillären Form (CpcPH) mit einer PVR  $\geq 3$  WE unterschieden [82].

Trotz ätiologischer Unterschiede der verschiedenen Formen Pulmonaler Hypertonie charakterisieren sich alle durch exzessive pulmonale Vasokonstriktion sowie abnorme vasculäre Umbauprozesse (*Remodeling*) [301]. Die damit verbundene Querschnittsreduktion des Gefäßlumens und der Verlust an Compliance großer pulmonaler Arterien führen zur Druckerhöhung innerhalb des pulmonalen Kreislaufs und damit zu einer erhöhten rechtsventrikulären Nachlast [72, 252]. Dieser Druckbelastung des rechten Ventrikels folgt konsekutiv die Ausbildung einer Rechtsherzinsuffizienz [212], durch deren Dekompensation eine unbehandelte PH häufig innerhalb weniger Jahre nach Diagnosestellung zum Tod durch Rechtsherzversagen führt [48]. In Anlehnung an die Klassifikation der Herzinsuffizienz nach *New York Heart Association* (NYHA) wurde ebenfalls eine funktionelle, klinische Klassifikation der PH definiert [105].

**Tabelle 1.1:** Funktionelle Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie  
(*Hoepfer et al.* [105], sinngemäß modifiziert)

Klasse	Beschreibung
<b>I</b>	Patienten mit PH ohne Einschränkung der Belastbarkeit. Vollständiges Fehlen von Symptomen oder Beschwerden bei normaler körperlicher Belastung.
<b>II</b>	Patienten mit PH und leichter Einschränkung der Belastbarkeit. Trotz Beschwerdefreiheit in Ruhe treten vermehrt Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakale Schmerzen oder Schwächeanfälle bei normaler körperlicher Belastung auf.
<b>III</b>	Patienten mit PH und starker Einschränkung der Belastbarkeit. Trotz Beschwerdefreiheit in Ruhe treten Dyspnoe, Müdigkeit,

	thorakale Schmerzen oder Schwächeanfälle bereits bei leichter körperlicher Belastung auf.
<b>IV</b>	Patienten mit PH, die körperlich nicht belastbar sind. Ruhesymp-tome in Form von Dyspnoe und Müdigkeit können mit Zeichen der manifesten Rechtsherzinsuffizienz auftreten. Geringste Aktivi-tät steigert die Beschwerden.

## Epidemiologie

Obwohl epidemiologische Daten bezüglich der PH stark variieren, handelt es sich keineswegs um eine seltene Erkrankung [107]. In all ihren Varianten sollen weltweit geschätzt etwa 100 Millionen Menschen von dieser Erkrankung betroffen sein [269]. In der Population der über 65-jährigen soll die Prävalenz der PH global gesehen bereits um ca. 10% liegen [106].

Obwohl chronisch Höheninduzierte Pulmonale Hypertonie (*high-altitude pulmonary hypertension*, HAPH), auf der der Fokus dieser Arbeit liegen soll, ebenfalls keine seltene Erkrankung unter Bewohnern großer Höhen darstellt, ist deren globale Prävalenz unter Höhenbewohnern noch unbekannt [337].

*Aldashev et al.* wiesen jedoch in Studien, durchgeführt an 741 kirgisischen Höhenbewohnern, bei 23% der Männer und 6% der Frauen EKG-Zeichen chronischer Rechtsherzbelastung nach. Von elf der Patienten, die anschließend einer Rechts-Herz-Katheterisierung unterliefen, konnte bei acht ein mPAP > 25 mmHg festgestellt werden [2]. In einer späteren Studie zeigten 27% der 689 Untersuchten entsprechende EKG-Auffälligkeiten und 29 der 44 Patienten, die sich einer Katheteruntersuchung unterzogen, zeigten einen mPAP > 25 mmHg [3]. Daher wurde geschätzt, dass die Prävalenz höheninduzierter PH in ihren Studien ca. 18% betragen hatte [184]. Neuere Studien von *Lichtblau et al.* ergaben durch echokardiographische Untersuchungen an 97 kirgisischen Höhenbewohnern ebenfalls eine Prävalenz der HAPH zwischen 6% und 35% je nach zugrunde gelegtem Grenzwert; ein mPAP  $\geq$  25mmHG konnte dabei bei 27% der Probanden festgestellt werden [157].

In südamerikanischen Studien an Bewohnern des Altiplano ( $\geq$  3.200 Hm) konnten ebenfalls Prävalenzwerte der HAPH zwischen 5 und 18% festgestellt werden [13, 97]. Zudem wurde die HAPH-Prävalenz in ursprünglichen Bewohnern des indischen Spiti-Tals ( $\approx$  3800Hm) mit 3,23% angegeben [200].

## Klinische Klassifikation

Im Jahr 2018 wurde auf dem 6<sup>th</sup> *world symposium on pulmonary hypertension* (WSPH)

in Nizza die bisher aktuellste Version der klinischen Klassifikation Pulmonaler Hypertonie (**Tab. 1.2**) vorgestellt [270].

**Tabelle 1.2:** Aktuelle klinische Klassifikation der PH (Nizza, 2018)  
(Simonneau et al. [270], modifiziert)

<b>Klinische Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (6<sup>th</sup>WSPH, Nizza, 2018)</b>
<b>1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)</b>
1.1 Idiopathische PAH (IPAH)
1.2 Erbliche PAH
1.3 Arzneimittel- und toxininduzierte PAH
1.4 PAH assoziiert mit:
1.4.1 Bindegewebserkrankungen
1.4.2 HIV-Infektion
1.4.3 Portaler Hypertonie
1.4.4 Angeborenen Herzfehlern
1.4.5 Schistosomiasis
1.5 PAH mit Langzeit-Ansprechen auf Kalzium-Kanal-Blocker
1.6 PAH mit offenkundigen Merkmalen venöser/kapillärer (PVOD/PCH) Beteiligung
1.7 Persistierende PH des Neugeborenen Syndrom
<b>2. Pulmonale Hypertonie aufgrund von Erkrankungen des linken Herzens</b>
2.1 PH aufgrund einer Herzinsuffizienz mit erhaltener LVEF
2.2 PH aufgrund einer Herzinsuffizienz mit reduzierter LVEF
2.3 Herzklappenerkrankungen
2.4 Kongenitale/erworbene kardiovaskuläre Bedingungen, die zu post-kapillärer PH führen
<b>3. PH aufgrund von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie</b>
3.1 Obstruktive Lungenerkrankungen
3.2 Restriktive Lungenerkrankungen
3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktivem/obstruktivem Erscheinungsbild
3.4 Hypoxie ohne Lungenerkrankung
3.5 Lungenentwicklungsstörungen
<b>4. PH aufgrund pulmonalarterieller Obstruktion</b>
4.1 Chronisch thromboembolische PH (CTEPH)
4.2 Andere pulmonalarterielle Obstruktionen
<b>5. PH mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen</b>
5.1 Hämatologische Erkrankungen
5.2 Systemische und metabolische Erkrankungen
5.3 Andere
5.4 Komplexe kongenitale Herzerkrankungen
<i>PVOD: Pulmonale venookklusive Erkrankung, PCH: pulmonalkapilläre Hämangiomatose, LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion</i>

Ungeachtet der Vielzahl an Unterformen Pulmonaler Hypertonie soll der Fokus im Hinblick auf die thematische Zielsetzung dieser Arbeit (insbesondere in Bezug auf Pathogenese, Diagnostik und Therapie der PH) auf der 3. Gruppe der PH und speziell der HAPH (Gruppe 3.4, **Tab 1.2**) liegen.

### 1.2.1 Gruppe 3 der Pulmonalen Hypertonie

Die Gruppe 3 der PH wird primär durch alveolare Hypoxie, wie zum Beispiel im Rahmen von Lungenunreife, alveolären Hypoventilationsstörungen, Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankungen (COPD), interstitieller Lungenerkrankungen oder Aufenthalt in großen Höhen hervorgerufen [15, 268].

#### Pathogenese

Die Pathogenese hypoxisch induzierter PH und im Speziellen der HAPH versteht sich nach aktuellem Stand der Forschung als eine Vaskulopathie, getrieben zum Einen durch anhaltende hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion (HPV), zum Anderen durch strukturelle Veränderungen aller drei Schichten der Gefäßwand (pulmonal vaskuläres *Remodeling*) und der damit verbundenen Erhöhung des PAP [333].

Dabei ist der initiale Anstieg des PAP nach Exposition gegenüber Hypoxie der HPV zuzuschreiben [333]. Im Verlaufe chronischer Exposition nehmen strukturelle Veränderungen des vaskulären *Remodelings* jedoch zunehmend mehr Bedeutung ein [210].

#### *Pulmonale Vasokonstriktion*

Wie bereits in Kapitel 1.1.5 beschrieben, stellt der alveoläre  $pO_2$  einen Hauptregulator der HPV, einem physiologischen Mechanismus zur Anpassung der Perfusion an die gegebene Ventilation, dar. Die Ventilation der gesamten Lunge mit einem hypoxischen Gasmisch führt jedoch zu akuter pulmonaler Vasokonstriktion des gesamten Gefäßbetts der Lunge und damit zur Erhöhung des PAP. Der prominenteste Effekt zeigt sich dabei in kleinen pulmonalen Arteriolen [67, 192, 197, 262]. Zudem entstehen Perfusion-inhomogenitäten unter Hypoxie durch ungleichmäßige Verteilung der HPV [54].

Zu Beginn der HPV erreicht diese innerhalb von Minuten ein Maximum, das, getrennt durch eine kurze Periode der Vasodilatation, zunächst in eine andauernde und später umso betontere Phase der Kontraktion übergeht [290]. Diese Kontraktion, deren Phasen, zumindest zum Teil, durch verschiedene Signalwege reguliert werden [326], können durch Faktoren wie neurohumorale Mediatoren, rote Blutzellen und die Innervation der Lunge beeinflusst werden [287].

Alveoläre Kapillaren, die als Ort der  $O_2$ -Sensibilität ausgemacht zu sein scheinen, tragen ihr hypoxisches Signal via endothelialer Membrandepolarisation an stromaufwärts liegende Arteriolen weiter [317], obwohl die dort liegenden glatten Muskelzellen, die Effektorzellen der Kontraktion, ebenfalls über ein solches sensorisches System zu verfügen scheinen [194]. Das Level an *Reaktive Oxygen Species* (ROS) spielt, beeinflusst durch

## Einleitung

NAD(P)H-Oxidasen und Mitochondrien, vermutlich eine entscheidende Rolle innerhalb der O<sub>2</sub>-Detektion, wobei unklar ist, ob ein Anstieg oder der Abfall den entsprechenden Stimulus darstellt [57, 271, 324]. Die spätere Phase der HPV ist getrieben durch endotheliale Sekretion vasoaktiver Substanzen sowie Änderungen des K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Haushalts pulmonal arterieller glatter Muskelzellen (PASMCs) [287, 290].

### *Pulmonalvaskuläres Remodeling*

Unter normalen Umständen ist die pulmonale Gefäßwand einer feinen Balance zwischen Apoptose und Proliferation der ansässigen Zellen unterworfen, um eine optimale Dicke zu gewährleisten. Ist diese Balance zu Gunsten der Proliferation verschoben, führen Verdickung der Gefäßwände und Obliteration des Gefäßlumens zu Erhöhung der PVR [210]. Dieser Umstand wird als vaskuläres *Remodeling* bezeichnet [127].

Der Umbau pulmonaler Gefäße, getriggert durch chronisch alveoläre Hypoxie, konnte bereits in mehreren Spezies einschließlich Ratten, Kühen und Menschen, nachgewiesen werden, obwohl einige andere dagegen resistent zu sein scheinen [4, 10, 103, 232]. Alle Schichten der pulmonalen Gefäßwand – Intima, Media und Adventitia – sind durch diesen betroffen [127]. Das Kennzeichen hypoxieinduzierter PH besteht jedoch vor allem in einer gesteigerten Muskularisierung distaler Gefäße sowie der Ausbreitung glatter Muskelzellen in vormals unmuskularisierte Arteriolen („de novo“ Muskularisierung) [10, 103]. Es resultiert also eine Mediahypertrophie, die auf zellulärer Ebene auf gesteigerte Proliferation und Migration sowie eine Reduktion der Apoptose zurück zu führen ist [333]. Große und mittlere pulmonale Gefäße zeigen eine zunehmende Versteifung [91], die aus gesteigerter Proliferation sowie vermehrten Kollagen- und Elastinablagerungen resultiert [278]. Fibroblasten der Adventitia tragen ebenfalls durch Proliferation und Produktion extrazellulärer Matrixproteine [210] sowie Migration in die Media und dortige Transformation in Myofibroblasten [277] zum *Remodeling* bei. Verglichen mit anderen Formen der PH induziert chronische Hypoxie weniger Alterationen der Intima, vor allem keine Bildung einer Neointima oder plexiformer Läsionen [279].

### *Signaltransduktion*

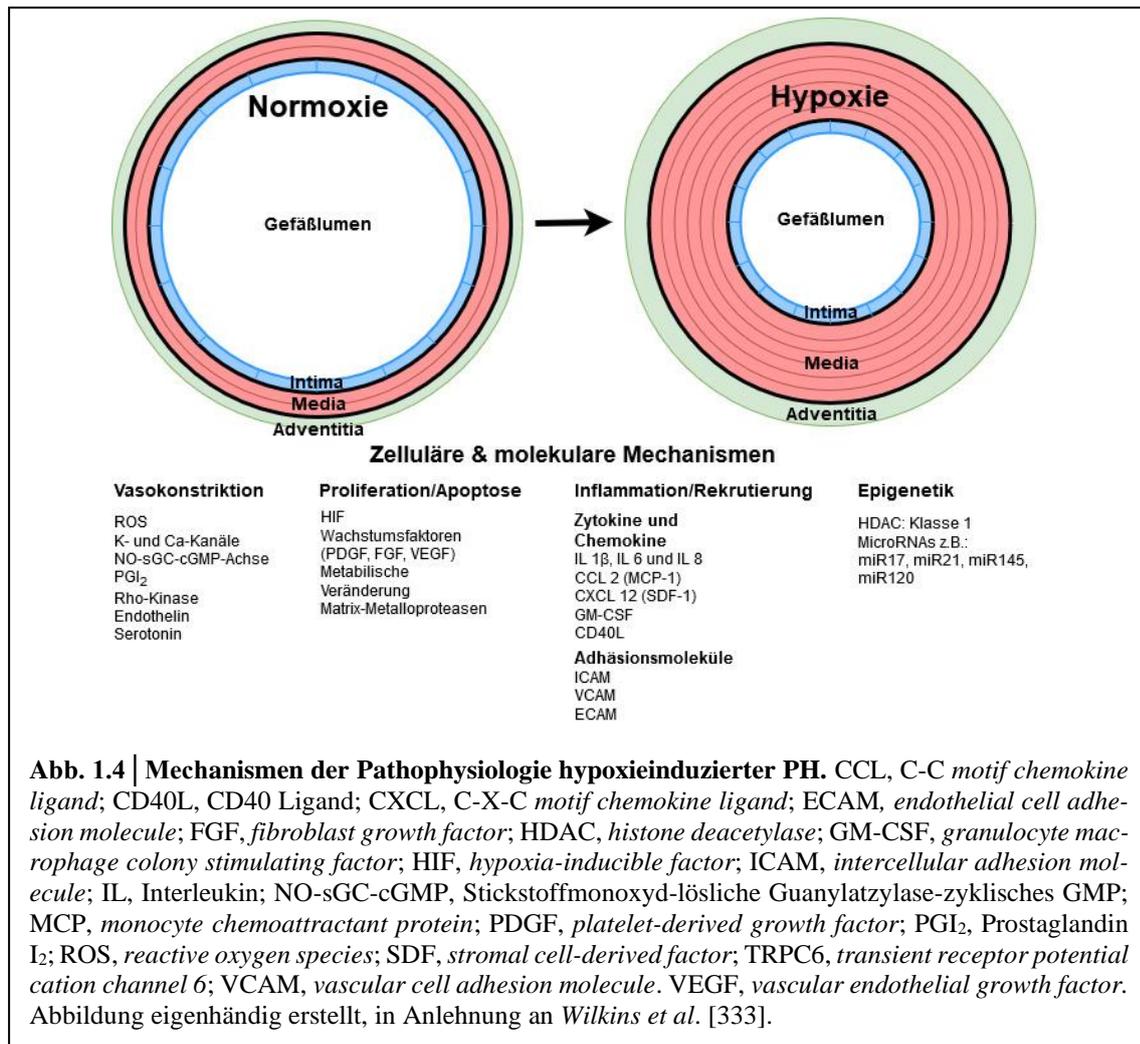
Endotheliale Zellen der Intima sowie Fibroblasten und Blutplättchen nehmen durch parakrine Effekte eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion hypoxisch induzierter PH ein, indem sie erhöhte Level vasoaktiver und pro-proliferativer Mediatoren (z.B. Endothelin 1 (ET-1), TXA<sub>2</sub>, Serotonin, Angiotensin II, vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF)-B, fibroblast growth factor (FGF)) sowie

inflammatorischer Mediatoren (z.B. Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein 1) und reduzierte Level vasodilatatorischer sowie anti-proliferativer Faktoren (z.B. Stickstoffmonoxyd (NO), Prostaglandin I) sezernieren [91, 210, 333, 334]. Des Weiteren produzieren sie vermehrt Adhäsionsmoleküle, Zytokine, prokoagulatorische Faktoren und Matrixproteine, die mit den umliegenden Zellen sowie zirkulierenden Immun- und Progenitorzellen interagieren [210, 278].

Intrazelluläre Signalkaskaden, die direkt durch Hypoxie oder durch zirkulierende Faktoren ausgelöst werden, sind maßgeblich am vaskulären *Remodeling* beteiligt. Dabei werden proliferative, die zelluläre Kontraktilität und Differenzierung steigernde Signaltransduktoren (Tyrosinkinasen, mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK), Proteinkinase C, Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K), Kalziumeinstrom und Rho-Kinasen) aktiviert und antiproliferative Signalwege (reguliert durch cAMP und cGMP) gehemmt [91]. Zudem spielen genetische und epigenetische Faktoren eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der HAPH [278].

Mediatoren zwischen den zuvor erwähnten intrazellulären Signalwegen und dem O<sub>2</sub>-Mangel, die als Sensoren chronischer Hypoxie dienen könnten, schließen die Aktivierung des *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1, Inhibition von Mitochondrien und Alterationen in der Freisetzung von ROS ein [91]. Dabei reguliert HIF Proteine der zellulären Glykolyse und des mitochondrialen Metabolismus wie auch die Transkription verschiedener Proteine wie Erythropoetin und VEGF [266]. Die prominente Rolle von HIF-1 $\alpha$  in der Pathogenese zeigt sich durch eine reduzierte Rate hypoxieinduzierter PH in Mäusen mit PASMC-spezifischem HIF-1 $\alpha$ -*Knock-Out* [344]. Eine unter Hypoxie beobachtete Hemmung des mitochondrialen Metabolismus zu Gunsten glykolytischer Energiegewinnung resultiert in Veränderungen der ROS-Freisetzung, der Aktivierung pro-proliferativer Transkriptionsfaktoren, antiapoptotischer Effekte und einer Alteration der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase [59, 60]. Obwohl ROS mit redoxsensitiven pro-proliferativen und antiapoptotischen Signalwegen interagieren, ist ihre Rolle in akuter und chronischer Hypoxie kontrovers diskutiert, da in verschiedenen Studien eine HIF-Stabilisierung sowohl durch einen Anstieg als auch den Rückgang des zellulären ROS-Levels beobachtet werden konnte [9, 38, 321].

Die zellulären und molekularen Mechanismen der Pathophysiologie hypoxieinduzierter PH werden noch einmal in **Abb. 1.4** zusammengefasst.



## Klinik & Diagnostik

### Klinische Symptomatik

Die klinische Symptomatik der PH gestaltet sich vor allem in den Frühstadien der Erkrankung recht diskret und unspezifisch, wodurch sich die Diagnose häufig bis in relativ späte Stadien der Erkrankung verzögert [208]. Patienten präsentieren sich typischerweise mit zunehmender Luftnot (*Dyspnoe*), die zunächst nur bei Belastung, im weiteren Verlauf jedoch auch in Ruhe wahrgenommen wird und beschreiben zudem häufig eine rasche Ermüdbarkeit [100, 268]. In fortgeschrittenen Stadien können neben einer sich manifestierenden Sinustachykardie, die jedoch auch von Rhythmusstörungen begleitet werden kann, weitere kardiale Symptome in Form von Brustschmerzen sowie Schwindel und Synkopen bei linksventrikulärem Vorwärtsversagen mit systemisch hypotonen Phasen hinzukommen [100, 231, 268]. Als Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz lassen sich im späteren Verlauf häufig Ödeme der abhängigen Körperpartien sowie Zeichen der oberen und unteren Einflusstauung beobachten [231]. In diesem Zusammenhang können auch

Nykturie und Übelkeit auftreten [231]. Patienten mit HAPH klagen häufig über Husten oder Hämoptysen und können aufgrund ihres Höheng Aufenthalts zudem übliche Symptome der chronischen Höhenkrankheit wie eine massive Polyzythämie, Kopfschmerzen, Schlaflosigkeit, kognitive Dysfunktion, Somnolenz oder Verwirrung aufweisen [152, 184, 337].

### *Initiale Diagnostik*

Zu Beginn der Diagnostik steht wie immer zunächst die sorgfältig geführte Anamnese, vor allem hinsichtlich der Initialsymptomatik mit Luftnot, Müdigkeit und reduzierter Leistungsfähigkeit, bei der auch andere Risikofaktoren der PH (z.B. Schlafapnoe, *Indoor*-Luftverschmutzung, Rauchen, Eisenmangel oder erhöhte Blutviskosität durch Erythrozytose [85, 202, 233, 240, 310, 337]) Beachtung finden sollten [184]. Anschließend folgt die körperliche Untersuchung, wobei sich im Falle höheninduzierter PH häufig bereits inspektorisch eine markante Zyanose des Gesichts sowie der Finger, gepaart mit sog. Trommelschlägelfingern und einer uhrglasartigen Wölbung der Nägel feststellen lassen [337]. Ebenfalls lassen sich im Zuge einer sich entwickelnden Rechtsherzinsuffizienz häufig gestaute Halsvenen sowie palpatorisch periphere Ödeme, Hepato- und Splenomegalie, Aszites oder ein hepatojugulärer Reflux nachweisen [79, 184, 337]. Auskultatorisch ergibt sich oft ein prominenter, gespaltener zweiter Herzton sowie in ausgeprägteren Stadien Hinweise auf eine relative Pulmonal- (diastolisches Geräusch) und Trikuspidalinsuffizienz (systolisches Geräusch) [100, 184]. Zudem stellt die Suche nach Zeichen anderer Ursachen eines erhöhten PAP (z.B. Systemische Sklerose) einen essenziellen Bestandteil der körperlichen Untersuchung dar [152, 176].

### *Apparative Diagnostik*

Mehrere apparative Untersuchungsmethoden finden in der Evaluation von Patienten mit eben erwähnter Symptomatik und klinischem Untersuchungsbefund Anwendung. Dabei zeigen sich im EKG häufig Zeichen der rechtsventrikulären Dysfunktion wie ein P-pulmonale, eine Rechtsherzhypertrophie, ein Rechtsschenkelblock oder rechtsventrikuläre Repolarisationsstörungen [100, 184]. Lungenfunktionstests, in denen Bewohner großer Höhen eine geringere ventilatorische Antwort auf Hypoxie aufweisen [151], zeigen bei Patienten mit HAPH endtidal höhere  $p\text{CO}_2$ - sowie geringere  $p\text{O}_2$ -Werte als bei gesunden Höhenbewohnern [144, 151]. Zudem helfen sie andere potentielle Ursachen der PH (z.B. obstruktive oder interstitielle Lungenerkrankungen) auszuschließen [183, 185]. Des Weiteren lassen sich in Röntgenaufnahmen des Thorax häufig eine Hypertrophie des Herzens

## Einleitung

und eine Dilatation des *Truncus pulmonalis* sowie kleinerer pulmonaler Gefäße feststellen [337]. Kearly-B-Linien sind charakteristischerweise jedoch nicht nachweisbar [219]. Die Durchführung einer transthorakalen Echokardiographie (TTE) eröffnet die Möglichkeit anhand intraventrikulärer Septumbewegungen sowie der rechtsventrikulären Wanddicke und Myokardmasse einen Eindruck über den strukturellen und funktionellen Status des Herzens zu gewinnen [177]. Des Weiteren ermöglicht sie die indirekte Bestimmung des PAP durch transtrikuspidale Regurgitationen [230, 337] und den Ausschluss kardialer Ursachen der Symptomatik [34]. Daher eignet sich eine Kombination aus TTE und EKG auch aufgrund ihrer Non-Invasivität gut als *Screening*-Methode der HAPH [136]. Weitere bildgebende Verfahren innerhalb der PH stellen das Cardio-MRT, die CT-Angiographie der Lunge [170, 184] sowie eine Perfusions-Ventilations-Szintigraphie zum Ausschluss einer CTEPH [184] dar.

Die definitive Diagnosesicherung der PH erfolgt jedoch durch eine invasive Untersuchung mittels Rechtsherzkatheter [184]. Diese beinhaltet neben der Erhebung des mittleren PAP (mPAP) ebenfalls die Messung der PVR sowie des PAWP und Herzindexes, wodurch sich sowohl linkskardiale Ursachen der PH ausschließen als auch Aussagen über deren Schweregrad und Prognose treffen lassen [184, 230].

## Therapie

Obwohl sich bereits eine Reihe unterschiedlicher Behandlungsmöglichkeiten (Kalziumkanalblocker, NO-Inhalation, Prostazyklinanaloga, Endothelin-Rezeptorblocker oder Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitoren) [237] in der Therapie der PAH etabliert haben, limitiert sich die wissenschaftliche Literatur zur Behandlung der HAPH auf einige wenige randomisierte Studien [184].

Dabei wird zunächst einmal die Migration der Patienten in geringere Höhenlagen als Therapieform der HAPH empfohlen [184], da diese bereits nach wenigen Jahren zur Normalisierung des mPAP ehemaliger Höhenbewohner führt [267]. Jedoch ist dies aufgrund der persönlichen Lebensumstände vieler Betroffener häufig nicht möglich, sodass medikamentöse Therapieoptionen der HAPH unerlässlich sind.

In diesem Zusammenhang konnte ein positiver Effekt von PDE-5-Inhibitoren, wie Sildenafil oder Tadalafil, in Studien an Patienten mit HAPH nachgewiesen werden [120]. Dabei reduzierte Sildenafil den mPAP und verbesserte die physische Leistungsfähigkeit von HAPH-Patienten, führte weiterhin zur Erhöhung des  $p_aO_2$  und zur Reduktion des maximalen  $O_2$ -Verbrauchs in akut höhenexponierten Probanden [3, 235]. PDE-5-Inhibitoren

wirken durch Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration vasodilatatorisch sowie sekundär antiproliferativ [237].

Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wie Bosentan, die durch Blockade des Vasokonstriktors und Mitogens ET-1 ihre vasodilatatorische und antiproliferative Wirkung entfalten [276], konnten in einer ersten Studie an acht gesunden Probanden, die akut einer Höhe von 3.800 Hm ausgesetzt wurden, keinen senkenden Effekt auf den mPAP zeigen und verschlechterten sogar die O<sub>2</sub>-Sättigung [265]. In einer späteren Studie an Höhenbewohnern mit HAPH konnte jedoch eine Senkung des sPAP durch Bosentan nachgewiesen werden [134].

Acetazolamid, ein Carboanhydrase-Hemmer mit schwachem diuretischen Effekt, der bereits erfolgreich zur Prävention der Akuten Höhenkrankheit eingesetzt wird [26], führte in einer Studie zum Management chronischer Höhenkrankheit zum Anstieg der nächtlichen O<sub>2</sub>-Sättigung sowie zur Reduktion der PVR und der sekundären Polyzythämie [234], wodurch es möglicherweise auch in Patienten mit HAPH eingesetzt werden könnte.

Der Rho A/Rho-Kinase-Inhibitor Fasudil konnte, bei guter Toleranz, in einer Studie an 19 HAPH-Patienten ebenfalls eine senkende Wirkung auf den sPAP nachweisen [135].

Positive Effekte einer Inhalation des Prostazyklinanalogons Iloprost wurden in gesunden Freiwilligen auf einer Höhe von 5.050 Hm untersucht, jedoch konnte keine Verbesserung der unter Höhenbedingungen beeinträchtigten rechtsventrikulären Funktion festgestellt werden [91].

Letztendlich sind weitere Studien zur pharmakologischen Therapie der HAPH dringend erforderlich. Aktuell sollte aufgrund fehlender Langzeitdaten zum Management höheninduzierter PH, idealerweise nach Anraten zur Reduktion der Wohnhöhe und Aufklärung über die limitierte Datenlage, ein informierter Konsens mit Patienten bezüglich deren Behandlung getroffen werden [91, 184].

### **1.3 Bedingungen in großen Höhen und Umwelthyypoxie**

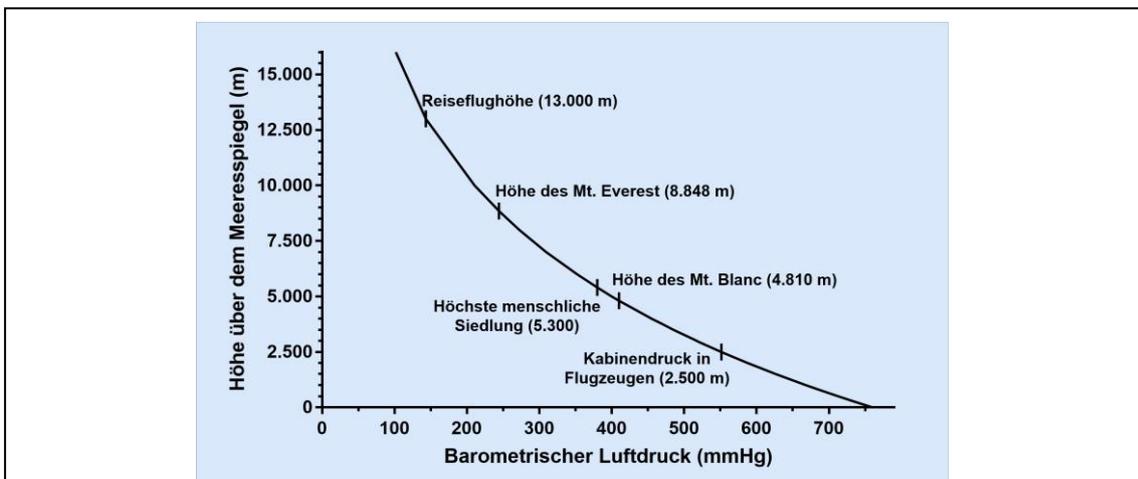
Große Höhen stellen bekanntlich einen durch besondere Herausforderungen geprägten Lebensraum dar, der weltweit keine geringe Verbreitung aufweist [139]. So bestehen größere und dauerhaft bewohnte Gebiete in Höhen  $\geq 2.500$  Hm verteilt über den gesamten Globus; z.B. in den Rocky-Mountains Nordamerikas, den südamerikanischen Anden, dem äthiopischen Hochplateau Ostafrikas, den europäischen Alpen, dem Tibetischen Hochplateau und den Ausläufern des Himalayas in Zentralasien (**Abb. 1.5**) [190, 288].



**Abb. 1.5 | Höhenregionen der Erde.** Weltkarte mit Markierung bewohnter Regionen in Höhen von 2.500 Hm und höher. In Anlehnung an Beall, „human evolution at high altitude“ in Swenson et al. [288].

Abbildung der reinen Weltkarte erstellt durch San Jose („World map blank“, 27.11.2006) und zur freien Vervielfältigung, Veröffentlichung und Bearbeitung lizenziert unter der Creative-Commons-Lizenz „Namensnennung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0“ (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.de>). Abbildung selbst modifiziert durch Markierung bewohnter Höhenregionen  $\geq 2.500$  Hm aus Beall, „human evolution at high altitude“ in Swenson et al. [288] und gemäß Creative-Common-Lizenz unter gleichen Bedingungen zur Weiterverbreitung zu lizenzieren.

Die Umweltbedingungen großer Höhen zeichnen sich neben kalten Temperaturen (Reduktion um ca.  $6^{\circ}\text{C}$  pro 1.000 Hm), intensiver Höhenstrahlung, Trockenheit und starke Winde vor allem durch ein mit steigender Höhe geringer werdendes Sauerstoffangebot in der Atmosphäre aus [31, 331]. Dabei bleibt zwar der fraktionelle Anteil aller in der Atmosphäre befindlichen Gase (78% Stickstoff ( $\text{N}_2$ ), 21%  $\text{O}_2$ , 0,93% Argon (Ar), 0,03%  $\text{CO}_2$  und einige weitere mit geringeren Anteilen) konstant, jedoch sinkt der barometrische Luftdruck ( $P_B$ ) mit steigender Höhe ab [335] (**Abb. 1.6**) und führt folglich zur Reduktion der einzelnen Partialdrücke [31, 331].



**Abb. 1.6 | Barometrischer Luftdruck ( $P_B$ ) in Abhängigkeit vom Höhenniveau.** Abbildung eigenhändig erstellt und angelehnt an Wright [335].

Nach dem Dalton-Gesetz ergibt sich der Gesamtluftdruck ( $P_B$ ) aus der Summe der Partialdrücke seiner Gasanteile [31]:

$$P_B = pN_2 + pO_2 + pAr + pCO_2$$

Errechnet man nun den, für die Sauerstoffaufnahme essenziellen, inspiratorischen Sauerstoffpartialdruck ( $p_iO_2$ ), so ergibt sich, nach Abzug des Wasserdampfdrucks ( $pH_2O$ ) von 47 mmHg bei 37°C Körpertemperatur,

$$p_iO_2 = (P_B - pH_2O) * 0,21$$

auf Meeresniveau ( $P_B \approx 760$  mmHg) ein  $p_iO_2$  von 149,7 mmHg, wohingegen auf dem Gipfel des Mount Everest ( $P_B \approx 251$  mmHg) nur noch ein  $p_iO_2$  von ca. 42,8 mmHg gegeben ist [31]. Es herrscht also eine Hypoxie der Atemluft.

#### **1.4 Akute und chronische Effekte von Hypoxie auf den pulmonalen Kreislauf**

Trotz der eben erwähnten ungünstigen Bedingungen großer Höhen, die als Regionen höher als 2.500 Hm definiert werden [22], leben etwa 140 Millionen Menschen dauerhaft in diesen [218]. Hinzu kommen etwa 35 Millionen, die jedes Jahr in Höhenregionen über 2.500 Hm reisen und akut diesen Bedingungen ausgesetzt werden [173]. Dazu bedarf es sowohl akuter als auch chronischer Anpassungsprozesse.

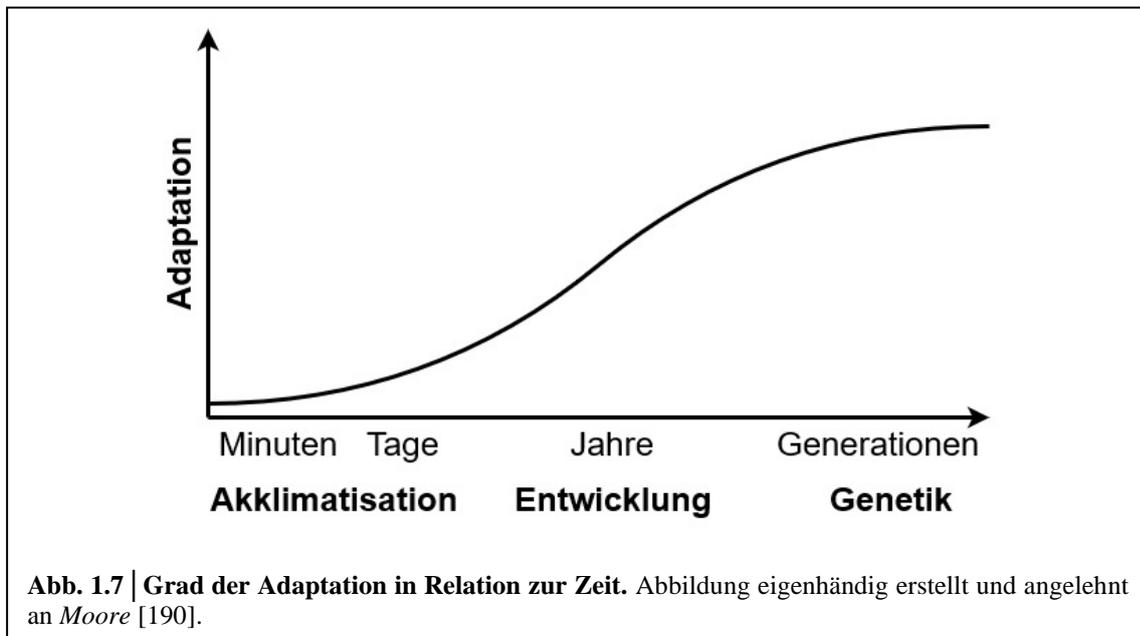
So führt Exposition gegenüber Hypoxie und großen Höhen zu verschiedenen Reaktionen des kardiopulmonalen Systems. Bereits innerhalb der ersten Sekunden nach Exposition gegenüber Hypoxie steigt das Herzzeitvolumen (HZV) in Ruhe durch Erhöhung der Herzfrequenz (HF) an, um eine ausreichende  $O_2$ -Versorgung des Gewebes zu gewährleisten [196]. Nach zwei bis drei Tagen fällt das HZV jedoch durch Reduktion des Schlagvolumens bei weiterhin erhöhter HF auf das Ausgangsniveau zurück [133, 312]. Die  $O_2$ -Versorgung bleibt dabei durch stärkere  $O_2$ -Ausschöpfung des Blutes gewährleistet. Dabei führen erhöhte 2,3-Bisphosphoglyceratkonzentrationen innerhalb der Erythrozyten zur Reduktion der  $O_2$ -Affinität dieser und zur Liberation des  $O_2$  ins Gewebe, obwohl dadurch auch die pulmonale  $O_2$ -Aufnahme beeinträchtigt wird [333]. Zudem kommt es rasch zur Erhöhung der Erythrozyten-Konzentration, zunächst im Rahmen der Dehydratation [330] durch Tachypnoe in trockener Atmosphäre und Diurese [89, 111, 294], nach drei bis vier Wochen durch das bereits nach 24-48h stark angestiegene und zum Ende der ersten Woche wieder abgefallene Erythropoetin [28, 251]. Jedoch haben

erhöhte Erythrozytenzahlen auch Nachteile und können durch gesteigerte Blutviskosität zur Erhöhung des PAP beitragen [333]. Eine weitere Reaktion stellt die hypoxisch ventilatorische Antwort (HVR), mit einer Erhöhung der Atemfrequenz sowie des Tidalvolumens, dar. Die HVR als eine direkte Antwort auf den sinkenden arteriellen  $pO_2$  kann die alveoläre Ventilation akut bis auf das 5-fache steigern [91]. Nach einigen Tagen stellt sich jedoch das Ausgangsniveau der Ruheventilation wieder ein [322]. Wie bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben, führt Umwelthyperoxie zur globalen HPV der Lunge und kann sowohl durch Erhöhung des PAP zur PH als auch durch Inhomogenitäten der Perfusion zum Höhenlungenödem (HAPE) führen [91].

### 1.4.1 Akklimation vs. Adaptation

Innerhalb der physiologischen Anpassungsprozesse, die ein Leben unter den Bedingungen großer Höhe erleichtern oder sogar erst ermöglichen, muss zwischen den Begriffen der Akklimation und Adaptation unterschieden werden.

Dabei handelt es sich bei der Akklimation um Anpassungen individueller Organismen innerhalb weniger Stunden bis Tage als Reaktion auf Umweltstressoren [190]. Diese sind in der Regel kurz, limitiert und nicht auf künftige Generationen übertragbar. Adaptation hingegen beschreibt einen evolutionär getriebenen Prozess zur Entwicklung verschiedener Mechanismen um sich gegen ungünstige Lebensbedingungen zu behaupten und zu reproduzieren [190] (**Abb. 1.7**). Bestes Beispiel hierfür stellen Tibeter dar, die nach 25.000 Jahren genetischer Höhenanpassung [91] verglichen mit Flachlandbewohnern und selbst mit anderen ethnischen Höhenbewohnern weniger anfällig für die chronische Höhenkrankheit (CMS) oder HAPH zu sein scheinen [92, 219, 336]. So konnten unter anderem genetische Variationen des HIF-Signalwegs festgestellt werden, die mit geringeren Hb-Konzentrationen bei Tibetern korrelieren, was durch Reduktion der Blutviskosität einen wichtigen Faktor in der Anpassung an große Höhen darstellen könnte [32, 221, 338, 341]. Entwicklungsbezogene Veränderungen stellen ein Zwischenglied zwischen genetischer Variation und kurzfristiger individueller Akklimation dar [190]. So entwickeln beispielsweise in der Höhe aufwachsende Bewohner der Anden im Laufe ihrer Entwicklung kleinere Staturen, größere Brustumfänge und eine höhere Belastungskapazität als jene in niedrigeren Regionen [77, 90, 150].



### 1.4.2 Akut höheninduzierte Herzkreislaufstörungen

Akute Exposition nicht akklimatisierter Personen gegenüber großen Höhen können je nach Schwere dieser zur Akuten Höhenkrankheit (AMS) oder zu durchaus lebensbedrohlichen Erkrankungen wie dem Höhenlungen- (HAPE) oder Höhenhirnödem (HACE) führen [24, 139, 288].

AMS beschreibt dabei eine benigne und in der Regel nach drei bis vier Tagen selbstlimitierende, unspezifische Kombination verschiedener Symptome, die meist sechs bis zwölf Stunden nach Ankunft in Höhen über 2.500 Hm auftreten [24, 25]. Typischerweise kommt es zu Kopfschmerzen und zumindest einem weiteren der Symptome: Appetitverlust, Übelkeit, Erbrechen, Schwindel, Schlaflosigkeit und Erschöpfung [24, 288]. Zur zugrundeliegenden Pathogenese gibt es mehrere Hypothesen. Zum einen eine hypoxieinduzierte Perfusionserhöhung des ZNS [29, 119, 273], begleitet durch gestörte Autoregulation und dem Anstieg zirkulierender Radikale und VEGF [17–20, 298, 306], die durch erhöhte Permeabilität zum extrazellulären Ödem führt [124]. Zum anderen ein intrazelluläres Ödem, hervorgerufen möglicherweise durch eine Störung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  [88, 124, 259], wodurch es durch gesteigerte astrozytale NO-Synthese [175] in Kombination mit membrandestabilisierenden, freien Radikalen und VEGF zur Irritation trigeminaler Fasern und damit zum typischen Kopfschmerz kommt [27].

In schweren Fällen des AMS, in denen keine Gegenmaßnahmen ergriffen oder weiter aufgestiegen wurde, kann es zum lebensbedrohlichen HACE kommen. Dabei treten typische Zeichen wie Bewusstseinsveränderungen oder Ataxie auf. Im weiteren Verlauf kann

## Einleitung

das HACE jedoch auch zum Koma und Tod durch zerebrale Herniation führen [24]. Eine extrazellulärer Flüssigkeitsverlagerung [125] durch Extravasation, in Folge einer Hyperperfusion [288], sowie ein cytotoxisches Zellödem [96] sollen dabei für die Erhöhung des intrakraniellen Drucks verantwortlich sein.

Im Falle des HAPE kommt es durch globale, jedoch inhomogene HPV [54] zur Exsudation in hyperperfundierten Lungenabschnitten [112, 289]. Dies manifestiert sich radiologisch zunächst als fleckiges und sich im Verlaufe weiter ausbreitendes Lungeninfiltrat [311] sowie in der BAL durch ein proteinreiches, Erythrozyten enthaltendes Exsudat als Zeichen einer Hämorrhagie [256, 289]. Es tritt typischerweise innerhalb der ersten zwei bis vier Tage nach Ankunft in Höhen  $> 2.500$  Hm auf [91] und präsentiert sich mit Symptomen wie Atemnot, Tachykardie, Zyanose sowie initial trockenem Husten, der sich im weiteren Verlauf häufig als produktiv mit weißem bis pinkem Sputum darstellt [24, 331]. Zur Prävention akuter Erkrankungen der Höhe ist vor allem eine adäquate Akklimatisation von Nöten, die durch einen langsamen Aufstieg ( $< 300$  Hm/d) und eingestreute Ruhetage ohne Höhengewinn gewährleistet werden kann [115, 195]. Zudem sind Acetazolamid, eingenommen ab dem letzten Tag vor Beginn des Aufstiegs, sowie Dexamethason zur Prävention der AMS sowie des HACE geeignet [64, 130, 161, 163, 188]. Ebenfalls bestehen mehrere medikamentöse Optionen, in Form von Nifedipin [23], Dexamethason sowie PDE-5-Inhibitoren [167] zur Prävention des HAPE.

Eine Reduktion der Höhe als ideale Behandlungsform akut höheninduzierter Erkrankungen lässt sich im Falle der häufig selbstlimitierenden AMS in Hoffnung auf Besserung ggf. zwei bis drei Tage aufschieben, wohingegen sie zur Behandlung des HACE und HAPE so schnell wie möglich erfolgen sollte [331]. Zudem stellt Dexamethason eine mögliche Behandlung des prolongierten AMS sowie des HACE dar [64, 116, 188], wobei dessen Potential im Falle des HACE vor allem in der Stabilisierung des Patienten bis zum nötigen Abstieg liegt [257, 258]. Bei einem sich entwickelnden HAPE kann zusätzlich zum so schnell wie möglich unternommenen Abstieg eine O<sub>2</sub>-Therapie sowie eine Medikation mit Nifedipin eingeleitet werden [24, 163, 201]. In Fällen von HACE und HAPE, in denen ein Abstieg nicht möglich ist, stehen zur Überbrückung ebenfalls tragbare Überdruckkammern zur Verfügung, in denen sich ein Drucklevel wie auf ca. 1.500 Hm erzeugen lässt [74, 126].

### 1.4.3 Chronisch höheninduzierte Erkrankungen

Unter den durch chronischen Höheng Aufenthalt induzierten Erkrankungen werden sowohl die Chronische Höhenkrankheit (CMS) als auch die höheninduzierte PH (HAPH), auf die im Kapitel 1.2.1 bereits ausführlich eingegangen wurde, subsumiert [331].

Die CMS, entwickelt von Bewohnern großer Höhenlagen, ist eine Erkrankung, die sich durch schwere Hypoxämie sowie exzessive Erythrozytose, begleitet von neurologischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Schwindel und Müdigkeit, auszeichnet [152, 337]. Dabei wird eine Hämoglobinkonzentration  $\geq 21$  g/dL für Männer und  $\geq 19$  g/dL für Frauen gefordert [152]. Zudem kann die Polyzythämie durch eine PH, als Teilmenge der CMS, begleitet werden, die jedoch keine Grundvoraussetzung dieser darstellt [333].

Die Pathogenese der CMS ist bisher nur unzureichend verstanden [331]. Dabei könnte sowohl Hypoventilation durch die folgende Hypoxämie die Ursache der Erythropoese darstellen [220] als auch eine primäre Polyzythämie durch Reduktion des  $p\text{CO}_2$  zur Hypoventilation führen [333].

Mögliche Therapieformen der CMS bestehen in regelmäßigen Phlebotomien sowie der Applikation von Acetazolamid [331, 333]. Dabei führt Acetazolamid sowohl zum Anstieg des  $p_a\text{O}_2$  und der  $\text{O}_2$ -Sättigung als auch zur Reduktion des Hämatokrit und des  $p_a\text{CO}_2$  [236]. Die einzige Heilung der Betroffenen besteht hingegen in der Migration in geringere Höhenlagen, was jedoch für viele der Patienten aus persönlichen Gründen nicht möglich ist [333].

## 1.5 Apoptose

Zum Funktionserhalt von Organen sowie lebender Organismen im Allgemeinen ist eine feine Balance zwischen Zellproliferation auf der einen sowie Zelltod auf der anderen Seite essenziell [131, 141, 210]. Dabei stellt Apoptose eine Form des regulierten Zelltodes dar, dessen spezifische molekulare Maschinerie in Form verschiedener Signalwege empfindlich auf intra- sowie extrazelluläre Stimuli reagiert und durch Aktivierung zum Zelluntergang führt [83].

Dieser energieabhängige Prozess betrifft in der Regel einzelne überschüssige, gealterte, dysfunktionale oder durch äußeren Stress geschädigte Zellen und zeigt dabei spezifische pathomorphologische Eigenschaften [108, 168]. Zu diesen zählen zunächst eine Kondensation des Chromatins mit Schrumpfung des Zellkerns gefolgt von einer Blasenbildung der Plasmamembran, der Fragmentierung des Zellkerns und schließlich einer Fragmentierung der gesamten Zelle in apoptotische Partikel, die anschließend von Granulozyten

und Makrophagen phagozytiert werden [99]. Dadurch bleibt charakteristischerweise eine Inflammation des umgebenden Gewebes aus [108]. Fließende Übergänge zwischen der Apoptose und anderen Formen des Zelltods sind jedoch möglich [44, 45, 108, 149, 160, 205, 275].

Eine entscheidende Rolle innerhalb der apoptotischen Signalkaskade wird durch Caspasen eingenommen, die sowohl als Initiatorcaspasen die Weiterleitung des apoptotischen Signals innerhalb der Kaskade gewährleisten als auch als Effektorcaspasen definierte zelluläre Moleküle attackieren und so zu den typischen biochemischen und morphologischen Eigenschaften der Apoptose führen [108]. Dabei kann Apoptose durch verschiedenste, sowohl intrinsische als auch extrinsische, Signalwege induziert werden [109].

Einige der für die Arbeit relevanten ex- und intrinsischen Signalwege der Apoptose werden in **Abb. 1.8** dargestellt. Auf die Rolle einzelner Bestandteile dieser soll im Kapitel 1.6.2 „Apoptotische Marker“ weiter eingegangen werden.

### **1.5.1 Dysregulierte Apoptose**

Während der embryonalen Entwicklung oder der Entstehung immunologischer Toleranz besteht physiologischerweise eine Imbalance des Gleichgewichts zwischen Apoptose und Proliferation [141, 226]. Eine Fehlregulation dieses Gleichgewichts kann jedoch zu fatalen Konsequenzen für die Funktion einzelner Organsysteme sowie die Integrität des gesamten Organismus führen. So können maligne Tumoren durch eine Resistenz ihrer Zellen gegenüber Apoptose und exzessive Proliferation massiv expandieren [108]. Umgekehrt könnte eine stark gesteigerte Apoptose in Kombination mit verminderter Proliferation ebenso fatal sein [108].

Solche Ungleichgewichte bestehen in der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen; darunter Ischämien, degenerative Erkrankungen wie AIDS, toxinvermittelte oder Autoimmunerkrankungen und viele Krebsformen [68, 87, 108, 239, 244]. Doch auch die PH zeichnet sich im Rahmen ihres vaskulären Remodelings (Kapitel 1.2.1) durch gesteigerte Proliferation der Zellen innerhalb der pulmonalen Gefäßwand [210] sowie eine Reduktion der Apoptose dieser aus [227, 345].



## 1.6 Biomarker

### 1.6.1 Kardiopulmonale Marker

Aufgrund der engen Beziehung der pulmonalen Strohbahn zur Hämodynamik des Herzens finden kardiale Marker Anwendung in der Diagnostik und Prognostik der PH [81].

#### **BNP**

Das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) ist ein endogenes Peptidhormon, das vornehmlich in den Ventrikeln des Herzens als Reaktion auf ventrikulären Stress im Sinne erhöhter Wandspannung sowie Druck- und Volumenbelastung synthetisiert und freigesetzt wird [63, 245]. Dabei wird das synthetisierte Pro-BNP durch Serinproteasen in das inaktive Nebenprodukt N-terminales-pro-BNP (NTproBNP) und die aktive Komponente BNP, die an den Natriuretischen-Peptid-Rezeptor A bindet, gespalten bevor diese freigesetzt werden [84, 114]. Die Bindung von BNP vermittelt eine gesteigerte Diurese, Natriurese, arterielle und venöse Vasodilatation sowie eine Antagonisierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. In Summe führen diese Einzeleffekte zur Reduktion des intravasalen Volumens sowie der ventrikulären Vor- und Nachlast [63].

Aufgrund ihrer Eigenschaft als Marker für myokardialen Stress stellen BNP aber auch NTproBNP weit verbreitete Biomarker in der Diagnostik der PH und Herzinsuffizienz dar [81, 206]. Obwohl sowohl BNP als auch NTproBNP aufgrund ihrer Erhöhung durch die meisten Herzkrankheiten nicht spezifisch für die PH sind, korrelieren sie jedoch mit der myokardialen Funktion sowie der Belastungskapazität nach NYHA [153] und lassen daher Rückschlüsse auf die Prognose der Erkrankung sowie deren Mortalität zu [70, 78, 154, 199, 319]. Dabei scheint es keine klaren Vorteile in der Verwendung von BNP versus NTproBNP zu geben, da BNP zwar weniger durch die Nierenfunktion beeinträchtigt wird und die etwas engere Korrelation zur pulmonalen Hämodynamik zu haben scheint, NTproBNP jedoch den stärkeren Prognoseprädiktor darzustellen scheint [154].

### 1.6.2 Apoptotische Marker

Apoptotische Marker sind auf verschiedensten Ebenen der apoptotischen Signalkaskade involviert. Rezeptoren der Zelloberfläche akzeptieren dabei apoptotische Signale spezifischer Liganden und leiten diese über die Zellmembran an eine Kette intrazellulärer Enzyme weiter, die moduliert durch Inhibitoren und Verstärker letztendlich zur Degradierung und Externalisierung spezifischer Zellstrukturen führen (**Abb. 1.8**) [108].

## Fas-Ligand

Fas-Ligand (FasL), ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie (TNFSF), stellt einen apoptoseinduzierenden Faktor dar, der sowohl in zellgebundener als auch löslicher Form vorkommt [293]. Er bindet an den zellgebundenen Fas-Rezeptor, ein weithin exprimiertes, glykosyliertes Transmembranprotein, dessen zytoplasmatischer Teil sog. Todes-Domänen (*death domain*, DD) trägt, die essenziell für die Initiation der Apoptose sind [5, 198, 222, 250]. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Aktivierung und Trimerisierung des Rezeptors wodurch es zur Anlagerung zytosolischer Proteine an die DDs und zur Bildung des DISC (*death-inducing signalling complex*), bestehend aus dem Fas-Rezeptor, dem Adaptermolekül FADD (*Fas-associated with a death domain*), den Procaspasen 8 und 10 sowie dem Apoptoseregulator FLIP, kommt [11, 222, 223]. Die durch diesen Komplex dimerisierte und aktivierte Caspase 8 leitet dann durch Spaltung weiterer intrazellulärer Proteine die apoptotische Signalkaskade ein, die im apoptotischen Zelluntergang endet (**Abb. 1.8**) [180].

Die Produktion löslicher Formen Fas-Ligands ist zum einen vermutlich auf proteolytische Spaltung der membrangebunden Form unter anderem durch Metalloproteasen zurückzuführen, zum anderen könnte eine solche Form durch verschiedene Spleißvarianten des FasL-Gens hervorgerufen werden [128, 158]. Über die exakte apoptotische Funktion löslichen Fas-Ligands im Vergleich zu seiner membrangebunden Form bestehen bisher kontroverse Debatten innerhalb der wissenschaftlichen Literatur [158]. Dabei scheint die apoptotische Aktivität des löslichen FasL wohl unter anderem vom Grad seiner Multimerisierung abhängig zu sein [155]. Während die homotrimere Form des löslichen FasL durch einige Studien als unfähig zur Induktion des Zelltods beschrieben wird und über Formation des MISC (*motility-inducing signaling complex*) alternative, pro-inflammatorische Signalwege anstößt [95, 155], erlaubt eine Akkumulation oder weitere Oligomerisation dessen in gewissen Pathologien die Initiation der apoptotischen Signalkaskade [21, 101, 155]. So fördert z.B. eine Oxidation löslichen Fas-Ligands an Methionin 224 und 225 dessen Aggregation in Patienten mit ARDS und dadurch dessen pro-apoptotische Eigenschaften [101]. Ebenfalls existieren durch alternatives Spleißen lösliche Formen des Fas-Rezeptors, die durch Blockade Fas-Ligands zur Regulation der Apoptose beitragen [216, 250].

Aufgrund ihrer Bedeutung innerhalb des extrinsischen Signalwegs der Apoptose wurden sowohl der anti-apoptotisch wirksame, lösliche Fas-Rezeptor als auch der lösliche Fas-

## Einleitung

Ligand häufig als zirkulierende Marker im Blut von Krebspatienten untersucht, wo erhöhte Serumlevel beider Marker in verschiedensten Krebsformen festgestellt werden konnten [109] und teilweise mit Prognose und Krankheitsstadium korrelierten [187, 209, 300]. Sie konnten ebenfalls mit erhöhter Serumkonzentration in Herzinsuffizienzpatienten nachgewiesen werden, wobei das Serumlevel des löslichen Fas-Rezeptors auch hier als prognostisch relevant identifiziert wurde [158, 204]. Weiterhin konnte FasL bereits durch Studien zur Therapie mit Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) in Verbindung mit PAH gebracht werden [1].

### **TRAIL**

Der *tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) ist ein weit verbreitetes, jedoch besonders in Lunge, Milz und Prostata exprimiertes, Zytokin der *death receptor ligand*-Familie, das fünf verschiedene Rezeptoren binden kann [86, 332]. Dazu zählen die membrangebunden Todesrezeptoren (*death receptor*, DR) DR4 (TRAIL-R1) und DR5 (TRAIL-R2), die membrangebunden „Köder“-Rezeptoren (*decoy receptor*, DcR) DcR1 (TRAIL-R3) und DcR2 (TRAIL-R4) und das lösliche Osteoprotegerin (OPG) [53, 65, 165, 172, 213, 214, 263]. DR4 und DR5 stellen dabei transmembrane Proteine dar, die, ähnlich wie Fas, eine intrazelluläre DD besitzen und nach Bindung von TRAIL durch Rekrutierung von FADD zur Formation des DISC beitragen, um mittels Aktivierung der Initiatorcaspase 8 den apoptotischen Zelluntergang einzuleiten [56, 224, 285] (**Abb. 1.8**). Dem entgegen besitzt DcR1 keine und DcR2 nur eine gekürzte, unfunktionale DD [53, 172, 213]. Daher vermutet man, dass diese zusammen mit OPG zur Suppression der Apoptose durch kompetitive Bindung von TRAIL führen [49, 186].

Andererseits kann TRAIL über einen alternativen Kinase-Signalweg auch anti-apoptotische, pro-proliferative sowie migrationssteigernde Effekte vermitteln [98]. Es wird vermutet, dass dieser zusätzliche Signalweg auf die Formation eines zweiten Signalkomplexes nach der Formation des DISC angewiesen ist, der Faktoren wie FADD, Caspase 8, RIPK1, TRAF2 und IKK $\gamma$  enthalten könnte [35]. Am Ende dieses auch durch DcR1 regulierten Signalwegs steht die Aktivierung der Kinasen: NF- $\kappa$ B, p38 MAPK, *c-Jun N-terminal kinase*, Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) und der extrazellulären signalregulierten Kinasen (ERK), die zur Transkription unterschiedlichster Gene führen [98, 241].

TRAIL ist als Zytokin bekannt, das zur selektiven Induktion der Apoptose in Tumorzellen

fähig ist [12, 41, 314]. Es erwies sich jedoch auch als entscheidender Faktor in der Pathogenese der PAH [52, 98] und konnte in erkrankten Patienten mit erhöhten Serumkonzentrationen nachgewiesen werden, die mit der Schwere der PAH korrelierten [159]. In PSMCs, isoliert aus Patienten mit PAH, wurden erhöhte mRNA-Levels von TRAIL, DR4 und DcR1 festgestellt. Anti-TRAIL-Antikörper führten zur Reversion der PAH im Tiermodell [98]. Dabei zeigte sich TRAIL als DcR1/ ERK1/2/ NFκB- abhängiger, proproliferativer Faktor in PSMCs aus Patienten mit PAH und stimulierte zusätzlich die Produktion inflammatorischer Zytokine über NFκB [98, 129, 264, 272].

### **Caspasen**

Caspasen stellen eine wichtige Gruppe von Enzymen zur Erhaltung der Homöostase durch Regulation von Zelltod und Inflammation dar. Als Endoproteasen, die einen Cysteinrest innerhalb ihres aktiven Zentrums tragen, hydrolysieren sie ihre Proteinsubstrate durch Spaltung nach spezifischen Aspartatresten [178]. Dabei werden sie initial als inaktive, monomere Procaspasen synthetisiert und müssen zunächst durch Dimerisierung oder oft auch Spaltung aktiviert werden [178]. Die Gruppe der Caspasen wird klassischerweise weiterhin gegliedert in inflammatorische Caspasen, die eher Mediatoren der angeborenen Immunität als proapoptotische Faktoren darstellen, und apoptotische Caspasen, die, wie bereits beschrieben, weiter in Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen unterteilt werden [99].

#### *Caspase 3*

Caspase 3 stellt einen klassischen Vertreter der Effektorcaspasen dar und nimmt damit eine Schlüsselrolle sowohl am Ende des intrinsischen als auch des extrinsischen Signalwegs der Apoptose ein (**Abb. 1.8**) [108]. Dabei spaltet Caspase 3 verschiedene Substrate mit entscheidender Bedeutung für die Zellvitalität und führt dadurch den regulierten Zelltod herbei [295]. In diesem Zusammenhang werden Strukturproteine der Zelle gespalten, durch Präsentation von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran die Phagozytose durch benachbarte Zellen gefördert, Apoptoseinhibitoren gehemmt, Regulation und Reparatur von DNA inhibiert und letztendlich die Fragmentierung der DNA durch Caspase-aktivierte DNasen (CAD) eingeleitet [66, 87, 203, 248].

#### *Caspase 1*

Caspase 1 wird klassischerweise den inflammatorischen Caspasen zugeordnet [178]. Durch ihre enzymatische Aktivität erhöht sich die Sekretion von IL-1β sowie IL-18 durch

## Einleitung

Spaltung der jeweiligen Proform in aktive proinflammatorische Cytokine [297]. Caspase 1 selbst muss dazu jedoch zunächst durch Formation des Inflammasoms, einem cytosolischen Komplex mit Sensormolekülen wie NLR (*nucleotide-binding domain leucine-rich repeat*) zur Detektion inflammatorischer Stimuli und Adapterproteinen wie ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*) zur Rekrutierung und Spaltung proinflammatorischer Procaspasen, aktiviert werden [83, 302]. Zudem kann eine exzessiv gesteigerte Caspase 1-Aktivität zur Pyroptose führen, die eine nicht-apoptotische Form des Zelltods darstellt, charakterisiert durch die Ruptur der Plasmamembran und die Freisetzung proinflammatorischer, intrazellulärer Bestandteile [46, 71]. Des Weiteren legen einige Studien nahe, dass Caspase 1 zusätzlich zur Spaltung und Aktivierung von BID und damit zum Anstoß des intrinsischen Signalwegs der Apoptose fähig ist (**Abb. 1.8**) [94, 346].

In einer erst kürzlich erschienenen Studie zu hypoxisch induzierter PH an Mäusen mit Caspase-1-*knock-out* konnte gezeigt werden, dass diese vermutlich über den Casp1/IL-18/IL-6/STAT3-Signalweg zur Proliferation glatter Muskelzellen führt [302].

## Survivin

Survivin als Mitglied der IAP-Familie (*inhibitors of apoptosis*) (**Abb. 1.8**) [247] vermag Zellen vor dem Eintritt in die Apoptose zu bewahren und ist daher als anti-apoptotischer Regulationsfaktor der apoptotischen Signalkaskade zu betrachten [42, 108, 179]. Trotz seiner BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*)-Domäne [39], die anderen IAPs die direkte Inhibition von Effektorcaspasen wie Caspase 3 und von Caspase 9 als Bestandteil des Apoptosoms erlaubt, ist der genaue Inhibitionsmechanismus dieser durch Survivin noch ungeklärt [121]. Zudem vermittelt Survivin durch Beteiligung in der Zellzyklusregulation pro-proliferative Effekte [42]. Obwohl es kaum in gesunden, adulten Zellen exprimiert wird, findet Survivin sich jedoch in Zellen der meisten Krebsformen [6] und konnte bereits in Pulmonalarterien von Patienten mit PAH sowie von Ratten mit Monocrotalin (MCT)-PH nachgewiesen werden [179]. Seine Expression in glatten Muskelzellen soll dabei durch Wachstumsfaktoren wie PDGF gesteigert werden [33]. Survivin führt vermutlich zur Hyperpolarisation von Mitochondrien [179]. Es wird angenommen, dass es dadurch zur Reduktion der Freisetzung von Cytochrom C, AIF und Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ) aus den Mitochondrien und folglich zur Inhibition spannungsabhängiger  $K^+$ -Kanäle kommt. Diese Suppression würde zur Reduktion der Apoptose sowie zum Anstieg des zellulären Kaliums mit einer Depolarisation der Zellmembran führen. Der dadurch

hervorgerufene  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom würde sowohl eine Vasokonstriktion als auch die Amplifikation proliferativer Signalwege vermitteln [179].

Durch gentechnische Suppression der Survivin-Funktion konnte bereits eine Reduktion der PVR sowie der Hypertrophie der pulmonalarteriellen Media und des rechten Ventrikels in MCT-Ratten mit folglich gesteigertem Überleben gezeigt werden [179].

### **FLIP**

Zelluläres FLICE (*FADD-like IL-1-converting enzyme*) -inhibitory protein (cFLIP) stellt einen anti-apoptotischen Regulator und Inhibitor der TNF- $\alpha$ -/FasL-/TRAIL-induzierten Apoptose dar [243]. Dabei liegt FLIP durch alternatives Spleißen in verschiedenen Isoformen vor, die alle eine DED (*death effector domain*) innehaben [243] und damit strukturelle Ähnlichkeit zu Procaspase 8 aufweisen, jedoch ohne dessen katalytische Aktivität [299]. Die verschiedenen FLIP-Isoformen binden an FADD und/oder Caspase 8 oder 10 sowie an TRAIL-Rezeptor 1/2 (DR 4/5), inhibieren dadurch die Formation des DISC und verhindern in diesem Zuge die Aktivierung der apoptotischen Caspasen-Kaskade [117, 143, 182, 243, 255] (**Abb. 1.8**). Zu seiner Funktion als Modulator der Apoptose übt FLIP verschiedene andere zelluläre Funktionen, einschließlich einer Steigerung der Proliferation sowie der Tumorgenese, aus [16, 182, 242, 243]. cFLIP kann dabei transkriptionell durch verschiedene Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, Interleukine und Chemokine, aktiviert werden [242] und konnte bereits in mehreren Tumorformen mit erhöhter Expression nachgewiesen werden [61, 138, 303–305, 315].

### **Apolipoprotein C1**

Apolipoprotein C1 (ApoC1) als wichtiger Mediator des Lipid- und Lipoproteinmetabolismus wird neben anderen Organen wie Lunge, Gehirn und Darm hauptsächlich in der Leber synthetisiert [123]. In der Zirkulation tritt es vor allem als Bestandteil der *very low-density lipoproteins*, *intermediate-density lipoproteins*, Chylomikronen und *high-density lipoproteins* auf [123] und reguliert dabei durch Interaktion mit zellulären Rezeptoren die Aktivität verschiedener, für den Lipoproteinmetabolismus wichtige, Enzyme [142].

In den letzten Jahren stellten jedoch einige Studien einen fördernden Effekt von ApoC1 auf die Karzinogenese und Tumorentwicklung heraus [189, 229, 284, 286, 291, 347]. Dabei konnte in Pankreas-, Prostata- und kolorektalen Karzinomen ein fördernder Effekt von ApoC1 auf die Zellproliferation sowie Migration bei gesteigerter Resistenz gegenüber Apoptose festgestellt werden [229, 284, 291]. Der genaue Mechanismus dessen ist jedoch noch unbekannt. In einigen dieser Studien konnte ein erhöhte Aktivität der

## Einleitung

Caspase 3 nach Inhibition des ApoC1-Effekts festgestellt werden [284, 291]. Während man im Falle des Prostata-Karzinoms von einer Beteiligung Survivins ausgeht [284], vermutet man bei kolorektalen Karzinomen hingegen die Vermittlung pro-proliferativer und anti-apoptotischer Effekte durch den p38 MAPK-Signalweg sowie Bcl-2 und Caspase 9 [229].

Paradoxerweise konnte zudem in tierexperimentellen Studien zu Brustkrebs das exakte Gegenteil in Form eines anti-proliferativ pro-apoptotischen Effekts von ApoC1 festgestellt werden [286].

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Große Höhen stellen einen weit verbreiteten, extremen und vor allem durch Hypoxie geprägten Lebensraum dar, der weitreichende akute und chronische Effekte auf das kardiopulmonale System ausübt [139, 166, 184, 331]. Dabei kann eine Exposition gegenüber diesen schwierigen Lebensbedingungen neben akut höheninduzierten Erkrankungen unakklimatisierter Personen, wie AMS oder HAPE, im Verlauf chronischer Exposition zur Entwicklung einer höheninduzierten PH führen [139, 166, 184, 331].

Pulmonalvaskuläres *Remodeling* stellt ein Hauptmerkmal der Pathogenese Pulmonaler Hypertonie dar und ist durch Dysregulation von Proliferation und Apoptose innerhalb vaskulärer Zellen, wie pulmonalarterieller glatter Muskelzellen, geprägt [40, 139, 156, 252, 280, 296, 339, 343]. Aufgrund dieser zellulären Anomalien mit gesteigerter Proliferation und Resistenz gegenüber Apoptose wird die PH in letzter Zeit häufig als tumorähnliche Erkrankung beschrieben [37, 171], wobei trotz eindeutiger Fortschritte im Verständnis der Rolle von Apoptose in hypoxieinduzierter PH weiterhin viele Fragen bestehen, die bisher nur ungenügend untersucht wurden [139].

Ein Ungleichgewicht pro- und anti-apoptotischer molekularer Signalwege wurde längst als bedeutendes Phänomen innerhalb der Tumorforschung beschrieben [108]. Zudem konnten bereits mehrere zirkulierende apoptotische Signale in Tumorleiden und Erkrankungen des kardiovaskulären Systems nachgewiesen und zum Teil als vielversprechende Biomarker evaluiert werden [109, 204, 217]. In Hinsicht auf pulmonalvaskuläre Erkrankungen konnten veränderte Plasmakonzentrationen apoptotischer Signale, wie FasL und TRAIL, als Reaktion auf Therapie oder Alteration in Patienten mit anderen Formen der PH nachgewiesen werden [1, 159]. Jedoch wurden die Profile zirkulierender apoptotischer Signale bisher noch nie im Kontext höhenexponierter Menschen untersucht. [139]

Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal veränderte Plasmakonzentrationen zirkulierender apoptotischer Marker, wie FasL, TRAIL und ApoC1, in permanenten Höhenbewohnern sowie akut höhenexponierten Flachlandprobanden untersucht. Zusätzlich wurden über verschiedene Zeiträume potentielle Veränderungen in der Genexpression apoptotischer Akteure, wie Casp1 und 3, Survivin, FLIP, ApoC1, TRAIL und FasL, in hypoxieexponierten PSMCs analysiert. [139]

*Die zentrale Hypothese besteht hierbei in der Annahme, dass apoptotische Signale sowohl auf zellulärer Ebene als auch in der Zirkulation humaner Probanden nach Exposition gegenüber Hypoxie und großen Höhen variieren.*

## **2 MATERIALIEN & METHODEN**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Labortechnische Apparaturen & Instrumente**

Absorptions-/Lumineszenzlesegerät Tecan infinite M200	<i>Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz</i>
Abzug TA 1800	<i>Laborbau-Systeme Hemling GmbH &amp; Co. KG, Ahaus, Deutschland</i>
Arbeitsbank Cellguard Class II Biosafety Cabinet	<i>NuAire Inc., Plymouth, MN, USA</i>
Aspirationssystem Gilson® Safe Aspiration Station	<i>Gilson International B.V., Limburg an der Lahn, Deutschland</i>
Automatische Pipette Multipette® E3x	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Bildwandler ChemiDoc™ XRS+	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA</i>
Brutschrank	<i>Memmert GmbH &amp; Co. KG, Schwabach, Deutschland</i>
Eisbehälter insulated ice pans	<i>Magic Touch Icewares Inc., New York, NY, USA</i>
Eis-Maschine EF 103 easy-fit	<i>Scotsman® Ice Systems, Mailand, Italien</i>
Electrophoresis Power Supply - EPS 600	<i>Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden</i>
Elektrophoresekammer - horizontal (Anfertigung)	<i>Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland</i>
Feinwaage Mettler PL 303	<i>Mettler Toledo, Gießen, Deutschland</i>
Gussformen Agarosegel (Anfertigung)	<i>Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland</i>
Handzähler economy	<i>neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland</i>
Heizplatte Leica HI 1220	<i>Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland</i>
Inkubator Heracell 150	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA, USA</i>
Inkubator Heracell 150 Tri-gas 1-21%	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA, USA</i>
Kämme für Gussformen (Anfertigung)	<i>Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland</i>
Kühlplatte Leica EG 1150 C	<i>Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland</i>
Laborwippe (Anfertigung)	<i>Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland</i>
Lichtmikroskop Leica DM6000 B	<i>Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland</i>
Magnetrührer IKA® RH Basic 2	<i>IKA GmbH, Staufen, Deutschland</i>
Mikroskop Leica DMIL	<i>Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland</i>
Mikroskopkamera DFC 300 FX	<i>Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland</i>
Mikroskopkamera Leica DFC 420 C	<i>Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland</i>

Mikrotom RM 2255	<i>Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland</i>
Mini Zentrifuge/vortex KombiSpin FVL-2400N	<i>BioSan Ltd., Riga, Lettland</i>
NanoDrop ND-1000 Spektrometer Neubauer-Zählkammer	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA, USA</i> <i>Paul Marienfeld GmbH &amp; Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland</i>
Personal-Computer Dell Optiplex 7010	<i>Dell Technologies Inc., Round Rock, TX, USA</i>
Personal-Computer Dell Precision T3500	<i>Dell Technologies Inc., Round Rock, TX, USA</i>
pH-Meter 766 Calimatic	<i>Knick GmbH &amp; Co. KG, Berlin, Deutsch- land</i>
Pinzetten	<i>Bochem Instrumente GmbH &amp; Co. KG, Tuttlingen, Deutschland</i>
Pipette Eppendorf Research® plus 0,5 - 10 µL	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Pipette Eppendorf Research® plus 10 - 100 µL	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Pipette Eppendorf Research® plus 100 - 1000 µL	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Pipetten-Controller Macroman	<i>Gilson International B.V., Limburg an der Lahn, Deutschland</i>
Platensealer PX1 PCR Plate Sealer	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA</i>
Platten-Zentrifuge PlateFuge Microplate Microzentrifuge	<i>Benchmark Scientific, Seyreville, NJ, USA</i>
Quantitatives Realtime PCR-System (Stratagene Mx 3000 P)	<i>Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA</i>
Reinstwasseranlage GenPure xc AD plus	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA, USA</i>
Reinstwasseranlage Milli-Q®	<i>Millipore, Schwalbach, Deutschland</i>
Schüttel- & Mischgerät Rotamax 120	<i>Heidolph Instruments GmbH &amp; Co. KG, Schwabach, Deutschland</i>
Schüttelgerät IKA® Vibrax VXR basic	<i>IKA GmbH, Staufen, Deutschland</i>
Thermocycler, Typ T-Personal	<i>Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland</i>
Tischzentrifuge Mikro 200 R	<i>Andreas Hettich GmbH &amp; Co. KG, Tutt- lingen, Deutschland</i>
Vaskuläres Ultraschallsystem CX50	<i>Philips Medizin Systeme GmbH, Ham- burg, Deutschland</i>
Vortex Genie 2	<i>Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA</i>
Vortexer MS1 Minishaker	<i>IKA GmbH, Staufen, Deutschland</i>
Wasserbad Leica HI 1210	<i>Leica Microsystems, Nußloch, Deutsch- land</i>
Wasserbad WNB 14	<i>Memmert GmbH &amp; Co. KG, Schwabach, Deutschland</i>
Zentrifuge Galaxy mini	<i>VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland</i>

### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien & Substanzen

(10x) Trypsin 0,5% / EDTA 0,2% in PBS	<i>PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland</i>
2-Mercaptoethanol 99%	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
6x DNA Loading	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA, USA</i>
Agarose SERVA for DNA electrophoresis	<i>SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland</i>
Antikörper Anti-Fas Antibody (human, neutralizing), clone ZB4	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
DPBS, w/o: Ca and Mg	<i>PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland</i>
EDTA 99+%	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
Eisen-Haematoxylin A, nach Weigert	<i>Waldeck GmbH &amp; Co. KG, Münster, Deutschland</i>
Eisen-Haematoxylin B, nach Weigert	<i>Waldeck GmbH &amp; Co. KG, Münster, Deutschland</i>
Eosin-y-alkoholisch	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA, USA</i>
Essigsäure Rotipuran® 100% p.a.	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
Ethanol absolut, 99,6%	<i>Otto Fischar GmbH &amp; Co. KG, Saarbrücken, Deutschland</i>
Ethanol, 70%	<i>SAV - Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland</i>
Ethanol, 96%	<i>Otto Fischar GmbH &amp; Co. KG, Saarbrücken, Deutschland</i>
FasL SUPERFASLIGAND® Protein (soluble) (human), (recombinant)	<i>Enzo Biochem Inc., Farmingdale, NY, USA</i>
Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA, USA</i>
Hämalaun; nach Mayer, sauer	<i>Waldeck GmbH &amp; Co. KG, Münster, Deutschland</i>
Isopropylalkohol 99,8%	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA</i>
Natriumhydroxyd (NaOH) ≥ 98% p.a., in Plätzchen	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
Paraffin (Paraplast Plus®)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
PDGF Recombinant Human PDGF-BB, Biotinylated Protein	<i>R&amp;D Systems GmbH, Minneapolis, MN, USA</i>
Pertex® (Eindeckmedium)	<i>Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland</i>
Pikrinsäure, gesättigt, wässrig	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
Puffer RLT Lyse-Puffer	<i>QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland</i>
Quick-Load® 1kb DNA Ladder	<i>Bio Labs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland</i>

Quick-Load® 1kb DNA Marker Broad Range	<i>Bio Labs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland</i>
Resorcin-Fuchsin; nach Weigert	<i>Waldeck GmbH &amp; Co. KG Division Chroma, Münster, Deutschland</i>
RNase freies Wasser	<i>QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland</i>
Salzsäure 25% (HCl)	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
Säurefuchsin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
SmGM-2 Smooth Muscle Growth Medium-2	<i>Lonza Group AG, Basel, Schweiz</i>
SYBR® Safe DNA Gel Stain invitrogen™	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA, USA</i>
TRIS Pufferan®	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
Xylol (Roti®-Histol)	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

0,5 mL PCR Tubes with Flat Caps	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA</i>
Cap for PCR-Tubes 0,1 & 0,2 mL	<i>nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland</i>
Combitips advanced® 10 mL	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Combitips advanced® 2,5 mL	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Combitips advanced® 25 mL	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Combitips advanced® 5,0 mL	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Deckgläser 24x36 mm	<i>Menzel GmbH &amp; Co. KG, Braunschweig, Deutschland</i>
Eppendorf DNA LoBind Tubes 1,5 mL	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Eppendorf Tubes (Microtubes 1,5 mL)	<i>Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht, Deutschland</i>
Falcon Röhrchen 50 mL, Cellstar®, steril	<i>Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</i>
Filterspitze Pipette, oberflächenoptimiert, 0 -100 µL	<i>nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland</i>
Filterspitze Pipette, oberflächenoptimiert, 100 -1.000 µL	<i>nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland</i>
Filterspitze Pipette, oberflächenoptimiert, short, 0,1-10 µL	<i>nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland</i>
Folie Optically Clear Heat Seal	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA</i>
Frischhaltefolie	<i>Papstar GmbH, Kall, Deutschland</i>
Gewebe-Einbettkassetten	<i>Leica Microsystems, Nußloch, Deutschland</i>
Glaspipetten Cellstar® 10 mL Pipettes	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland</i>

## Materialien & Methoden

Glaspipetten Cellstar® 5 mL Pipettes	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland</i>
Handschuhe Nitra-Tex®	<i>Ansell Ltd., Tamworth, Staffordshire, UK</i>
Laboratory FILM PARAFILM M 4 in. x 250 ft	<i>Bemis Company, Neenah, WI, USA</i>
Mikrotomklingen (MX35 Premier 34°/80 mm)	<i>Thermo Scientific, Rockford, IL, USA</i>
Multiplate PCR Plates 96-Well, clear	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA</i>
Objektträger 25x75x1 mm (Superfrost Ultra Plus®)	<i>R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland</i>
PCR-Tube 0,2 mL 8-strips, transparent	<i>nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland</i>
Präparatekasten	<i>R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland</i>
Präparatemappen	<i>R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland</i>
Vacutainer Golden Vac 3,2% Sodium citrate coagulation tube	<i>Zhjejiang Gongdong Medical Technology Co. Ltd., Zhjejiang, China</i>
Vacutainer Purple Cap (EDTA K2/K3)	<i>Zhjejiang Gongdong Medical Technology Co. Ltd., Zhjejiang, China</i>
Zellkultur Microplatte, 96-Well, PS, F-Boden, µCLEAR®, weiss, Abdeckplatte	<i>Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</i>
Zellkultur Multiwellplatte, 6 & 24-Well, Cellstar®, transparent, Abdeckplatte	<i>Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</i>
Zellkulturschale, PS, 60 & 100mm Cellstar® TC, steril	<i>Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</i>

### 2.1.4 Puffer, Medien & Lösungen

**Tabelle 2.1:** Verwendete Puffer Medien und Lösungen

<b>Puffer</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
PCR-Lysepuffer	RLT-Puffer	1000 µL
	2-Mercaptoethanol	10 µL
TAE-Puffer, 20x konzentriert (auffüllen auf 1.000 mL mit dH <sub>2</sub> O)	TRIS Pufferan®	242 g
	dH <sub>2</sub> O	750 mL
	Essigsäure 100%	57,1 mL
	EDTA 0,5 mol/L	100 mL
<b>Medium</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
hPASCs Basalmedium	GA-1000 (Gentamycin Sulfat-Amphotericin)	0,5 mL
	SmBM™ Basal Medium	500 mL
hPASCs Wachstumsmedium (SmGM-2 Smooth Muscle Growth Medium-2)	FBS	25 mL
	GA-1000 (Gentamycin Sulfat-Amphotericin)	0,5 mL

	Insulin	0,5 mL
	rhFGF-B	1 mL
	rhEGF	0,5 mL
	SmBM™ Basal Medium	500 mL
<b>Lösungen</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
1% HCl-Alkohol	HCl 25%	7,2 mL
	Ethanol 70%	193 g
1% Essigsäure	Essigsäure 100%	1 mL
	dH <sub>2</sub> O	99 mL
2% Säurefuchsin	2g Säurefuchsin	2 g
	dH <sub>2</sub> O	100 mL
EDTA 0,5 mol/L (PH auf 8,0 einstellen durch Zugabe von NaOH)	EDTA 99+%	36,5 g
	dH <sub>2</sub> O	250 mL
	NaOH	nach PH
Fe-Hämatoxylin nach Weigert (EvG-Färbung)	Eisen-Haematoxylin A, nach Weigert	100 mL
	Eisen-Haematoxylin B, nach Weigert	100 mL
Resorcin-Fuchsin- Lösung (EvG-Färbung)	Resorcin-Fuchsin; nach Weigert	10 mL
	1%er HCl-Alkohol	200 mL
Van Gieson-Lösung	Pikrinsäure, gesättigt	240 mL
	2% Säurefuchsin	8 mL
	1% Essigsäure	4 mL

### 2.1.5 Kits & Assays

APOC1 (Human) ELISA Kit	<i>Abnova GmbH, Taipei City, Taiwan</i>
Apoptoseassay Caspase-Glo® 3/7 Assay System	<i>Promega GmbH, Mannheim, Deutschland</i>
Human Fas Ligand/TNFSF6 Quantikine ELISA Kit	<i>R&amp;D Systems GmbH, Minneapolis, MN, USA</i>
Human FASLG/Fas Ligand ELISA Kit (Sandwich ELISA)	<i>Lifespan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA</i>
Human TRAIL/TNFSF10 Quantikine ELISA Kit	<i>R&amp;D Systems GmbH, Minneapolis, MN, USA</i>
iScript cDNA Synthesis Kit	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA</i>
NPPB (Human/Mouse/Rat) ELISA Kit	<i>Abnova GmbH, Taipei City, Taiwan</i>
Proliferationsassay Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	<i>Hoffmann - La Roche AG, Basel, Schweiz</i>
RNeasy Mini Kit (50)	<i>QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland</i>

### 2.1.6 PCR-Primer

Die Synthese der angegebenen Primer (**Tabelle 2.2**) erfolgte durch *Metabion international AG, Planegg, Deutschland*. Die Entwicklung der Primersequenzen sowie eine anschließende Kompatibilitätsprüfung erfolgte mit Hilfe der Nukleotiddatenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA*.

**Tabelle 2.2:** Liste der verwendeten Primersequenzen [139]

Zielgen	FP	RP
Human ApoC1	AGC AAG GAT TCA GAG TGC CCC	CCT TCA GCT TAT CCA AGG CAC TG
Human Casp1	TGG GAC TCT CAG CAG ATC AAA CA	GGA TGT GGG CAT AGC TGG GT
Human Casp3	GTA GAA GAG TTT CGT GAG TGC TCG	GCA CAC CCA CCG AAA ACC AG
Human FasL	ACA CCT ATG GAA TTG TCC TGC	GAC CAG AGA GAG CTC AGA TAC G
Human FLIP	CGG ACT ATA GAG TGC TGA TGG CA	TCC AAC TCA ACC ACA AGG TCC A
Human Survivin	AAA GAG CCA AGA ACA AAA TTG C	GAG AGA GAA GCA GCC ACT GTT AC
Human TRAIL	TCC GTC AGC TCG TTA GAA AGA TGA T	GGT CCC AGT TAT GTG AGC TGC
Humane Porphobilinogen- deaminase (PBGD)	CCC ACG CGA ATC ACT CTC AT	TGT CTG GTA ACG GCA ATG CG

*Primersequenzen angegeben von 3' nach 5'; FP, forward primer; RP, reverse primer*

### 2.1.7 Software & Websites

GraphPad Prism® Version 7.04	<i>GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA</i>
i-control™ Microplate Reader Software	<i>Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz</i>
Image Lab™ Software Version 4.1	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA</i>
Leica QWin V3	<i>Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland</i>
NanoDrop 1000 3.7.1 Software	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA, USA</i>
Stratagene MxPro qPCR Software	<i>Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA</i>
<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA</i>
<a href="https://mycurvefit.com/">https://mycurvefit.com/</a>	<i>MyAssays Ltd., UK</i>
<a href="https://www.draw.io/">https://www.draw.io/</a> v.11.1.4	<i>JGraph Ltd., UK</i>
<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore</a>	<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA</i>

### 2.1.8 Probenmaterial

#### Histologie

Die Untersuchungsbasis des histologischen Teils der vorliegenden Arbeit bildete bereits fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe. Für die Untersuchungen wurde Lungengewebe männlicher C57BL/6N Mäuse (*Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland*) verwendet, die fünf Wochen unter hypoxischen Bedingungen (10% O<sub>2</sub>, „Hox“, n=5) bzw. den entsprechenden Zeitraum unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>, „Nox“, n=5) gehalten worden waren. Die verwendeten tierischen Gewebe entstammen der lokalen Biobank. Die ursprüngliche Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen GI20/10 Nr.48/2009.

#### Untersuchung humaner Plasma-Proben

Zur Untersuchung der Effekte akuter und chronischer Höhenexposition wurden zwei Studien innerhalb der kirgisischen Population durchgeführt. Dazu wurden in einer ersten Studie zu den Effekten chronischer Höhenexposition ursprüngliche Bewohner der Höhenregionen Kirgistans mit Anzeichen Pulmonaler Hypertonie (n=12) sowie Höhenbewohner ohne diese pulmonalvaskuläre Erkrankung (n=10) einer Gruppe freiwilliger Probanden der Flachlandregionen Kirgistans (n=10) gegenübergestellt, unterliefen echokardiographischen sowie anthropometrischen Messungen und einer periphervenösen Blutentnahme [139]. Zudem wurden freiwillige Teilnehmer einer zweiten Studie (n=8) für ca. drei Wochen akut einer Höhe von ca. 3.200 Hm ausgesetzt. Sie unterliefen dabei mehrfach echokardiographischen Untersuchungen sowie periphervenöser Blutentnahmen vor, während und nach akuter Höhenexposition. Weiterhin wurden einmalig anthropometrische Daten erhoben [139]. Aus den gewonnenen Blutproben wurde EDTA-Plasma sowie citriertes plättchenfreies Plasma separiert. Die genauen Details der Studienprotokolle sind in Kapitel 2.2.6 dargestellt. Nach Aufklärung über die Studie wurde von allen Probanden eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben. Beide Studienprotokolle wurden durch die Ethikkommissionen des Nationalen Zentrums für Kardiologie und Innere Medizin, Bishkek, Kirgistan (01-1/18 und 01-1/07) sowie der Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland (AZ: 236/16) bewilligt. Alle Studien wurden unter Übereinstimmung mit den in der Deklaration von Helsinki dargelegten wissenschaftlichen Prinzipien durchgeführt.

## **Zellkulturen**

Als Probenmaterial für experimentelle Untersuchungen an Zellkulturen dienten kommerziell erworbene, humane PASCs (PASC – Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells; *Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland*).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Histologie**

Zur Verdeutlichung struktureller Umbauten des pulmonalvaskulären Systems im Rahmen des *Remodelings* unter chronischer Hypoxie wurden histologische Präparate von Mäuselungen angefertigt. Eine langanhaltende Exposition von Mäusen gegenüber Hypoxie gilt dabei als anerkanntes Tiermodell der PH und vor allem der hypoxisch induzierten 3. Gruppe, da es diesem Patientenkollektiv pathodynamisch am nächsten kommt [211]. Im vorliegenden Fall handelte es sich um Lungen von Mäusen, die für fünf Wochen unter hypoxischen Bedingungen (10% O<sub>2</sub>) bzw. den entsprechenden Zeitraum in Normoxie (21% O<sub>2</sub>) gehalten worden waren.

#### *2.2.1.1 Herstellung eines histologischen Präparats*

Zur Herstellung der histologischen Präparate wurden bereits in Paraffin fixierte Mäuselungen aus der lokalen Biobank verwendet. Vor Arbeitsbeginn mussten die im Kühlschrank gelagerten Blöcke für ca. 30 min auf einer Kühlplatte weiter heruntergekühlt werden, um ein optimales Schnittergebnis zu erzielen. Im Anschluss erfolgte zunächst das Trimmen mittels Mikrotoms und einer Schnittdicke von 20 µm, um eine plane Schnittoberfläche für die nachfolgenden Serienschnitte zu erhalten, die mit einer Schnittdicke von 3 µm durchgeführt wurden. Die entstanden Gewebeschnitte wurden anschließend mit einem feinen Pinsel in ein 40°C warmes Wasserbecken übertragen und dort auf vorbeschriftete Objektträger aufgezogen. Der Trocknungsprozess der nun aufgezogenen Objektträger begann zunächst für ca. zwei Stunden auf einer Heizplatte mit 40°C und wurde anschließend im Brutschrank bei 37°C über Nacht fortgesetzt. Nach vollendeter Trocknung waren die Schnittpräparate für die folgenden Färbeprozesse bereit. [102]

#### *2.2.1.2 Histologische Färbungen*

Zur Entfernung des zum Einbetten verwendeten Paraffins war es zunächst nötig die Schnitte mindestens eine Stunde bei 59°C im Brutschrank zu inkubieren, um das Paraffin zu schmelzen [102]. Nach anschließender Entparaffinierung mit Xylol wurden die

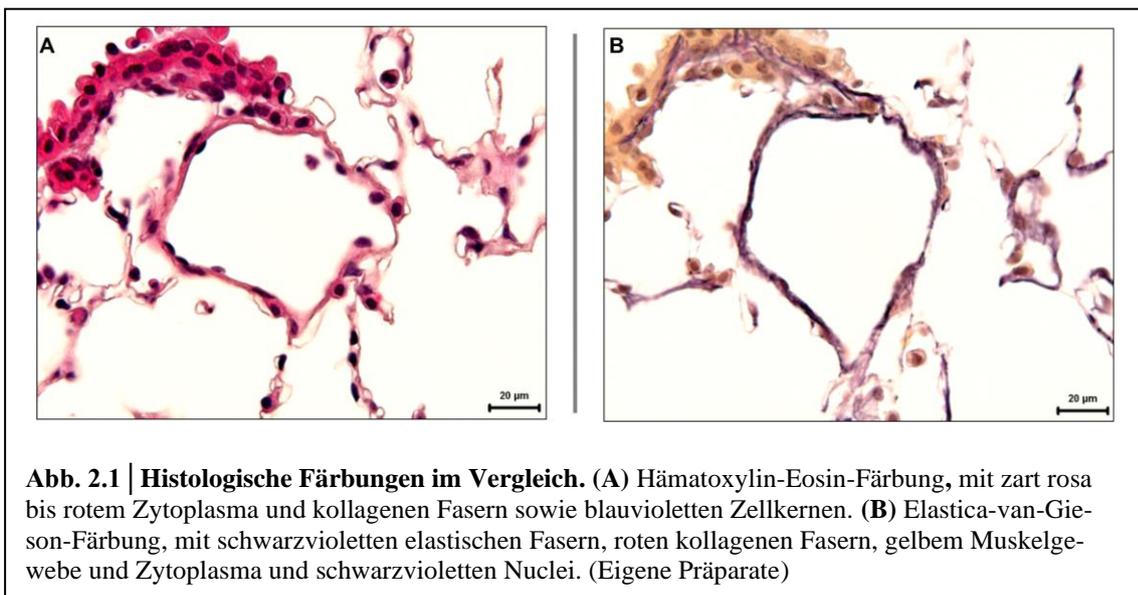
Schnitte mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe in ein wässriges Milieu überführt (Rehydratation) [329]. Hieran schloss sich der eigentliche Färbeprozess mittels der für die jeweilige Färbung spezifischen Färbelösungen an, bevor die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe erneut dehydriert und der Färbeprozess durch Xylol abgeschlossen wurde [329]. Zur Erhöhung der Haltbarkeit der nun gefärbten Schnitte, wurden diese abschließend mit Pertex und einem entsprechenden Deckglas eingedeckt [329]. Die genauen Protokolle der vorgenommenen Färbungen sind **Tabelle 2.3** zu entnehmen.

#### *Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)*

Aufgrund des Status der HE-Färbung als etablierte Routinefärbung in der zytologischen Untersuchung [329] wurde je einer der pro Block angefertigten Gewebeschnitte mit dieser Technik gefärbt (**Tabelle 2.3 A**). Hierbei wird Hämatoxylin an basophile Zellkomponenten (z.B. Zellkerne, Nissl-Schollen oder extrazelluläre Proteoglykane) gebunden und färbt diese blauviolett. Azidophile Zellbestandteile wie das Zytoplasma, kollagene Fasern und elastische Fasern binden hingegen das saure Eosin und werden zart rosa bis rot gefärbt [329] (**Abb. 2.1 A**).

#### *Elastica-van-Gieson-Färbung (EvG-Färbung)*

Um die Differenzierung des physiologischen Gefäßaufbaus sowie des pathologischen Umbaus dessen (vaskuläres *Remodeling*) zu erleichtern [102], wurden ebenfalls einige der Schnittpräparate mittels EvG-Färbung gefärbt (**Tabelle 2.3 B**). Hierbei sieht das Färberegebnis schwarzviolette elastische Fasern, gelbes Muskelgewebe, rote kollagene Fasern und braunschwarze Nucleoli vor [328] (**Abb. 2.1 B**).



**Abb. 2.1 | Histologische Färbungen im Vergleich.** (A) Hämatoxylin-Eosin-Färbung, mit zart rosa bis rotem Zytoplasma und kollagenen Fasern sowie blauvioletten Zellkernen. (B) Elastica-van-Gieson-Färbung, mit schwarzvioletten elastischen Fasern, roten kollagenen Fasern, gelbem Muskelgewebe und Zytoplasma und schwarzvioletten Nuclei. (Eigene Präparate)

**Tabelle 2.3:** Färbeprotokolle histologischer Färbungen [102]

<b>(A) Färbeprotokoll der HE-Färbung</b>		
<b>Lfd. Nr.</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Dauer</b>
(1)	Xylol	10 min
(2)	Xylol	10 min
(3)	Xylol	10 min
(4)	Ethanol absolut 99,6%	5 min
(5)	Ethanol absolut 99,6%	5 min
(6)	Ethanol 96%	5 min
(7)	Ethanol 70%	5 min
(8)	dH <sub>2</sub> O	2 min
(9)	Hämalaun nach Mayer, sauer	20 min
(10)	H <sub>2</sub> O, fließend	5 min
(11)	Ethanol 96%	1 min
(12)	Eosin -y-alkoholisch	4 min
(13)	dH <sub>2</sub> O	abspülen
(14)	Ethanol 96%	2 min
(15)	Ethanol 96%	2 min
(16)	Ethanol absolut 99,6%	5 min
(17)	Isopropylalkohol 99,8%	5 min
(18)	Xylol	5 min
(19)	Xylol	5 min
(20)	Xylol	5 min
<b>Eindecken mit Pertex</b>		

<b>(B) Färbeprotokoll der EvG-Färbung</b>		
<b>Lfd. Nr.</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Dauer</b>
(1)	Xylol	10 min
(2)	Xylol	10 min
(3)	Xylol	10 min
(4)	Ethanol absolut 99,9%	5 min
(5)	Ethanol absolut 99,9%	5 min
(6)	Ethanol 96%	5 min
(7)	Ethanol 70%	5 min
(8)	Resorcin-Fuchsin	16 - 18 h
(9)	H <sub>2</sub> O, fließend	15 min
(10)	dH <sub>2</sub> O	abspülen
(11)	Fe- Hämatoxylin nach Weigert	5 min
(12)	dH <sub>2</sub> O	abspülen
(13)	H <sub>2</sub> O, fließend	15 min
(14)	dH <sub>2</sub> O	abspülen
(15)	Van Gieson-Lösung	10 min
(16)	dH <sub>2</sub> O	abspülen (kurz)
(17)	Ethanol 96%	2 min
(18)	Ethanol 96%	2 min
(19)	Ethanol absolut 99,6%	5 min
(20)	Isopropylalkohol 99,8%	5 min
(21)	Xylol	5 min
(22)	Xylol	5 min
(23)	Xylol	5 min
<b>Eindecken mit Pertex</b>		

*Den histologischen Färbungen ging, um das umgebende Paraffin zu schmelzen, je eine einstündige Inkubation im Brutschrank bei 59°C voraus.*

### 2.2.2 Zellkultur

Alle Arbeiten an Zellkulturen wurden zur Vermeidung einer Kontamination unter sterilen Arbeitsbänken durchgeführt. Die kommerziell erworbenen, humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen wurden in 100 mm Petrischalen mit 10 mL Wachstumsmedium kultiviert. Dazu wurden sie im Brutschrank bei 37°C, feuchter Atmosphäre, 21% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Laufe der Inkubation erfolgte ein Wechsel des Mediums jeden zweiten Tag sowie eine tägliche mikroskopische Kontrolle der Zellwachstumsdichte auf der Petrischale. Wurde das Wachstum der Zellen zu dicht, erfolgte ab ca. 80%-iger Konfluenz ein *Splitting*-Prozess, um einer Hemmung des Zellwachstums durch Kontaktinhibition vorzubeugen [93].

#### 2.2.2.1 *Splitting*

Als „*Splitting*“ oder „Passage“ bezeichnet man die Subkultivierung einer Zellkultur in mehrere neue Kulturschalen. Hierdurch lassen sich mehrere Generationen oder „Passagen“ derselben Zellreihe produzieren. Die Passagezahl gibt dabei an, wie oft die Zellreihe bereits gesplittet oder passagiert wurde [93].

Um das *Splitting* durchzuführen mussten zunächst die benötigten Reagenzien und Puffer (Wachstumsmedium (WM), Trypsin-EDTA, PBS) im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden. Anschließend wurden die Zellen aus dem Brutschrank entnommen, das vorhandene Medium abgesaugt und durch Zugabe von ca. 10 mL PBS gewaschen. Zur Lösung der Zellen vom Untergrund wurde im nächsten Schritt das PBS vollständig entfernt, pro Schale 3 mL Trypsin-EDTA hinzugefügt und die Schale für etwa eine Minute bei 37°C inkubiert. Nach sanftem Beklopfen der Petrischale und anschließender mikroskopischer Kontrolle der vollständigen Zelllösung wurden die Zellen unter Zugabe von 3 mL WM nach mehrmaligem Mischen und Überspülen der Oberfläche in ein 50 mL-Falcon überführt. Anschließend wurde dieselbe Platte noch einmal in gleicher Weise mit 6 mL PBS überspült, um möglichst viele, der unter Umständen noch vorhandenen, Zellen aufzunehmen und ebenfalls in denselben 50 mL-Falcon zu überführen. Der Falcon wurde zentrifugiert (5 min, RT, 1200 RPM), der Überstand entfernt und der Rückstand schnell durch Zugabe von 1 mL WM und sanftes Auf- und Abpipettieren in Suspension gebracht. Nach Zugabe von weiteren 40 mL WM und erneutem Mischen konnten je 10 mL des Mediums auf vier neue Petrischalen übertragen und die Kulturen erneut inkubiert werden [93].

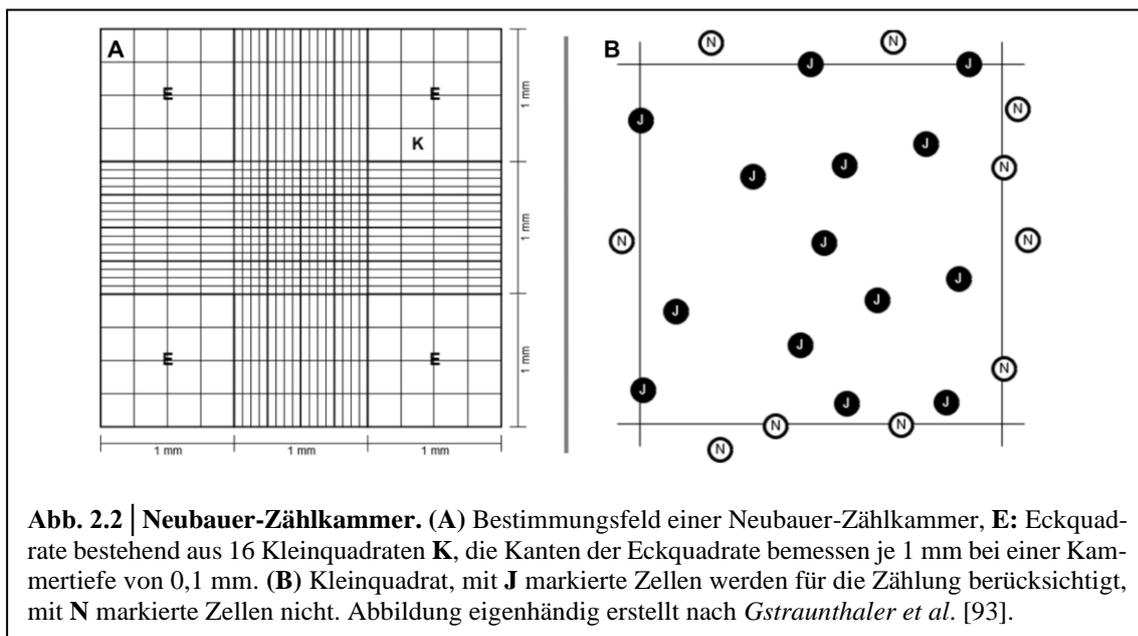
Dieser Vorgang wurde bei genügender Wachstumsdichte entsprechend wiederholt. Alle Experimente wurden in Passage 7 durchgeführt. Um erhöhte Versuchszahlen (n-Zahl) für die darauffolgenden Versuche zu generieren, wurden die späteren Zellkulturexemplare bereits mindestens eine Passage vor der eigentlichen Versuchspassage getrennt.

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Analyse des Effekts von Hypoxie auf die Alternanz apoptotischer Marker in der pulmonalvaskulären Zirkulation wurden zunächst mRNA-Expressionsprofile verschiedener dieser Marker in humanen PASMCs nach hypoxischer Inkubation untersucht.

#### 2.2.3.1 Vorbereitungen der Zellkultur

Um gleiche Ausgangsbedingungen für die bei der PCR verwendeten Zellkulturen zu gewährleisten, war es unerlässlich am Ende des letzten Splittings eine Zellzählung durchzuführen. Hierzu wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Nach Auflegen des Deckglases wurden, um Bestimmungsfehler zu minimieren, beide Zählfelder der Kammer mit je 10  $\mu\text{L}$  zweier unabhängiger Proben derselben Zellsuspension beschickt. Zur Ermittlung der Zellkonzentration pro mL wurden nun jeweils die Zellzahlen der vier Eckquadrate der beiden Bestimmungsfelder ausgezählt (**Abb. 2.2 A**). Dabei wurden, um Doppelzählungen zu vermeiden, Zellen, die die Begrenzungslinien schneiden, nur an zwei der Kanten in die Zählung mit aufgenommen. So wurden bei der Zählung die den linken und oberen Rand schneidenden Zellen berücksichtigt, die den unteren und rechten Rand schneidenden jedoch nicht (**Abb. 2.2 B**). [93]



**Abb. 2.2 | Neubauer-Zählkammer.** (A) Bestimmungsfeld einer Neubauer-Zählkammer, E: Eckquadrate bestehend aus 16 Kleinquadraten K, die Kanten der Eckquadrate bemessen je 1 mm bei einer Kammertiefe von 0,1 mm. (B) Kleinquadrat, mit J markierte Zellen werden für die Zählung berücksichtigt, mit N markierte Zellen nicht. Abbildung eigenhändig erstellt nach *Gstraunthaler et al.* [93].

Die Zellkonzentration der Suspension in Zellen/mL wurde wie folgt ermittelt:

$$X = \frac{n}{4} * 10.000$$

*X: Zellzahl pro mL, n: Zahl der gezählten Zellen in allen vier Eckquadraten*

Im Anschluss hieran wurde der Mittelwert der beiden Suspensionen gebildet, eine 6-Well-Platte mit je 40.000 Zellen pro Well in je 2 mL Wachstumsmedium besät und zwei Tage inkubiert.

$$2 \text{ mL} = \frac{40.000}{X/\text{mL}} + Y \text{ mL}$$

*X: Zellzahl pro mL, Y: Zuzugebendes Volumen an Medium*

### 2.2.3.2 Versuchsaufbau

Kulturen humaner PSMCs wurden für je 24h, 48h und 72h bei 37°C, angefeuchteter Atmosphäre, 5% CO<sub>2</sub> und entweder normoxischen (21% O<sub>2</sub>) oder hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubiert [139]. Hierbei wurden, um möglichst gleiche Bedingungen hinsichtlich der Gesamtinkubationszeit über die verschiedenen Zeitpunkte zu gewährleisten, die Zellen der 72h-Inkubation direkt der jeweils hypoxischem und normoxischen Inkubation zugeordnet. Die Zellen der 24h-Inkubation wurden hingegen zunächst 48h (bzw. die der 48h-Inkubation zunächst 24h) unter normoxischen Bedingungen inkubiert und erst dann für die entsprechende Zeitspanne der Normoxie bzw. Hypoxie ausgesetzt.

### 2.2.3.3 RNA-Isolation & cDNA-Synthese

Zur Erhöhung der Stabilität der zu isolierenden RNA bzw. der synthetisierten cDNA wurden alle folgenden Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Am Ende der Inkubationsperiode wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums zunächst durch Spülen mit ca. 2 mL eiskaltem DPBS gewaschen um anschließend durch Zugabe von 300 µL eiskaltem Lysepuffer pro Well lysiert zu werden. Um alle Zellen von den Wandungen der Wells zu lösen wurde zusätzlich mit einer umgebogenen Pipettenspitze über die Oberflächen der Wells gekratzt und die gesamte Flüssigkeit nach mehrmaligem Überspülen der Oberfläche in ein Eppendorf-Tube zur RNA-Isolation überführt.

Die Isolation der RNA aus den lysierten Zellen erfolgte mittels RNeasy Mini Kit (*QIAGEN GmbH*) unter Verwendung des vom Hersteller bereitgestellten Protokolls. Vor Synthese der cDNA wurden zunächst die RNA-Konzentrationen der einzelnen Proben

mit Hilfe eines Spektrometers bestimmt, um für die cDNA-Synthese in allen Proben eine einheitliche RNA-Menge von 1.000 ng in 15 µL Gesamtvolumen bereit zu stellen.

$$15 \mu\text{L} = \frac{1.000 \text{ ng}}{C \text{ ng}/\mu\text{L}} + V \mu\text{L}$$

*C*: ermittelte RNA-Konzentration, *V*: zuzugebendes Volumen RNase-freien Wassers

Zu jeder dieser Proben wurden je 5 µL Mastermix (**Tabelle 2.4**) hinzugegeben, die Proben gemischt, kurz herunterzentrifugiert und die Reverse-Transkriptase-Reaktion im Thermocycler gestartet (**Tabelle 2.5**).

**Tabelle 2.4:** Mastermix-Zusammensetzung für Reverse-Transkriptase-Reaktion

Mastermix [Menge/Probe]	
Reagenz	Volumen [µL]
Reverse Transkriptase	1
5x i-Script Reaktionsmischung	4

**Tabelle 2.5:** Inkubationsschritte der Reverse-Transkriptase-Reaktion

Zyklus	Dauer [min]	Temperatur [°C]	Effekt
1	5	25	Bindung zufälliger Hexamer- sowie oligo(dT)-Primer
2	30	42	Reverse Transkription
3	5	85	Inaktivierung der reversen Transkription
4	halten	4	Herunterkühlen

Nach erfolgter Amplifikation wurden die Proben zunächst erneut herunterzentrifugiert und anschließend direkt für Real time-PCRs verwendet oder bei -20°C tiefgefroren [118].

#### 2.2.3.4 Quantitative Real time-PCR (qRT-PCR)

Eine qRT-PCR stellt eine durch DNA-Polymerasen getriebene Reaktion zur Amplifikation und Quantifizierung spezifischer cDNA mit Hilfe entsprechender Primer (**Tabelle 2.2**) dar [118, 261]. Im Allgemeinen besteht ein solcher Amplifikationsprozess aus drei Teilschritten, die in jedem Zyklus wiederholt werden.

**Denaturierung:** Trennung der Doppelstrang-DNA (dsDNA) in zwei Einzelstränge

**Primer-Hybridisierung (Annealing):** Bindung der Primer an deren spez. Sequenz

**Polymerisation (Elongation):** Synthese von dsDNA aus den Einzelsträngen durch DNA-Polymerasen [118, 261]

Um die relative Menge der zuvor synthetisierten cDNA eines bestimmten Gens zu ermitteln, wurden DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die sich spezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA einlagern [118, 261]. Hierzu wurde SYBR Green I in Form eines vorgefertigten PCR-Supermixes dem Reaktionsmix (**Tabelle 2.6**) beige-mischt [118]. Durch Fluoreszenzmessungen während der Reaktionszyklen lässt sich, durch die Proportionalität der Fluoreszenzintensität in jedem Zyklus zur Menge an gebil-detem PCR-Produkt, auf die relative Menge eingesetzter Zielnukleinsäure schließen [118]. Das verwendete PCR-Reaktionsprogramm ist in **Tabelle 2.7** dargestellt.

**Tabelle 2.6:** Reaktionsmix-Zusammensetzung Real time-PCR

Real time-PCR-Reaktionsmix [Menge/Well]	
Reagenz	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	10
RNase freies Wasser	7
<b>Primermix bestehend aus:</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>
Forward Primer 1mM	20
Reverse Primer 1mM	20
H <sub>2</sub> O (RNase frei)	160
cDNA-Probe	2

**Tabelle 2.7:** Real time-PCR-Reaktionsprogramm

Real time-PCR-Reaktionsprogramm			
Schritt-Nr.	Bezeichnung	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zeit
1	Aktivierung der Taq-DNA-Polymerase	95	10 min
2	Denaturierung	95	10 sec
3	Primer-Hybridisierung (Annealing)	59	30 sec
4	Polymerisation (Elongation)	72	30 sec
5	Denaturierung	95	1 min
6	Schmelzkurve	55-95	variabel
7	Herunterkühlen	25	
Reaktionsschritte 2-4 wurden zur Amplifikation der DNA 40-mal wiederholt			

Zum Ausschluss unspezifischer Produkte fand eine routinemäßige Analyse der Schmelzkurve nach Amplifikation der PCR-Produkte statt [139].

### 2.2.3.5 Berechnung der relativen mRNA-Expression

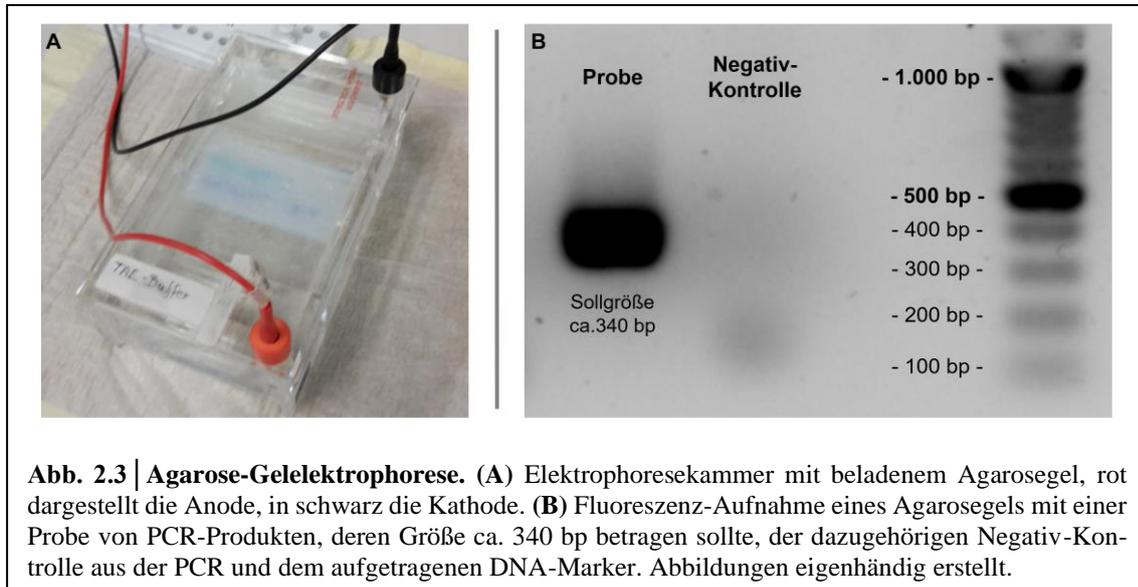
Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression wurden zunächst die Ct-Werte der einzelnen Proben durch die Software des qRT-PCR-Systems ermittelt. Diese stellen die Zykluszahl dar, in der zum ersten Mal ein bestimmter Fluoreszenzschwellenwert (*Threshold*), in diesem Fall 0,1 dRn, überschritten wurde. Diese Werte wurden als  $\Delta Ct$  anschließend in Relation zum relativen mRNA-Level der konstitutiv exprimierten, humanen Porphobilinogendeaminase (PBGD) gesetzt, die in diesem Experiment als „*Housekeeping-Gene*“ diente ( $\Delta Ct = Ct_{\text{Housekeeping}} - Ct_{\text{Zielgen}}$ ).  $\Delta\Delta Ct$ -Werte wurden errechnet ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Hypoxie}} - \Delta Ct_{\text{Normoxie}}$ ). Alle  $\Delta\Delta Ct$ -Werte entsprechen in etwa dem binären Logarithmus des *Fold Change*, also der x-fachen Änderung zum Vergleichswert. Die relative mRNA-Expression wurde letztendlich als *Fold Change* unter Verwendung folgender Formel dargestellt:  $\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Um die Resultate statistisch auswerten zu können, wurden  $\Delta Ct$ -Werte zur Berechnung herangezogen. [118, 261]

### 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der während der PCR entstandenen Reaktionsprodukte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Durch diese Technik lassen sich DNA-Fragmente nach ihrer Größe auftrennen und anhand eines mitgeführten Markers einem Längenbereich in Basenpaaren (bp) zuordnen. Dieser wurde mit der durch die verwendeten Primer zu erwartenden Produktlänge verglichen (**Abb. 2.3 B**), um möglicherweise falsche PCR-Produkte zu detektieren [118].

Hierzu wurde ein 1,5% Agarosegel aus 1,5 g Agarose und 100 mL TAE-Puffer verwendet, das nach kurzem Aufkochen in der Mikrowelle und anschließender Zugabe von 3  $\mu\text{L}$  SYBR™ Safe DNA Gel Stain zum Gelieren in Gussformen gefüllt wurde. Zur Elektrophorese wurde das ausgelierte Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt, die Taschen mit PCR-Produkt, versetzt mit Loading-Puffer, oder Marker bestückt und eine Stromstärke von 120 mA angelegt (**Abb. 2.3 A**). Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen wandert die enthaltene DNA in Richtung der Anode und wird durch den Siebeffekt des Gels ihrer Größe nach aufgetrennt [118]. Nach ca. 40 min

wurde unter UV-Transillumination eine Fluoreszenz-Aufnahme des Gels angefertigt (Abb. 2.3 B).



### 2.2.5 Apoptose- und Proliferationsassays

Zur Analyse der zellulären Effekte von Fas-Ligand auf humane PSMCs wurden verschiedene Versuche unter Verwendung kommerziell erworbener Apoptose- und Proliferationsassays durchgeführt.

Um die durch Fas-Ligand ausgelöste apoptotische Aktivität zu erfassen, wurden zunächst, analog zum Vorgehen in Kapitel 2.2.3.1, humane PSMCs (3.000 Zellen in 200  $\mu$ L Wachstumsmedium/Well) in eine 96-Well-Platte mit weißer Wandung gesät, um Interferenzen zwischen den Wells bei der abschließenden Lumineszenzmessung zu vermeiden. Nach 48-stündiger Inkubation zur Erholung wurde das Medium durch 100  $\mu$ L Wachstumsmedium (WM) ersetzt, das mit verschiedenen Konzentrationen (0,5, 5, 25 ng/mL [238]) eines rekombinanten, löslichen, humanen Fas-Liganden versetzt worden war. Dieser war zuvor nach Herstellerangaben in sterilem Wasser gelöst und in entsprechender Menge dem WM zugegeben worden. Als Kontrolle fungierten Kulturen in unverändertem WM. Die so stimulierten Zellen wurden für 24h bei 100% Luftfeuchte, 37 °C und normoxischen Bedingungen (21% O<sub>2</sub>) inkubiert. Anschließend wurde der Caspase-Glo 3/7 Apoptoseassay nach Herstellerangaben durchgeführt und die Lumineszenz der durch aktivierte Caspasen gespaltenen Substrate nach 30-minütiger Inkubation bei RT gemessen. Hierdurch ließen sich Rückschlüsse auf die Apoptoseaktivität der untersuchten Zellkulturen ziehen, die sich proportional zur gemessenen Lumineszenz verhält. [139]

Die Proliferation humaner PSMCs, die normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen ausgesetzt waren, wurde durch einen kolorimetrischen Proliferationsassay quantifiziert. Dieser beruht auf der Inkorporation des Pyrimidinanalogons 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) während der DNA-Synthese in direkter Abhängigkeit von der Anzahl proliferierender Zellen. Dabei erfolgt die Quantifizierung durch eine Absorptionsmessung nach Bindung eines enzymgekoppelten und BrdU-spezifischen Antikörpers und der durch ihn katalysierten Farbstoffreaktion.

Im Detail wurden (analog zum oben beschriebenen Procedere) 7.500 Zellen mit 1 mL Basalmedium pro Well in eine 24-Well-Platte gesät und nach der folgenden 24-stündigen Hungerperiode für 24 oder 48 h in Wachstums- oder Basalmedium inkubiert [139].

Dazu wurden die Zellen in einem der Versuchsaufbauten (1) erneut mit verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten, löslichen Fas-Liganden (0,5, 5, 25 ng/mL [238]) in 1 mL WM stimuliert und für 48h unter Normoxie inkubiert. In einem anderen (2) wurden die Zellkulturen mit einem für den FasL-Rezeptor spezifischen, neutralisierenden Antikörper (Anti-Fas, Klon ZB4, 500 ng/mL) versetzt und für 48 h in Basalmedium oder stimuliert durch 50 ng/mL *platelet-derived growth factor* (PDGF) in Basalmedium inkubiert. PDGF als potentes Mitogen spielt eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation im Zuge des pulmonalvaskulären *Remodelings* [253] und wurde zu Versuchsbeginn nach Herstellerangaben in 4 mM HCL gelöst sowie in entsprechender Menge dem Basalmedium beigemischt. Im nächsten Versuch (3) wurden die Zellkulturen für 48 h unter hypoxischen Bedingungen und unter Zugabe von FasL (25 ng/mL) in WM inkubiert. Der letzte Versuch (4) bestand aus mit Anti-Fas (500 ng/mL) versetzten Zellkulturen in WM, die für 24 h unter Hypoxie inkubiert wurden. [139]

Die den einzelnen Versuchen entsprechenden Kontrollen wurden im jeweils verwendeten Medium ohne Zusatz von FasL oder Anti-Fas, jedoch mit Zusatz des entsprechenden Lösungsmittels, unter normoxischen oder normoxischen und hypoxischen Bedingungen für die entsprechende Zeitspanne inkubiert. Zum Abschluss wurde der Proliferationsassay nach Herstellerangaben durchgeführt, die Absorption der Substratreaktion bei 370 nm gemessen (Referenzwellenlänge 492 nm) und die relative BrdU-Inkorporation durch Subtraktion der Absorptionswerte einer jeweils mitgeführten Negativkontrolle ermittelt.

### **2.2.6 Studiendesign der Humanexperimente**

Zur Analyse der zirkulierenden Profile verschiedener apoptotischer Marker während akuter und chronischer Höhenexposition, wurden zwei Studien an kirgisischen Probanden

durchgeführt [139].

Zunächst wurden, zur Untersuchung von Personen mit chronischer Höhenexposition, die Gemeinden von Sary-Mogol und Achyk-Suu ausgewählt, die sich in den Alay und Chon-Alay Regionen der Provinz Osh im Süden Kirgistans befinden. Beide Gemeinden liegen auf einer Höhe von 3.000-3.100 Hm, jedoch verbringen die meisten der Einwohner für gewöhnlich drei bis vier Monate im Jahr in noch höheren Regionen (3.200-3.600 Hm). Darüber hinaus wurde sichergestellt, dass alle Probanden ethnische Kirgisen waren und von Geburt an dauerhaft in großen Höhen gelebt hatten. Als Flachlandkontrolle wurden Freiwillige aus Bishkek, Kirgistan (ca. 760 Hm) eingeschlossen. Alle eingeschlossenen Probanden unterliefen anthropometrischen und echokardiographischen Messungen (**Abb. 2.4 B**) sowie einer peripheren Blutentnahme, aus der citriertes plättchenfreies Plasma (PFP) separiert wurde. [139]

Zur Untersuchung akut höhenexponierter Probanden diente eine Gruppe gesunder, männlicher Freiwilliger, die zu Beginn zunächst in Bishkek untersucht wurden (LA 1 (*low altitude*)), 760 Hm mit einer Außentemperatur von 28-35°C im Untersuchungszeitraum). Anschließend wurden die Teilnehmer mit dem Auto auf eine Höhe von 3.200 Hm (Tuya-Ashuu-Pass (**Abb. 2.4 A**), Kirgistan, Außentemperatur im Untersuchungszeitraum 5-20°C, Innentemperatur  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) gebracht, wo sie 20 Tage verblieben. Die ersten zwei Tage nach Ankunft verbrachten die Teilnehmer in kompletter Ruhe. In den folgenden zwei Tagen durften sie in der Ebene sowie bergab gehen. Anschließend folgten sie einem gewöhnlichen Tagesablauf mit *Indoor*-Spielen, Billiard, Tischtennis, Spaziergehen und Küchenpflichten. Alle Probanden waren frei von kardialen und neurologischen Symptomen und erhielten in keiner Form eine Medikation. Zusätzlich zur Ausgangsuntersuchung in Bishkek (LA 1) unterliefen alle Teilnehmer echokardiographischen Untersuchungen (**Abb. 2.4 B**) sowie peripheren Blutentnahmen mit Separation von EDTA-Plasma an den Tagen 2 (HA 2 (*high altitude*)), 7 (HA 7) und 20 (HA 20) der Höhenexposition sowie am zweiten Tag nach Rückkehr nach Bishkek (LA 2). Zusätzlich wurden anthropometrische Daten zu allen Probanden erhoben. [139]

Beide Studienprotokolle wurden durch die Ethikkommissionen des Nationalen Zentrums für Kardiologie und Innere Medizin, Bishkek, Kirgistan sowie der Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland unter den in Kapitel 2.1.8 genannten Aktenzeichen genehmigt.



### 2.2.7 Anthropometrische Datenerhebung und Echokardiographie

Verschiedene anthropometrische Daten wie Alter, Geschlecht, *Body-Mass-Index* (BMI) und Körperoberfläche (*body surface area*, BSA) wurden erhoben. Dabei wurde der BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) mittels der Formel

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße (m)}^2}$$

ermittelt. Die Körperoberfläche wurde mithilfe der Du Bois-Formel errechnet:

$$\text{BSA (m}^2\text{)} = 0,007184 * \text{Körpergröße (cm)}^{0,725} * \text{Körpergewicht (kg)}^{0,425}$$

Als Surrogatparameter des geschätzten systolischen PAP (sPAP) wurde die maximale Druckdifferenz zwischen rechtem Ventrikel und rechtem Vorhof während der Systole verwendet. Diese wurde echokardiographisch durch den Regurgitationsgradienten über der Trikuspidalklappe (*tricuspid regurgitant gradient*, TRG, in mmHg) bestimmt. Dazu wurde die Spitzengeschwindigkeit der trikuspidalen Regurgitation per CW (*continuous wave*)-Doppler gemessen und die zugrundeliegende Druckdifferenz mittels vereinfachter Bernoullie-Gleichung errechnet [342]. [139]

$$\Delta P \approx 4V^2$$

$\Delta P$ : Druckdifferenz = TRG (mmHg), V: max. Flussgeschwindigkeit (m/s) [342]

### 2.2.8 Plasmaseparation

Nach Punktion einer peripheren Vene wurde das Blut zur Gewinnung Plättchenfreien Plasmas in kommerziellen Citrat-Vakuümröhrchen aufgefangen und bei Raumtemperatur zentrifugiert (zunächst bei 500 G/15 min gefolgt von 10.000 G/5 min). Im Anschluss

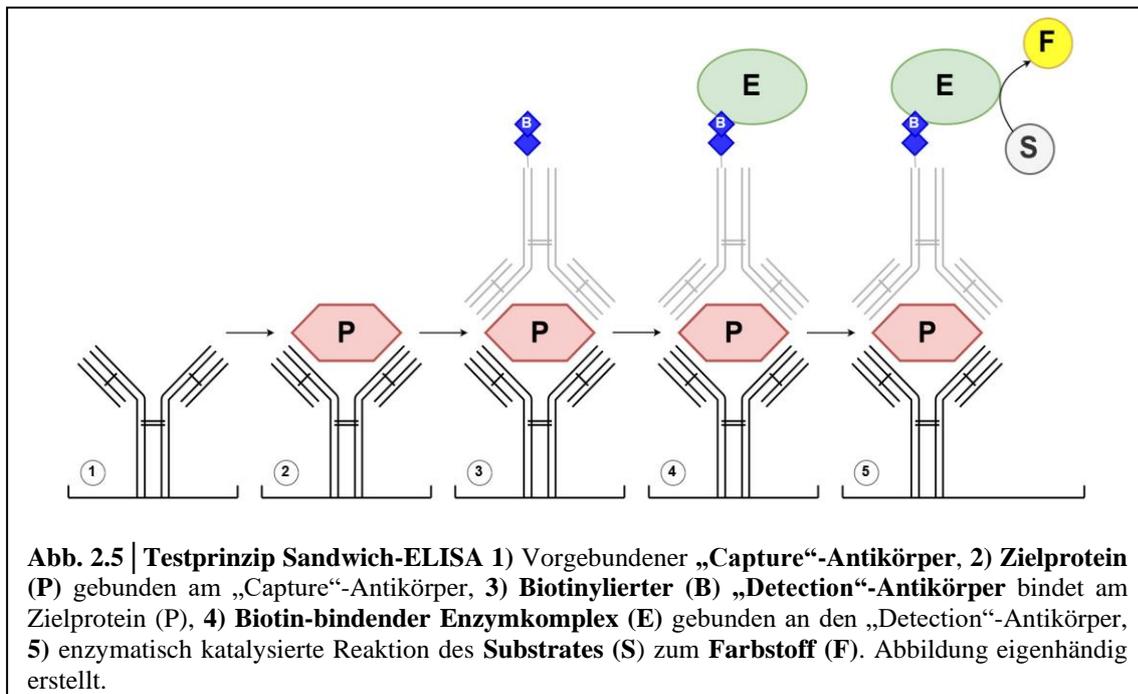
wurde der Überstand (PFP) in Kryoröhrchen überführt und für den Transport bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Zur Gewinnung des EDTA-Plasmas wurde das Blut während der peripheren Venenpunktion in kommerziellen EDTA-Röhrchen aufgefangen und direkt nach Entnahme durch 8-10-maliges Invertieren gemischt. Das Plasma wurde durch Zentrifugation ( $1.500\text{ G}/15\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$ ) und Transfer des Überstands in Kryoröhrchen gewonnen, die für den Transport sofort bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren wurden. Nach Ankunft der Proben am Bestimmungsort wurden diese bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.9 ELISA

Zur Analyse der Plasmalevel verschiedener zirkulierender Marker, darunter ApoC1, TRAIL, FasL sowie BNP, wurden ELISA-Messungen von EDTA-Plasmaproben sowie citriertem PFP durchgeführt. Bei den Messungen fanden sowohl kompetitive als auch Sandwich-ELISA-Systeme Anwendung. Die einzelnen Tests wurden nach den Vorgaben der Hersteller durchgeführt und abschließend die Absorption unter der angegebenen Mess- sowie Referenzwellenlänge photometrisch ermittelt. Die Errechnung der gesuchten Plasmakonzentrationen wurde anhand einer 5-Parameter logistischen Regression der Standardkurve durchgeführt. Zur Erhöhung der Messgenauigkeit wurden alle Proben sowie die Standardreihe in Doubletten pipettiert und die Absorption nach erfolgter Messung gemittelt.

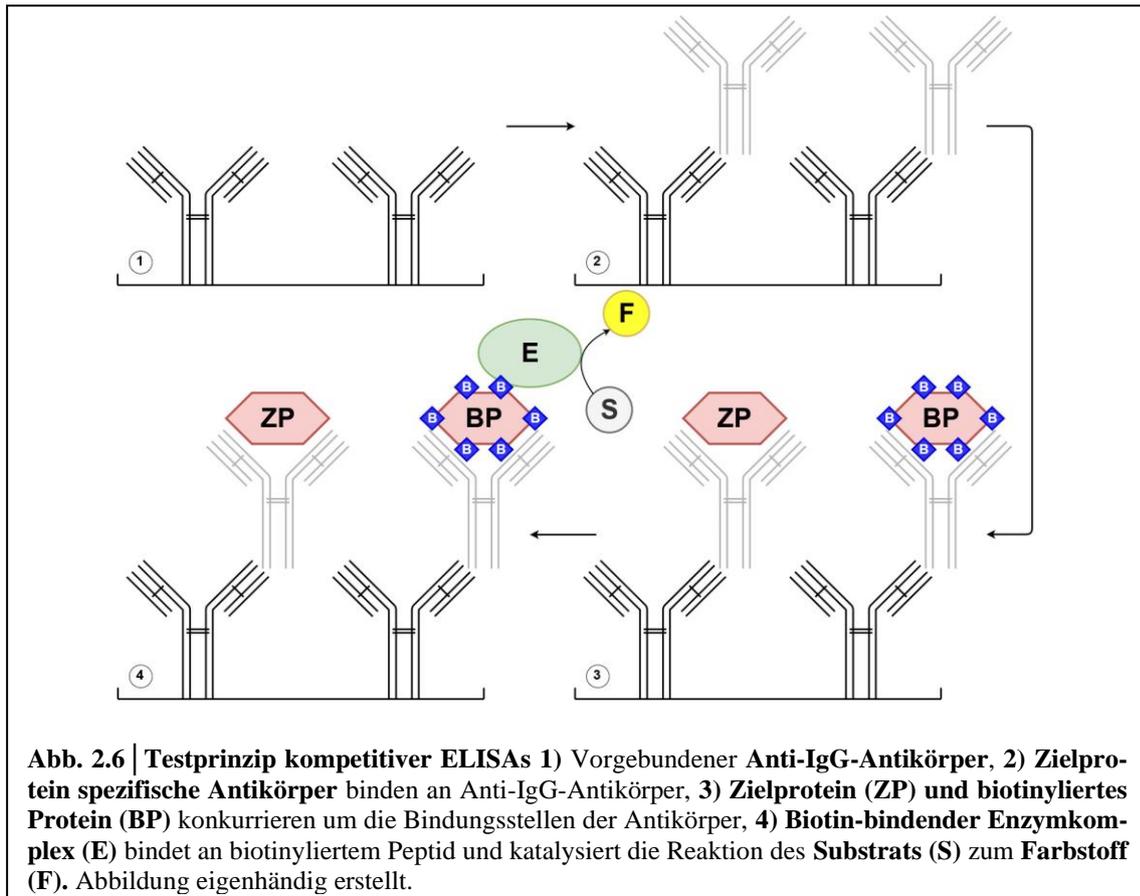
#### 2.2.9.1 Testprinzip eines Sandwich-ELISAs

Die Wandungen der einzelnen Wells eines Sandwich-ELISA sind vor Testbeginn bereits mit für das Zielantigen spezifischen *Capture*-Antikörpern beschichtet (**Abb. 2.5 (1)**). Nach Zugabe der Proben oder Standards wird das entsprechende Antigen durch den Antikörper gebunden (**Abb. 2.5 (2)**) und ein Waschschriff schließt sich an, um ungebundene Proteine zu entfernen. Ein Biotin-konjugierter *Detection*-Antikörper wird hinzugegeben und bindet an das bereits am *Capture*-Antikörper gebundene Zielprotein (**Abb. 2.5 (3)**). Ungebundene *Detection*-Antikörper werden durch erneutes Waschen entfernt und ein Biotin-bindender Enzymkomplex, der die anschließende Farbreaktion katalysiert, wird hinzugegeben (**Abb. 2.5 (4)**). Nach einem erneuten Waschprozess, um ungebundene Enzymkomplexe zu entfernen, wird schließlich ein Substrat hinzugefügt, das enzymatisch durch den zuvor gebundenen Komplex in einen Farbstoff umgesetzt wird. Die Farbreaktion wird durch Zugabe einer Säure gestoppt und deren Absorption anschließend photometrisch bestimmt (**Abb. 2.5 (5)**). Anhand der erhaltenen Absorption lässt sich die Konzentration des Zielproteins in der Probe unter Verwendung der Standardkurve ableiten. [228]



### 2.2.9.2 Testprinzip eines kompetitiven ELISAs

Bei kompetitiven ELISA-Systemen ist die Oberfläche der Microplatte bei Testbeginn zunächst mit Anti-IgG-Antikörpern beschichtet (**Abb. 2.6 (1)**), an die im ersten Reaktionsschritt für das gesuchte Zielantigen spezifische IgG-Antikörper gebunden werden (**Abb. 2.6 (2)**). Anschließend werden die Wells gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Vor Beginn des nächsten Teilschritts werden sowohl die Proben als auch die mitgeführten Standardlösungen mit einer genau definierten Menge biotinylierten Peptids versetzt. Nach Zugabe der so modifizierten Proben- und Standardlösungen konkurriert nun das eigentlich in den Lösungen enthaltene Zielpeptid (ZP) mit dem hinzugefügten biotinylierten Peptid (BP) um die spezifischen Bindungsstellen der Antikörper (**Abb. 2.6 (3)**). Nach einem erneuten Waschvorgang, um ungebundene Proteine zu entfernen, wird nun ein Enzymkomplex (E) hinzugegeben, der nur an das Biotin des gebundenen, biotinylierten Proteins bindet und im nächsten Reaktionsschritt nach erneutem Waschen die Reaktion des Substrats (S) zu einem sichtbaren Farbstoff (F) katalysiert (**Abb. 2.6 (4)**). Diese Reaktion wird nach einer gewissen Zeit durch Zugabe einer Säure gestoppt. Anhand der Farbreaktion und deren Absorption in Abhängigkeit vom Verhältnis des Zugefügten biotinylierten Peptids (BP) zum natürlich in der Probe vorhandenen Zielpeptid lässt sich die ursprüngliche Konzentration des gesuchten Proteins in der Probe feststellen. Die Signalstärke ist dabei umgekehrt proportional zur ursprünglichen Antigenmenge in der Probe. [228]



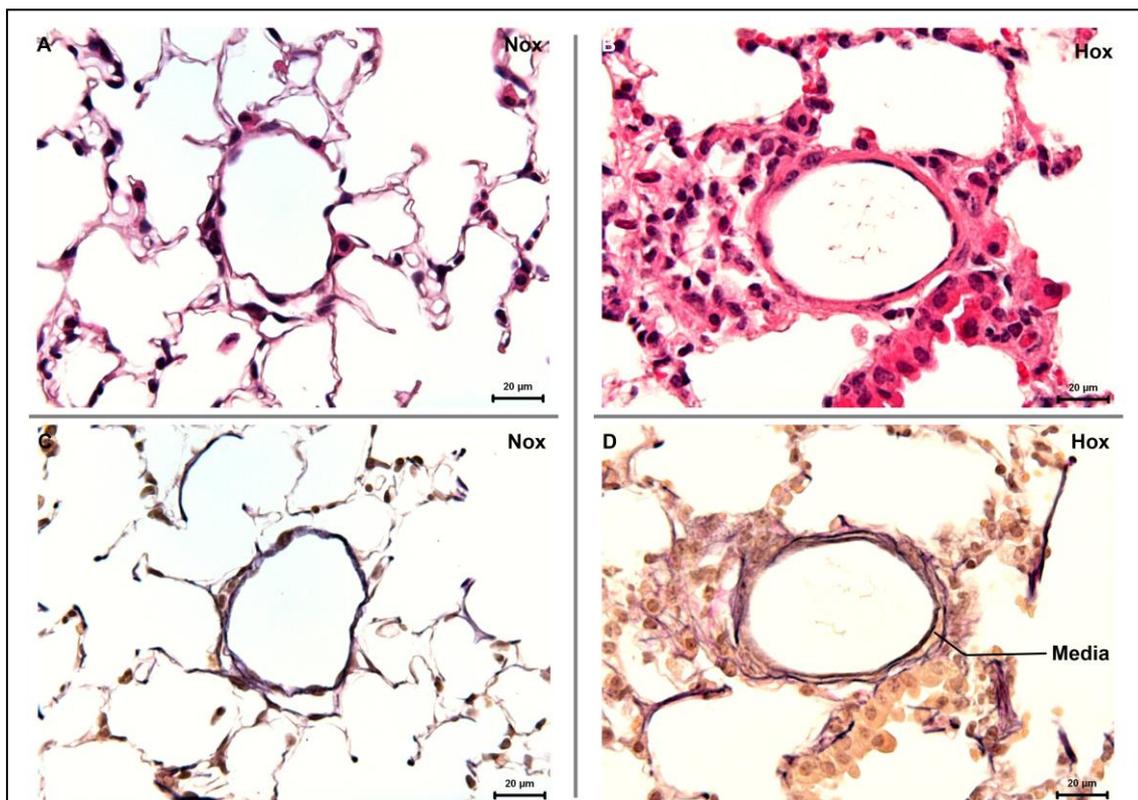
### 2.2.10 Datenanalyse

Die graphische Darstellung der gewonnenen Daten erfolgte in Form von Balkendiagrammen als arithmetisches Mittel  $\pm$  der jeweiligen Standardabweichung (SD). Zur Analyse der Zellkulturdaten wurden der ungepaarte-t-Test mit Welch's Korrektur oder der ordinary one-way ANOVA mit Dunnett's oder Tukey's multiple comparisons Test herangezogen. Daten basierend auf ELISA oder echokardiographischen Messungen wurden mit Hilfe des Friedman Tests mit Dunn's multiple comparisons Test, des RM one-way ANOVA mit Tukey's multiple comparisons Test oder des ordinary one-way ANOVA mit Tukey's multiple comparisons Test ausgewertet. Zu Korrelationsanalysen wurden Spearman oder Pearson Tests herangezogen. P-Werte von  $\leq 0,05$  wurden hierbei als statistisch signifikant angesehen. [139]

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Pulmonalvaskuläres *Remodeling* unter Hypoxie

Zur Darstellung struktureller Umbauprozesse des pulmonalvaskulären Systems im Rahmen der Exposition gegenüber großen Höhen und Hypoxie wurden histologische Lungenschnitte chronisch hypoxieexponierter Mäuse angefertigt. Dabei wurden sowohl periphere, kaum bis nicht muskularisierte Pulmonalarterien (**Abb. 3.1**) als auch zentralere, bronchusnahe, schwach muskularisierte Arterien der Lunge (**Abb. 3.2**) betrachtet.



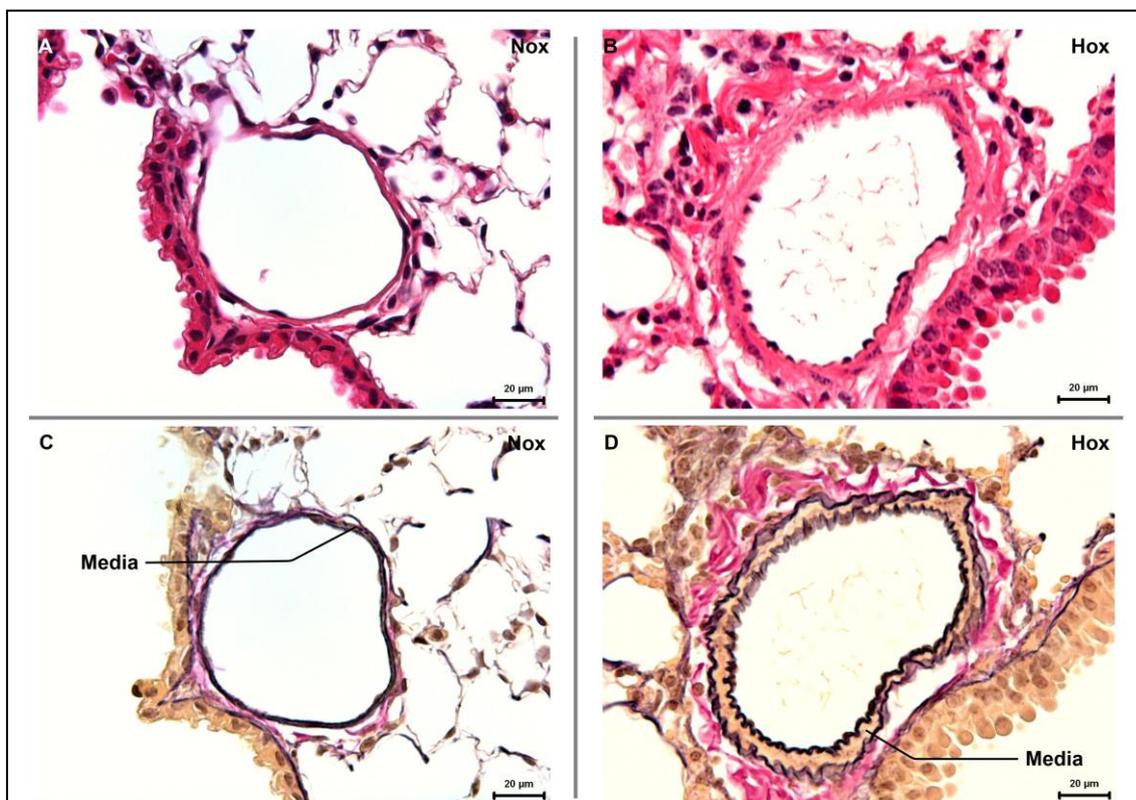
**Abb. 3.1 | Vaskuläres *Remodeling* peripherer, pulmonaler Arterien in Mäuselungen nach hypoxischer Inkubation.** Abgebildet sind Serienschritte peripherer, pulmonaler Arterien (Durchmesser < 100 µm) aus Mäuselungen nach fünfwöchiger normoxischer (Nox, 21% O<sub>2</sub>) (**A, C**) und normobar hypoxischer (Hox, 10% O<sub>2</sub>) (**B, D**) Inkubation. Die Spalten verfolgen jeweils dasselbe Gefäß im Verlauf in HE- Färbung (**A, B**) sowie EvG-Färbung (**C, D**). *Tunica media* innerhalb der nach EvG gefärbten Schnitte markiert (**Media**). Vergrößerung 63-fach.

Elastica-van-Gieson (EvG)-Färbung (schwarzviolette elastische Fasern, rote kollagene Fasern, gelbes Muskelgewebe und Zytoplasma und schwarzviolette Nuclei), Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung (zart rosa bis rotes Zytoplasma und kollagene Fasern, blauviolette Zellkerne).

Wie bereits in *Grimminger et al.* [91] und *Pak et al.* [211] beschrieben, konnte dabei eine deutliche Verdickung der Gefäßwände nach Exposition gegenüber chronischer Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Verhältnissen, sowohl in kaum bis nicht muskularisierten, peripheren Gefäßen (< 100 µm Durchmesser) (**Abb. 3.1 B, D**) als auch in zentraleren, schwach muskularisierten Lungenarterien (< 200 µm Durchmesser) (**Abb. 3.2 B, D**)

nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung der nach EvG gefärbten Präparate, die eine einfachere Differenzierung der Gefäßwandschichten zulassen, fällt nach hypoxischem Reiz im Falle der vormals schwach muskularisierten, zentraleren Arterien vor allem eine Zunahme der, durch die Tunica elastica interna und externa begrenzten, Media sowie der nach außen angrenzenden Adventitia auf (**Abb. 3.2 C, D**). Jedoch auch vormals kaum bis nicht muskularisierte periphere Arterien der Lunge (< 100 µm Durchmesser), in denen unter Normoxie keine mediale Wandschicht auszumachen war, zeigen in der EvG-Färbung nach Exposition gegenüber chronischer Hypoxie eine deutlich sichtbare Tunica media (**Abb. 3.1 C, D**). In der Literatur wird von „de novo“-Muskularisierung gesprochen [91].

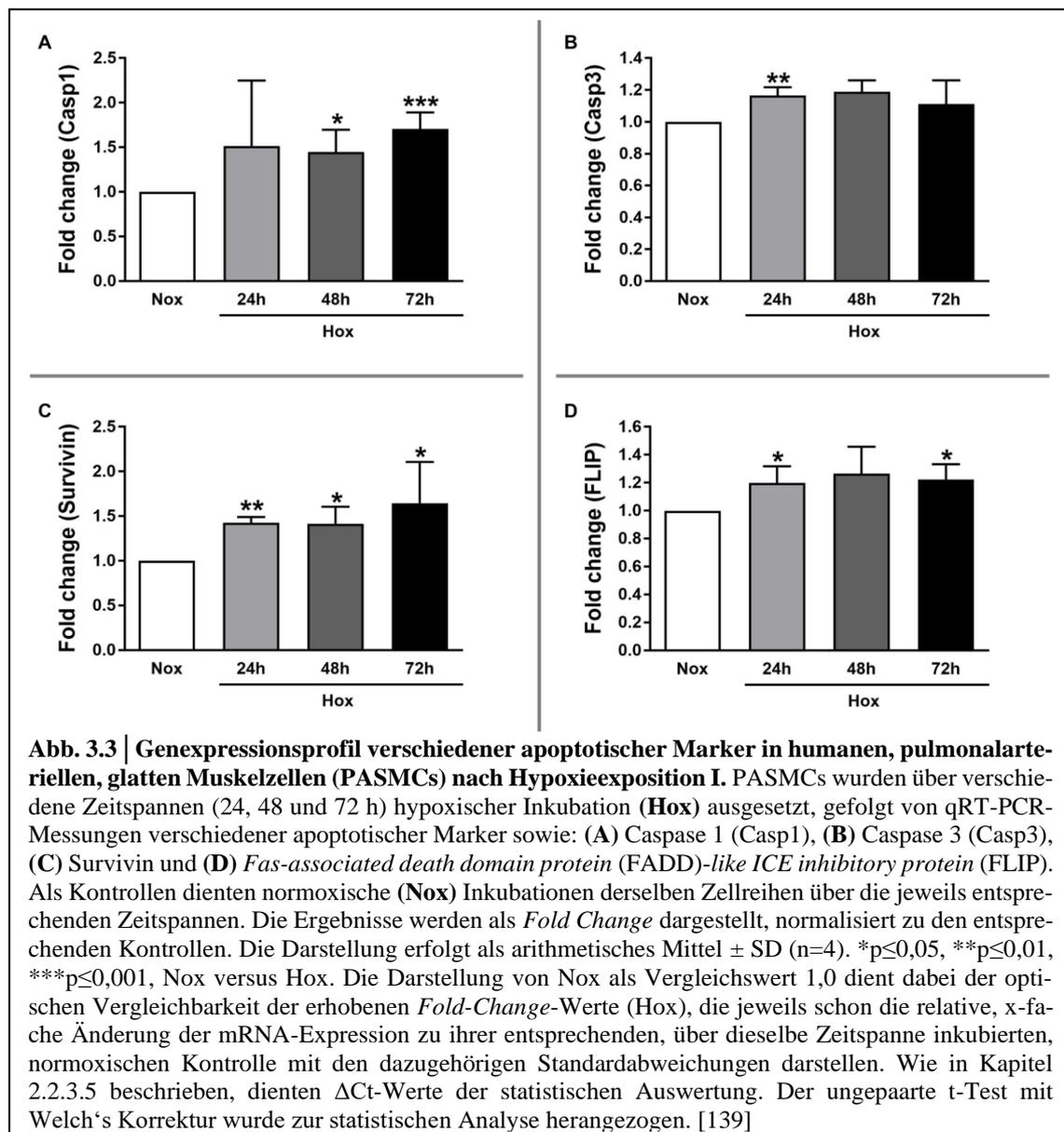


**Abb. 3.2 | Vaskuläres *Remodeling* bronchusnaher, pulmonaler Arterien in Mäuselungen nach hypoxischer Inkubation** Abgebildet sind Serienschritte bronchusnaher, pulmonaler Arterien (Durchmesser < 200 µm) aus Mäuselungen nach 5-wöchiger normoxischer (Nox, 21% O<sub>2</sub>) (**A, C**) und normobar hypoxischer (Hox, 10% O<sub>2</sub>) (**B, D**) Inkubation. Die Spalten verfolgen jeweils dasselbe Gefäß im Verlauf in HE- Färbung (**A, B**) sowie EvG-Färbung (**C, D**). *Tunica media* innerhalb der nach EvG gefärbten Schnitte markiert (**Media**). Vergrößerung 63-fach.

Elastica-van-Gieson (EvG)-Färbung (schwarzviolette elastische Fasern, rote kollagene Fasern, gelbes Muskelgewebe und Zytoplasma und schwarzviolette Nuclei), Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung (zart rosa bis rotes Zytoplasma und kollagene Fasern, blauviolette Zellkerne).

### 3.2 Variation der Genexpression verschiedener apoptotischer Marker in humanen PSMCs nach hypoxischer Inkubation

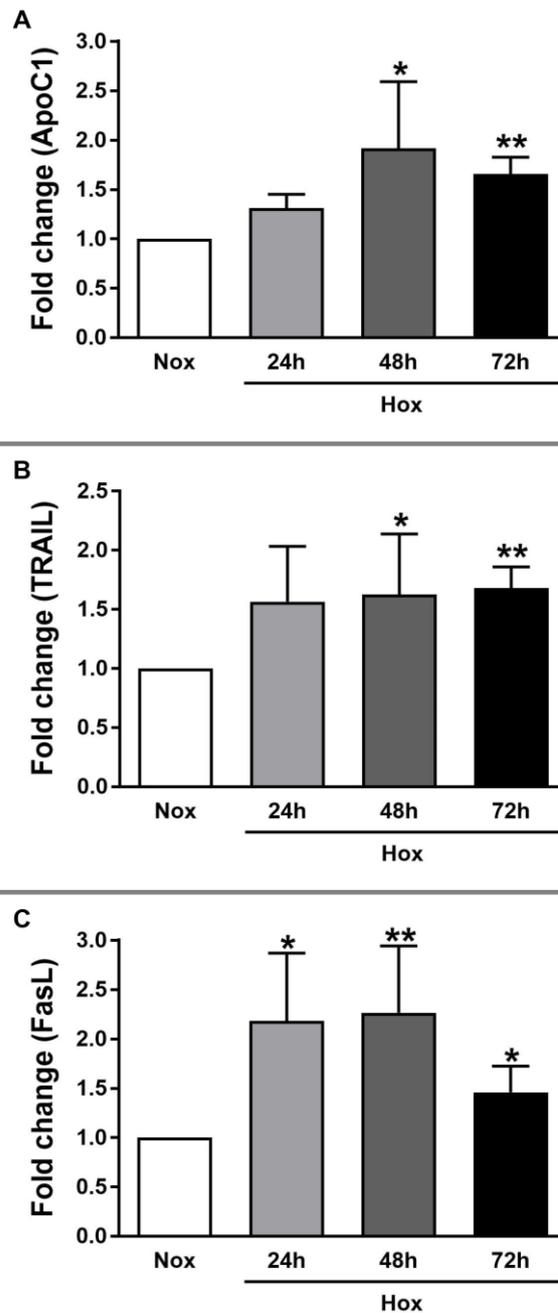
Zur Analyse des Effekts hypoxischer Umweltbedingungen auf die Alternanz apoptotischer Marker in der pulmonalvaskulären Zirkulation wurden zunächst auf zellulärer Ebene mRNA-Expressionsprofile verschiedener dieser Marker in humanen PSMCs nach hypoxischer Inkubation untersucht. Wie bereits im Kapitel „Material & Methoden“ beschrieben, wurden hierzu humane PSMCs über verschiedene Zeitspannen (24, 48, und 72 h) hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und anschließend die Genexpressionslevels verschiedener apoptotischer Marker, wie Caspase 1 und 3, Survivin, FLIP, ApoC1, TRAIL und FasL (**Abb. 3.3 und 3.4**), mittels qRT-PCR quantifiziert und denen der korrespondierenden normoxischen Kontrollen als *Fold Change* gegenübergestellt [139].



Im Wesentlichen zeigten alle der untersuchten apoptotischen Signale eine Zunahme ihres Expressionsprofils in humanen PSMCs nach hypoxischem Stimulus verglichen zu den jeweiligen normoxischen Kontrollen (**Abb. 3.3 und 3.4**) [139].

Betrachtet man die Expressionsprofile der verschiedenen Marker im Einzelnen, so scheinen Einige unter ihnen, wie Caspase 3, FLIP und TRAIL (**Abb. 3.3 B, D und 3.4 B**), ein über die Dauer der hypoxischen Inkubation annähernd konstant erhöhtes Level ihrer Expression zu zeigen. Dem gegenüber scheinen Andere, wie Caspase 1 und Survivin (**Abb. 3.3 A, C**), ihre mRNA-Expression nach 72-stündiger Inkubation unter Hypoxie noch einmal zu steigern, wohingegen es bei ApoC1 und FasL (**Abb. 3.4 A, C**) nach einem Expressionspeak nach 48-stündiger Inkubation zu einem Einbruch der Expressionssteigerung zu kommen scheint, jedoch immer noch deutlich und signifikant erhöht gegenüber der normoxischen Kontrolle. Klare und einheitlich zeitabhängige Veränderungen in den Expressionsprofilen der untersuchten Marker waren allerdings nicht festzustellen.

Während die mRNA-Expression von Caspase 3 und FLIP (**Abb. 3.3 B, D**) im Vergleich zur Normoxie insgesamt nur eine dezente Steigerung unter Hypoxie aufwies, fiel diese in den Fällen von Casp 1, ApoC1 und TRAIL schon deutlicher aus (**Abb. 3.3 A und 3.4 A, B**). Die prominenteste und, während allen Zeitpunkten der hypoxischen Inkubation, statistisch signifikante Steigerung der Expression, im Vergleich zu den entsprechenden normoxischen Kontrollen, konnte jedoch in den Fällen von Survivin und FasL (**Abb. 3.3 C und 3.4 C**) nachgewiesen werden [139].



**Abb. 3.4 | Genexpressionsprofil verschiedener apoptotischer Marker in PSMCs nach Hypoxieexposition II.** PSMCs wurden über verschiedene Zeitspannen (24, 48 und 72 h) hypoxischer Inkubation (**Hox**) ausgesetzt, gefolgt von qRT-PCR-Messungen verschiedener apoptotischer Marker sowie: **(A)** Apolipoprotein C1 (ApoC1), **(B)** *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) und **(C)** Fas-Ligand (FasL). Als Kontrollen dienten normoxische (**Nox**) Inkubationen derselben Zellreihen über die jeweils entsprechenden Zeitspannen. Die Ergebnisse werden als *Fold Change* dargestellt, normalisiert zu den entsprechenden Kontrollen. Die Darstellung erfolgt als arithmetisches Mittel  $\pm$  SD (n=4). \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , Nox versus Hox. Die Darstellung von Nox als Vergleichswert 1,0 dient dabei der optischen Vergleichbarkeit der erhobenen *Fold-Change*-Werte (Hox), die jeweils schon die relative, x-fache Änderung der mRNA-Expression zu ihrer entsprechenden, über dieselbe Zeitspanne inkubierten, normoxischen Kontrolle mit den dazugehörigen Standardabweichungen darstellen. Wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben, dienten  $\Delta C_t$ -Werte der statistischen Auswertung. Der unpaarte t-Test mit Welch's Korrektur wurde zur statistischen Analyse herangezogen. [139]

### 3.3 Zirkulierende Profile apoptotischer Marker in humanen Probanden unter Exposition gegenüber großen Höhen

Um die Profile apoptotischer Marker in vivo und am Menschen während Exposition gegenüber den Umweltbedingungen in großen Höhen zu untersuchen, wurden die im Blutplasma zirkulierenden Konzentrationen verschiedener dieser Marker sowie ApoC1, TRAIL und FasL während und nach Exposition bestimmt. Zusätzlich wurden die Plasmakonzentrationen von BNP als Marker für myokardialen Stress bestimmt [81]. Zur Differenzierung akuter und chronischer Effekte der Höhenexposition wurden zwei unterschiedliche Studien etabliert.

#### 3.3.1 Zirkulierende Profile apoptotischer Marker während akuter Höhenexposition kirgisischer Freiwilliger

Zur Analyse des Effekts akuter Höhenexposition wurden freiwillige Probanden, die ursprünglich aus den Flachlandregionen Kirgistans stammen, akut für 20 Tage den Bedingungen in einer Höhe von ca. 3.200 Hm ausgesetzt. Hierbei wurden zu verschiedenen Zeitpunkten anthropometrische und echokardiographische Daten (**Tabelle 3.1**) erhoben sowie Blutproben zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen oben genannter Marker (**Abb. 3.5**) entnommen und mittels ELISA bestimmt: vor Exposition, unter Flachlandbedingungen (bei ca. 760 Hm) (LA 1), an den Tagen 2 (HA 2), 7 (HA 7) und 20 (HA 20) der Höhenexposition sowie am zweiten Tag nach Rückkehr in eine Höhe von ca. 760 Hm (LA 2).

**Tabelle 3.1:** Akute Höhenexposition - anthropometrische und echokardiographische Daten humaner Probanden [139]

Alter (Jahre)	Geschlechter-Relation m/w (%)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	BSA (m <sup>2</sup> )	TRG (mmHg)				
				LA 1	HA 2	HA 7	HA 20	LA 2
25,4 ± 4,2	100/0	23,0 ± 1,9	18,8 ± 0,1	18,5 ± 1,1	23,0 ± 2,2 <sup>***§§</sup>	20,9 ± 0,8 <sup>*</sup>	19,5 ± 1,6	18,4 ± 1,1

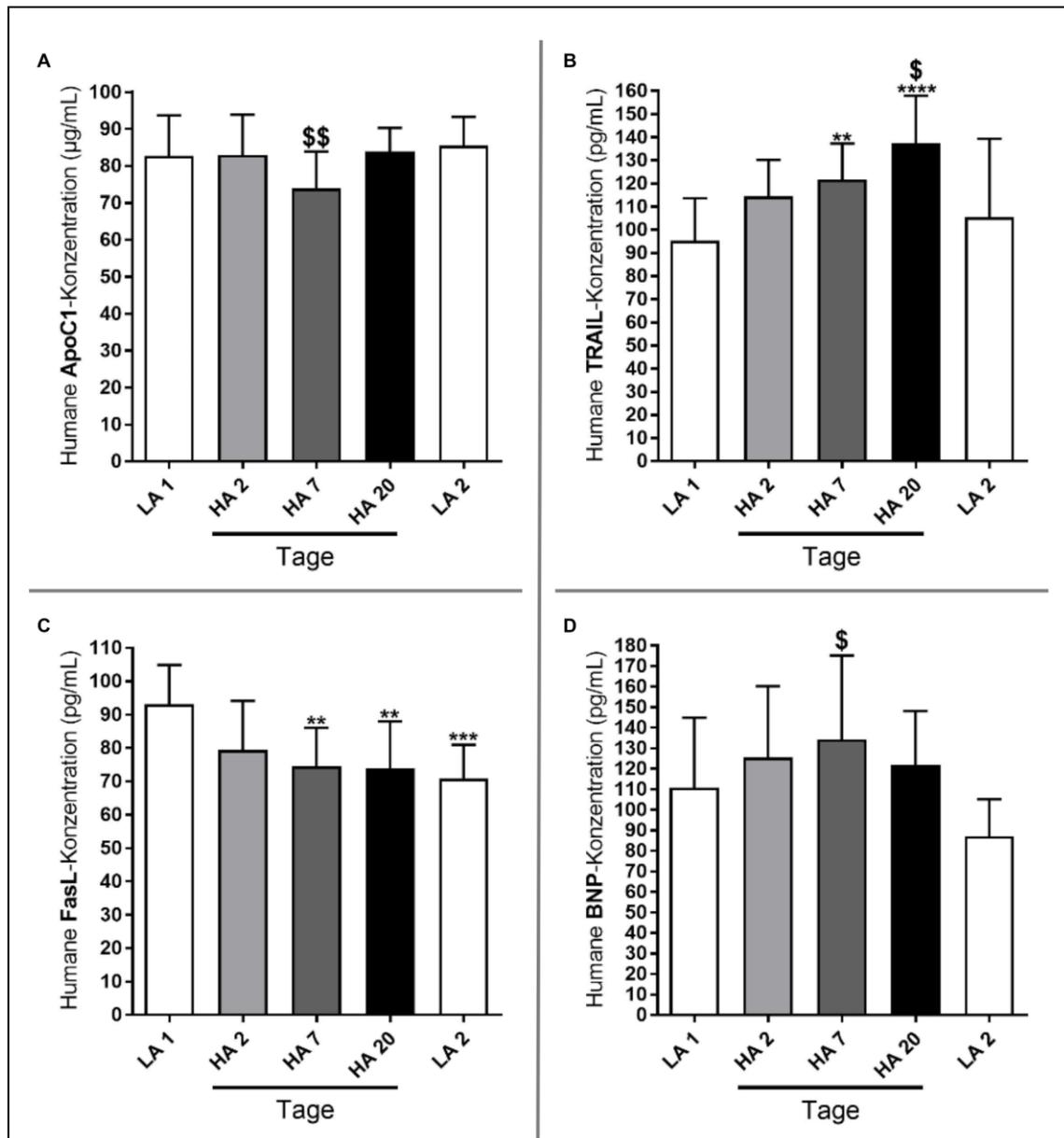
Erwachsene Freiwillige, die ursprünglich aus den Flachlandregionen Kirgistans stammen (LA 1) (n=8) wurden akut für 2 (HA 2) (n=8), 7 (HA 7) (n=8) und 20 (HA 20) (n=8) Tage großer Höhe ausgesetzt. Nach dem 20. Tag kehrten sie ins Flachland zurück und wurden am zweiten Tag nach ihrer Rückkehr erneut untersucht (LA 2). Verschiedene anthropometrische und echokardiographische Daten wurden zu den eben genannten Zeitpunkten erhoben und finden sich in dieser Tabelle wieder. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als arithmetisches Mittel ± SD (n=8). \*p≤0,05, \*\*\*p≤0,001 verglichen mit LA 1. §§p≤0,01 verglichen mit LA 2. Zur statistischen Analyse wurde der Friedman Test mit Dunn's Korrektur verwandt. m, männlich; w, weiblich; BMI, *body mass index* (in kg/m<sup>2</sup>); BSA, *body surface area* (in m<sup>2</sup>); TRG, *tricuspid regurgitant gradient* (in mmHg).

## Ergebnisse

Die generellen anthropometrischen Daten einschließlich Alter, BMI sowie der Körperoberfläche stellten sich als vergleichbar unter allen teilnehmenden Probanden dar (**Tabelle 3.1**). Die Daten der echokardiographischen Untersuchungen (**Tabelle 3.1**) der Probanden über die verschiedenen Zeitpunkte hinweg zeigten eine signifikante Steigerung des Regurgitationsgradienten der Trikuspidalklappe (TRG) zu Beginn der Höhenexposition (HA 2) sowohl gegenüber den Ausgangswerten der initialen Bestimmung im Flachland (LA 1) als auch gegenüber denen nach Beenden der Höhenexposition (LA 2). Dieser Effekt reduzierte sich im Laufe der Exposition. Während sich der TRG nach einem Expositionszeitraum von einer Woche (HA 7) zwar als gesunken, doch immer noch signifikant erhöht gegenüber dem Ausgangswert darstellte, so näherte er sich gegen Ende der Exposition (HA 20) diesem an und erreichte nach deren Ende in etwa das ursprüngliche Niveau (LA 2). [139]

Ebenfalls zeigten sich unterschiedliche Konzentrationsprofile der apoptotischen Marker in der Blutzirkulation der untersuchten Probanden während akuter Höhenexposition. Die zirkulierenden ApoC1-Levels (in  $\mu\text{g/mL}$ ) waren in etwa vergleichbar zwischen den einzelnen Zeitpunkten der Bestimmung, mit Ausnahme von Tag 7 (HA 7) der Höhenexposition, an dem eine eher geringe, jedoch signifikante Verringerung der ApoC1-Konzentration im Vergleich zu dessen Plasmakonzentration nach Rückkehr ins Flachland zu erkennen war (**Abb. 3.5 A**). Weiterhin war eine stetige Zunahme der Plasmakonzentration von TRAIL (in  $\text{pg/mL}$ ) nach Beginn und über die verschiedenen Zeitpunkte der Höhenexposition erkennbar, die sich am siebten (HA 7) und 20. (HA 20) Tag der Exposition als signifikant erhöht gegenüber der Konzentration in Flachlandbedingungen vor Beginn der Exposition (LA 1) erwies (**Abb. 3.5 B**). Nach Beenden der Exposition und Rückkehr in die Ausgangshöhe zeichnete sich ein gegenüber der letzten Bestimmung in großer Höhe signifikanter Rückgang der TRAIL-Konzentration im Blutplasma ab (**Abb. 3.5 B**). Im Falle von FasL offenbarte sich eine klare Reduktion des Plasmalevels dieses Markers (in  $\text{pg/mL}$ ) unter Höhenbedingungen verglichen zum Flachland (LA 1) (**Abb. 3.5 C**). Diese Reduktion präsentierte sich während der ersten Woche der Exposition als zunehmend und verblieb dann für den restlichen Expositionszeitraum auf einem stabilen, gegenüber der Ausgangsmessung (LA 1) signifikant reduzierten Niveau (HA 7, 20). Überraschenderweise behielt die Plasmakonzentration von FasL dieses Niveau nach Abschluss der Höhenexposition und Rückkehr ins Flachland (LA 2) bei und blieb weiterhin statistisch signifikant gegenüber der ersten Bestimmung im Flachland (LA 1) reduziert (**Abb. 3.5 C**).

Zu guter Letzt konnte ein sichtbarer Trend zu erhöhten BNP-Konzentrationen (pg/mL) während der unterschiedlichen Zeitpunkte der Höhenexposition, gefolgt von einer markanten Reduktion dieser nach Rückkehr in Flachlandbedingungen über das Niveau der Ausgangsmessung (LA 1) hinaus, festgestellt werden (**Abb. 3.5 D**). Allerdings erwiesen sich diese Differenzen nur im Falle der BNP-Konzentrationen am siebten Tag der Höhenexposition als statistisch signifikant im Vergleich zu denen nach Rückkehr in niedrigere Höhen. [139]



**Abb. 3.5 | Zirkulierende apoptotische Marker in humanen Probanden während akuter Höhenexposition.** Gesunde Freiwillige aus den Flachlandregionen Kirgistans (LA 1) (n=7-8) wurden akut den Höhenbedingungen (HA) in ca. 3200 Hm über einen Zeitraum von 20 Tagen ausgesetzt. Nach Exposition gegenüber diesen extremen Umweltbedingungen kehrten sie erneut ins Flachland zurück (LA 2) (n=8). Echokardiographische Messungen sowie die Entnahme von Blutproben erfolgten zu folgenden Zeitpunkten: Vor Exposition, im Flachland (LA 1), während der Höhenexposition an Tag 2 (HA 2) (n=8), Tag 7 (HA 7) (n=8) und Tag 20 (HA 20) (n=8) und am zweiten Tag nach ihrer Rückkehr ins Flachland (LA 2). Das Blutplasma wurde separiert und es wurden ELISA-Messungen zur Detektion und Quantifikation der folgenden zirkulierenden Apoptosemarker durchgeführt: **(A)** Apolipoprotein C1 (ApoC1), **(B)** *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und **(C)** Fas-Ligand (FasL). Zusätzlich wurde das zirkulierende Profil des B-typ natriuretischen Peptids (BNP) **(D)** durch ELISA-Messungen bestimmt. Alle Ergebnisse sind als Konzentration der oben genannten Marker (in µg oder pg pro mL Plasma) angegeben und als arithmetisches Mittel ± SD (n=7-8) dargestellt. <sup>\*\*</sup>p≤0,01, <sup>\*\*\*</sup>p≤0,001, <sup>\$\$\$</sup>p≤0,0001 verglichen mit LA 1. <sup>\$</sup>p≤0,05, <sup>\$\$</sup>p≤0,01 verglichen mit LA 2. Zur statistischen Analyse wurden der Friedman Test mit Dunn's *multiple comparisons* Test, der RM *one-way* ANOVA mit Tukey's *multiple comparisons* Test oder der *ordinary one-way* ANOVA mit Tukey's *multiple comparisons* Test herangezogen. LA, low altitude; HA, high altitude. [139]

### 3.3.2 Zirkulierende Profile apoptotischer Marker in kirgisischen Hoch- und Flachlandbewohnern

Zur Analyse des Effekts chronischer Höhenexposition wurden, wie bereits im Kapitel „Material & Methoden“ beschrieben, freiwillige Probanden, die dauerhaft in den Höhenregionen Kirgistans (3.000-3.100 Hm) leben, mit Personen verglichen, die aus den Flachlandregionen Kirgistans (ca. 760 Hm) (Flachland-Kontrolle) stammen. Die Gruppe, der im Hochland Beheimateten wurde weiterhin unterteilt in eine Gruppe, die bereits eine Pulmonale Hypertonie entwickelt hatte (PH) und eine, deren Individuen diese pulmonal-vaskuläre Erkrankung nicht entwickelt hatten (Non-PH). Alle Probanden unterliefen einer anthropometrischen sowie echokardiographischen Datenerhebung (**Tabelle 3.2**) sowie einer Blutentnahme zur laborchemischen Bestimmung der oben genannten Marker mittels ELISA (**Abb. 3.6**).

**Tabelle 3.2:** Chronische Höhenexposition - anthropometrische und echokardiographische Daten humaner Probanden [139]

	Alter (Jahre)	Geschlechter-Relation m/w (%)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	BSA (m <sup>2</sup> )	TRG (mmHg)
<b>Flachland-Kontr.</b>	20,6 ± 2,9	100/0	23,1 ± 1,6	1,9 ± 0,1	20,9 ± 1,6
<b>HA-Non-PH</b>	50,5 ± 11,3	60/40	23,9 ± 4,0	1,7 ± 0,1	20,7 ± 0,4
<b>HA-PH</b>	53,1 ± 14,6	42/58	25,5 ± 5,3	1,7 ± 0,1	46,7 ± 6,0 <sup>*****</sup>

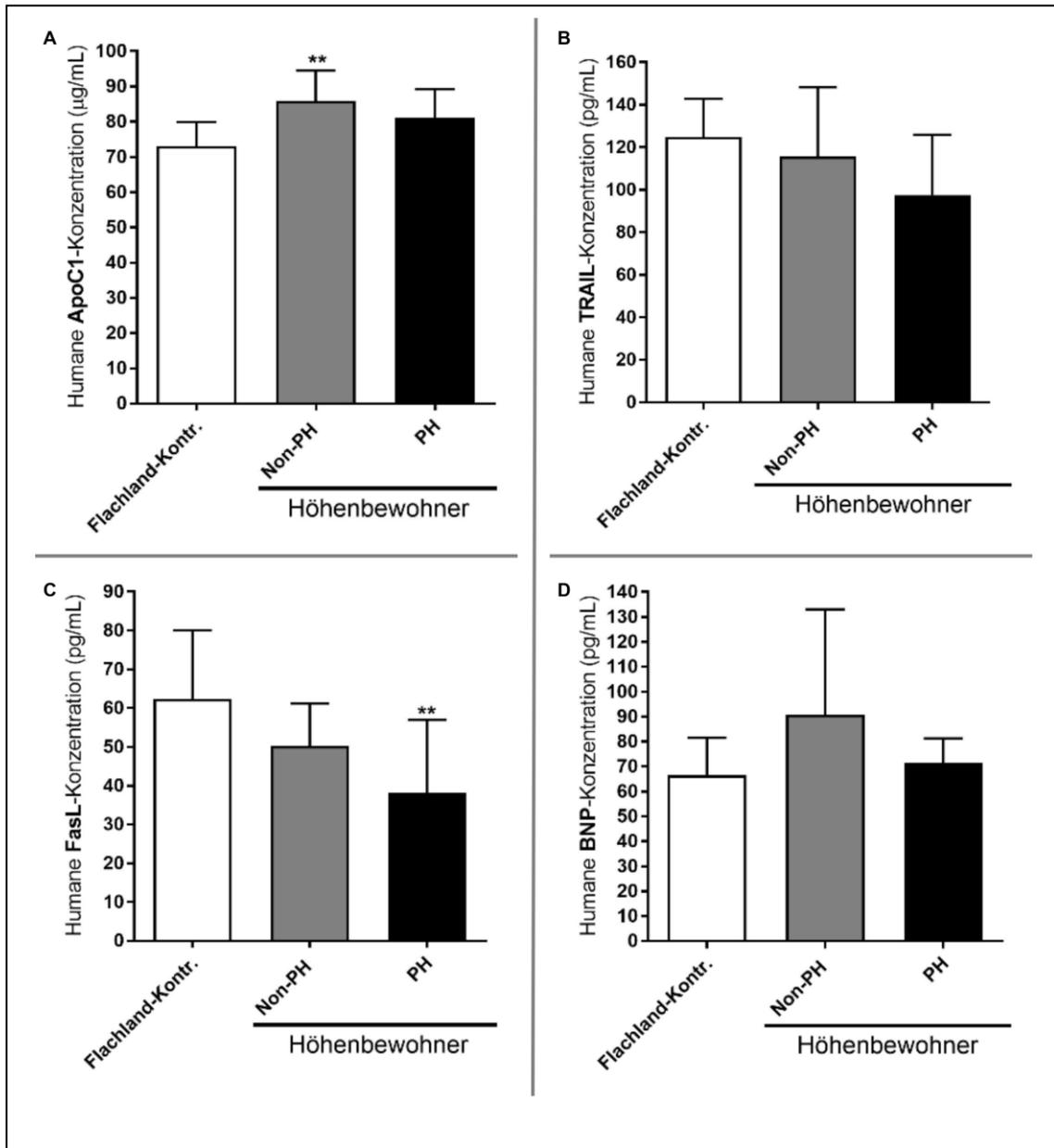
Erwachsene Freiwillige, die dauerhaft in den Flachlandregionen (Flachland-Kontr.) (n=10) und Hochlandregionen (HA) Kirgistans leben, wurden in die Studie aufgenommen. Individuen, die in den Höhenregionen Kirgistans lebten, wurden in zwei Gruppen geteilt: diejenigen ohne Pulmonale Hypertonie (HA-Non-PH) (n=10) und diejenigen mit Pulmonaler Hypertonie (HA-PH) (n=12). Verschiedene anthropometrische und echokardiographische Daten wurden erhoben und finden sich in dieser Tabelle wieder. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als arithmetisches Mittel ± SD (n=10-12). \*\*\*\*p≤0,0001 Flachland-Kontr. im Vergleich zu HA-PH. §§§§p≤0,0001 HA-Non-PH im Vergleich zu HA-PH. Der *one-way* ANOVA mit Tukey's *multiple comparisons* Test wurde zur statistischen Analyse herangezogen. m, männlich; w, weiblich; BMI, *body mass index* (in kg/m<sup>2</sup>); BSA, *body surface area* (in m<sup>2</sup>); TRG, *tricuspid regurgitant gradient* (in mmHg).

Die Zuteilung der in großer Höhe lebenden Probanden in die Gruppen mit (PH) und ohne (Non-PH) Pulmonale Hypertonie wurde anhand des TRG der echokardiographischen Untersuchung vorgenommen. So wurden Probanden mit einem TRG≥40 mmHg der Gruppe der Pulmonalen Hypertonie (PH) zugeordnet. Betrachtet man die anthropometrischen sowie echokardiographischen Daten der verschiedenen Versuchsgruppen (**Tabelle 3.2**), so stellen sich die erhobenen Messdaten zu BMI und Körperoberfläche als vergleichbar zwischen allen Versuchsgruppen dar. Allerdings lassen sich Unterschiede bezüglich des Alters sowie der Geschlechterverteilung erkennen. Dabei besteht die Gruppe der Flachland-

## Ergebnisse

Kontrolle ausschließlich aus jüngeren Männern, was eine mögliche Limitation der vorliegenden Studie darstellen könnte. Die erhobenen TRG-Werte waren in der Gruppe der Höhenbewohner mit Pulmonaler Hypertonie (HA-PH) sowohl gegenüber der Gruppe der Höhenbewohner ohne Anzeichen einer Pulmonalen Hypertonie (HA-Non-PH) als auch gegenüber der Flachlandkontrolle (Flachland-Kontr.) signifikant und deutlich erhöht. [139]

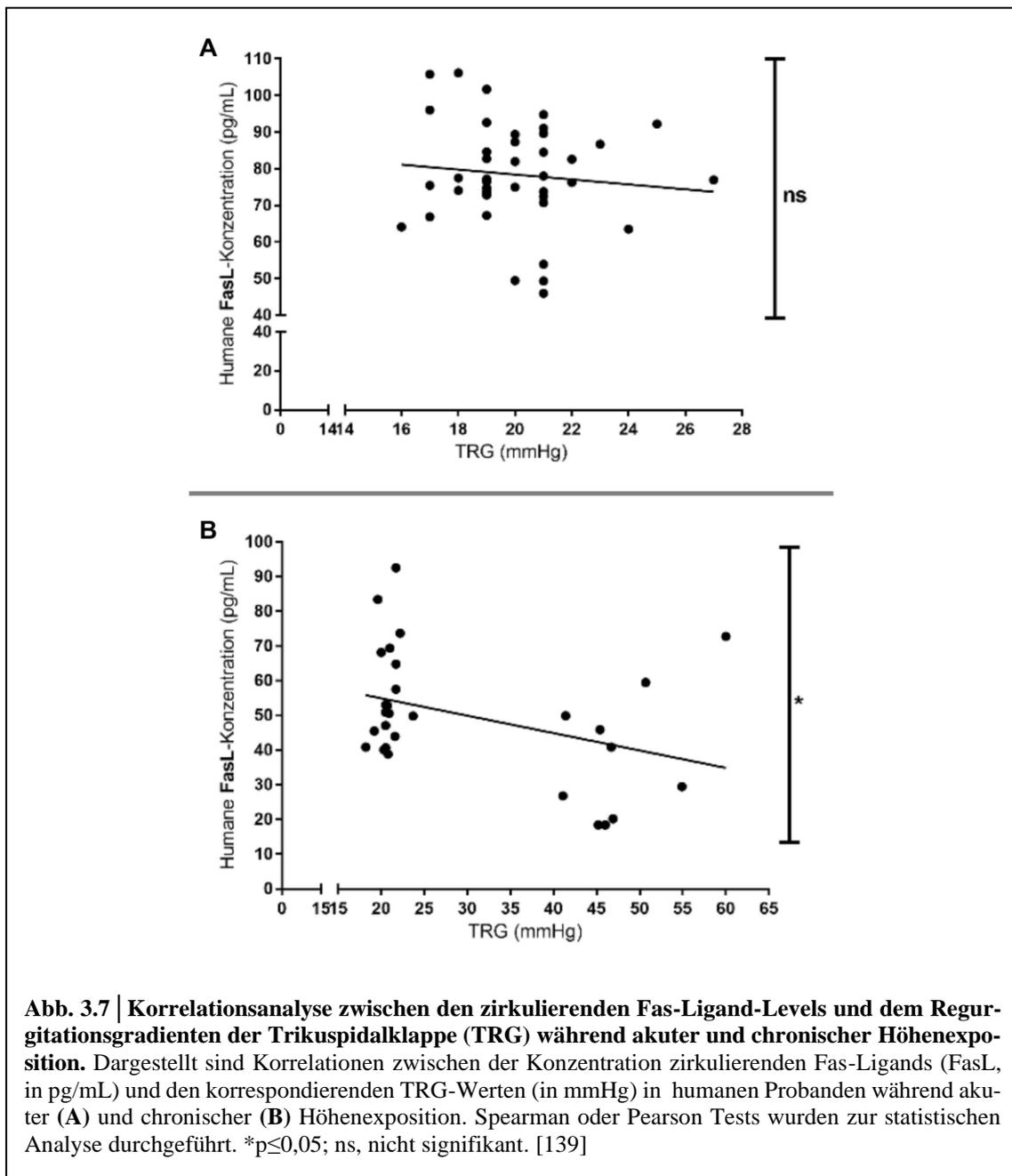
Bei Betrachtung der Plasmakonzentrationen der apoptotischen Marker sowie BNP ergaben sich diverse Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen der Studie. So waren die zirkulierenden ApoC1-Levels (in  $\mu\text{g/mL}$ ) innerhalb der Gruppen der Hochlandbewohner (PH, Non-PH) erhöht, wobei die höhere ApoC1-Konzentration bei Höhenbewohnern ohne Pulmonale Hypertonie (Non-PH) im Vergleich zur gewählten Flachlandkontrolle (Flachland-Kontr.) als signifikant anzusehen ist (**Abb. 3.6 A**). Obwohl keine statistisch signifikanten Unterschiede der TRAIL-Plasmakonzentrationen (in  $\text{pg/mL}$ ) festzustellen waren, zeichnete sich ein Trend im Sinne einer Reduktion der Plasmakonzentrationen, beginnend bei der Flachlandkontrolle (Flachland-Kontr.) über die Bewohner des Hochlands ohne Pulmonale Hypertonie (Non-PH) bis zu denjenigen, die eine Pulmonale Hypertonie entwickelt hatten (PH), ab (**Abb. 3.6 B**). Des Weiteren zeigte sich eine sichtbare Reduktion der zirkulierenden FasL-Konzentration (in  $\text{pg/mL}$ ) in beiden Gruppen der Höhenbewohner (PH, Non-PH) mit statistisch signifikanter Verringerung des FasL-Plasmalevels der Höhenbewohner mit Pulmonaler Hypertonie (PH) im Vergleich zur Flachlandkontrolle (Flachland-Kontr.) (**Abb. 3.6 C**). Betrachtet man die Plasmakonzentrationen von BNP (in  $\text{pg/mL}$ ), so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (**Abb. 3.6 D**). Überraschenderweise zeigte sich jedoch ein Trend zu erhöhten BNP-Konzentrationen in der Zirkulation der Höhenbewohner ohne Pulmonale Hypertonie (Non-PH) sowohl im Vergleich zu denen, die diese Krankheit entwickelt hatten (PH) als auch zur Flachlandkontrolle (Flachland-Kontr.) (**Abb. 3.6 D**). [139]



**Abb. 3.6 | Zirkulierende apoptotische Marker in humanen Probanden, die dauerhaft in großen Höhen leben.** Humane Probanden, die dauerhaft in den Höhenregionen Kirgistans leben (Höhenbewohner), wurden in zwei Gruppen geteilt: Individuen, die keine Pulmonale Hypertonie entwickelt hatten (Non-PH) ( $n=9-10$ ) und solche, bei denen diese pulmonalvaskuläre Erkrankung bestand (PH) ( $n=10$ ). Personen, die dauerhaft in den Flachlandregionen Kirgistans lebten, dienten als Kontrolle (Flachland-Kontr.) ( $n=9-10$ ). Echokardiographische Messungen sowie Blutentnahmen wurden bei allen freiwilligen Probanden durchgeführt. Das Blutplasma wurde separiert und es wurden ELISA-Messungen zur Detektion und Quantifikation der folgenden zirkulierenden Apoptosemarker durchgeführt: **(A)** Apolipoprotein C1 (ApoC1), **(B)** TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) und **(C)** Fas-Ligand (FasL). Zusätzlich wurde das zirkulierende Profil des B-typ natriuretischen Peptids (BNP) **(D)** durch ELISA-Messungen bestimmt. Alle Ergebnisse sind als Konzentration der oben genannten Marker (in  $\mu\text{g}$  oder  $\text{pg}$  pro  $\text{mL}$  Plasma) angegeben und als arithmetisches Mittel  $\pm$  SD ( $n=9-10$ ) dargestellt. \*\* $p \leq 0,01$  im Vergleich zur Flachland-Kontrolle. Zur statistischen Analyse wurden der *one-way* ANOVA mit Tukey's *multiple comparisons* Test herangezogen. [139]

### 3.4 Zirkulierende FasL-Konzentrationen sind in kirgisischen Populationen negativ mit TRG-Werten korreliert

Da Fas-Ligand sich im Laufe der vorherigen Untersuchungen als einer der Apoptosemarker mit dem prominentesten Effekt durch Hypoxie *in vitro* und die Umweltbedingungen in großen Höhen *in vivo* mit konstanter Entwicklung sowohl bei akuter als auch bei chronischer Exposition erwiesen hatte, wurde weiterhin untersucht, inwiefern ein direkter Zusammenhang zwischen der gemessenen FasL-Konzentration im Plasma und dem echokardiographisch ermittelten TRG der Probanden bestehen könnte [139].



**Abb. 3.7 | Korrelationsanalyse zwischen den zirkulierenden Fas-Ligand-Levels und dem Regurgitationsgradienten der Trikuspidalklappe (TRG) während akuter und chronischer Höhenexposition.** Dargestellt sind Korrelationen zwischen der Konzentration zirkulierenden Fas-Ligands (FasL, in pg/mL) und den korrespondierenden TRG-Werten (in mmHg) in humanen Probanden während akuter (A) und chronischer (B) Höhenexposition. Spearman oder Pearson Tests wurden zur statistischen Analyse durchgeführt. \* $p \leq 0,05$ ; ns, nicht signifikant. [139]

Hierzu wurden die gemessenen FasL-Konzentrationen im Plasma (in pg/mL) mit den korrespondierenden TRG-Werten sowohl während akuter (**Abb. 3.7 A**) als auch chronischer (**Abb. 3.7 B**) Höhenexposition kirgisischer Freiwilliger gegeneinander aufgetragen und auf ihre Korrelation hin analysiert. Im Falle der akuten Exposition gegenüber großen Höhen ergab sich, obwohl ein leichter Trend zu erkennen war, keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern (**Abb. 3.7 A**). Wohingegen während chronischer Höhenexposition eine signifikant negative Korrelation zwischen der zirkulierenden FasL-Konzentration und dem Regurgitationsgradienten der Trikuspidalklappe (TRG) bei dauerhaften Bewohnern des Flach- und Hochlands der untersuchten kirgisischen Populationen festgestellt werden konnte (**Abb. 3.7 B**). [139]

### **3.5 Fas-Ligand vermittelt pro-apoptotische und anti-proliferative Effekte in humanen PASMCs**

Zur Analyse der Auswirkungen Fas-Ligands auf die Gefäßarchitektur der pulmonalvasculären Strombahn fand weiterhin eine Untersuchung relevanter zellulärer Effekte Fas-Ligands wie Apoptose und Proliferation in humanen PASMCs statt [139].

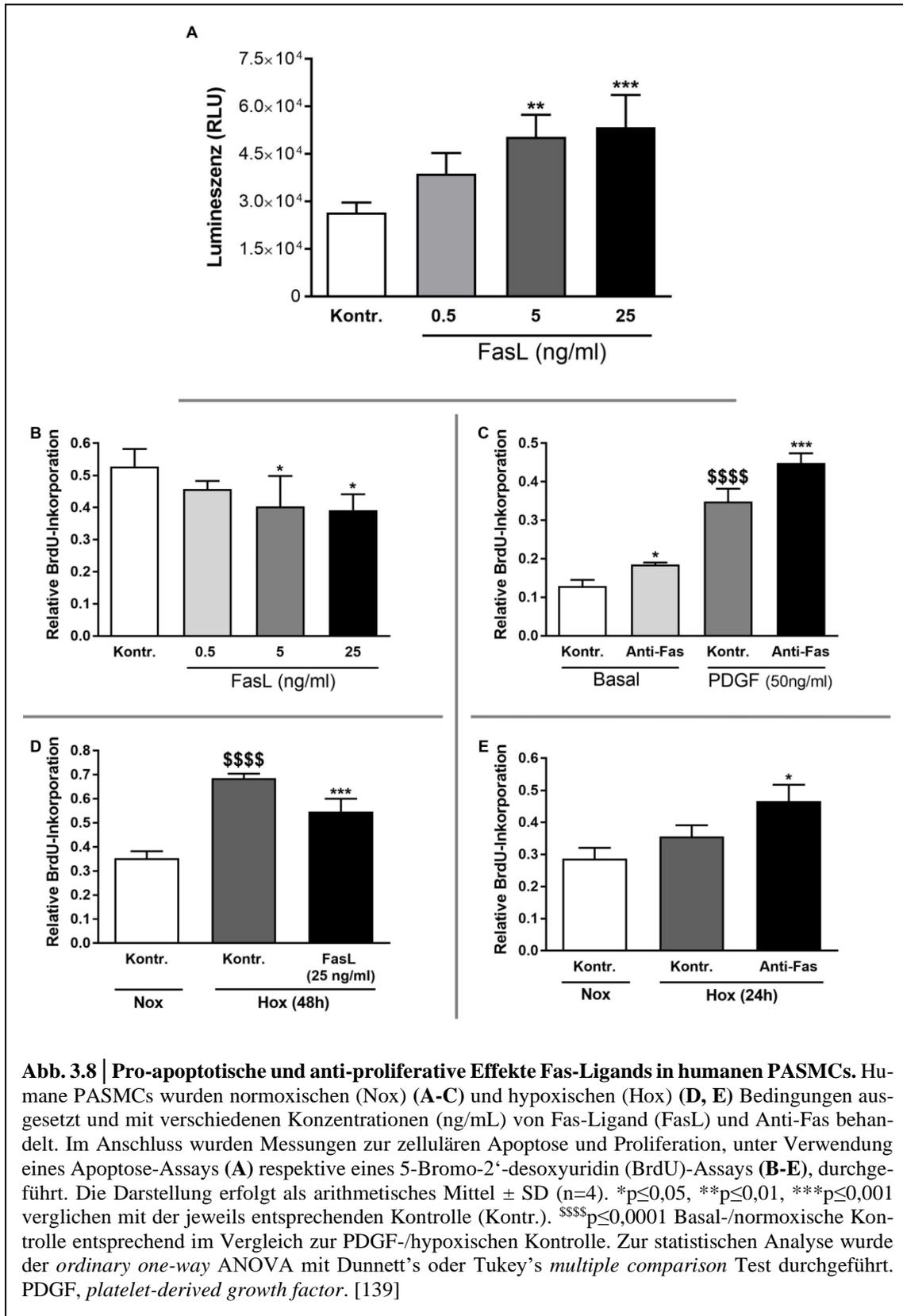
Hierzu wurden zunächst mit Hilfe eines lumineszenzbasierten Apoptoseassays zum Nachweis der Caspase 3/7-Aktivität die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen eines rekombinanten, löslichen, humanen Fas-Liganden auf humane PASMCs untersucht (**Abb. 3.8 A**). Hierbei wurden Kulturen humaner PASMCs FasL-Konzentrationen von 0,5, 5 und 25 ng/mL ausgesetzt, gefolgt von einer Lumineszenzmessung, die Rückschlüsse auf die Apoptoseaktivität der untersuchten Zellkulturen zulässt. Es zeigte sich, dass erhöhte FasL-Konzentrationen (5 und 25 ng/mL) signifikant die Apoptoserate humaner PASMCs steigerten (**Abb. 3.8 A**) [139].

Zur Quantifizierung des proliferativen Effekts von FasL auf humane PASMCs wurden verschiedene Experimente unter Verwendung eines kolorimetrischen Immunassays, basierend auf der relativen BrdU-Inkorporation während der DNA-Synthese, in direkter Abhängigkeit von der Anzahl proliferierender Zellen, durchgeführt (**Abb. 3.8 B-E**). Zunächst wurden erneut humane PASMCs verschiedenen FasL-Konzentrationen (0,5, 5, 25 ng/mL) ausgesetzt und anschließend durch photometrische Messung die relative BrdU-Inkorporation bestimmt (**Abb. 3.8 B**). Hierbei zeigte sich ein signifikant anti-proliferativer Effekt erhöhter FasL-Konzentrationen (5 und 25 ng/mL) im Vergleich zur FasL-freien Kontrolle in humanen PASMCs unter normoxischen Bedingungen (**Abb. 3.8 B**)

[139]. Des Weiteren wurden humane PASCs sowohl unter Basalbedingungen als auch unter Stimulation durch den mitose- und damit proliferationssteigernden Wachstumsfaktor PDGF (50 ng/mL) [253] mit einem den Fas-Rezeptor neutralisierenden Antikörper (Anti-Fas) versetzt und anschließend erneut die relative BrdU-Inkorporation bestimmt (**Abb. 3.8 C**). Anti-Fas steigerte dabei signifikant die zelluläre Proliferation sowohl unter Basalbedingungen als auch unter Stimulation durch PDGF verglichen mit den jeweils korrespondierenden Kontrollen (**Abb. 3.8 C**) [139]. Im Folgenden wurden die Effekte von FasL und Anti-Fas auf hPASCs unter hypoxischen Bedingungen (Hox) untersucht (**Abb. 3.8 D, E**). Dabei konnte gezeigt werden, dass FasL-Konzentrationen von 25 ng/mL verglichen mit der entsprechenden Kontrolle (Hox Kontr.) signifikant die Proliferation humaner PASCs unter 48h hypoxischer Inkubation (48h Hox) reduzierten (**Abb. 3.8 D**) [139]. Abschließend wurden hPASCs mit Anti-Fas versetzt und für 24h Hypoxie ausgesetzt, was in einer signifikanten Steigerung der Proliferation gegenüber der korrespondierenden Kontrolle (Hox Kontr.) resultierte (**Abb. 3.8 E**) [139].

FasL weist also klar pro-apoptotische und anti-proliferative Eigenschaften in hPASCs auf [139].

Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl Hypoxie (Hox Kontr.) als auch PDGF (PDGF Kontr.) einen pro-proliferativen Effekt auf humane PASCs verglichen mit den korrespondierenden Basal- (Basal Kontr.) bzw. normoxischen Kontrollen (Nox Kontr.) ausübten (**Abb. 3.8 C, D**).



## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Generelle Ergebnisse**

Nach Analyse der mRNA-Expressions-Profile verschiedener apoptotischer Marker in hypoxieexponierten, humanen, pulmonalarteriellen, glatten Muskelzellen (hPASMCs) sowie Quantifizierung der Plasmakonzentrationen apoptotischer Signale in akut sowie chronisch höhenexponierten Probanden der kirgisischen Population können die Ergebnisse der vorliegenden Studie wie folgt zusammengefasst werden [139]:

1. Es zeigte sich eine prominente Erhöhung der Genexpression verschiedener apoptotischer Akteure in humanen, pulmonalarteriellen, glatten Muskelzellen (hPASMCs), die hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren.
2. Unterschiedliche Variationen zirkulierender apoptotischer Signale konnten während akuter und chronischer Exposition von Menschen gegenüber großen Höhen festgestellt werden, wobei Fas-Ligand die einheitlichste Alteration innerhalb der verschiedenen Studien zeigte.
3. Die Plasmakonzentrationen von Fas-Ligand korrelierten negativ mit den gemessenen trikuspidalen Regurgitationsgradienten (TRG) der dauerhaft in großen Höhen bzw. in Flachlandregionen Kirgistans lebenden Populationen.
4. Fas-Ligand erwies pro-apoptotische und anti-proliferative Eigenschaften in kultivierten humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (hPASMCs).

### **4.2 Apoptotische Signale als Zielproteine von Interesse**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben stellen die Exposition gegenüber großen Höhen und die damit verbundene Hypoxie der Umgebungsluft entscheidende Trigger für die Entwicklung pulmonalvaskulärer Umbauten im Rahmen einer PH dar [91, 184, 331]. Dieses hypoxieinduzierte *Remodeling* wird auf zellulärer Ebene durch inflammatorische Prozesse, Synthese extrazellulärer Matrixproteine, Migration umliegender Zellen sowie einer Dysbalance zwischen Proliferation und Apoptose hervorgerufen [91, 280]. Abnorme Regulation der Apoptose und das Auftreten eines „Apoptose-resistenten“ Phänotyps vaskulärer Zellen stellen dabei essenzielle Kennzeichen der Pathogenese hypoxieinduzierter PH dar [40, 139, 156, 339, 343].

Diese weist, neben metabolischen Veränderungen, vor allem durch die gesteigerte

Proliferation sowie eine Reduktion der Apoptose entscheidende Parallelen zur Pathogenese maligner Tumoren auf und wird deshalb in den letzten Jahren häufig als „tumorähnliche“ Erkrankung beschrieben [37, 139, 171]. Durch Parallelen metabolischer Veränderungen auf mitochondrialer Ebene ergaben sich bereits neue Einsichten in die Pathogenese sowie mögliche Ansatzpunkte für die Therapie der Pulmonalarteriellen Hypertonie [37, 171, 296]. Jedoch bleiben bezüglich der Rolle der Apoptose in hypoxieinduzierter PH und PH im Allgemeinen trotz klarer Fortschritte viele Fragen ungelöst.

Ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Signalwegen konnte als entscheidender Einflussfaktor von Pathogenese, Progression und therapeutischem Ansprechen maligner Erkrankungen identifiziert werden [108]. So konnten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten apoptotischen Akteure FLIP und Survivin bereits in mehreren Tumorformen mit erhöhter Expression nachgewiesen werden [6, 61, 138, 303–305, 315] und vermittelten in malignen Zellen durch Inhibition verschiedener Signalkaskaden eine Resistenz gegenüber Apoptose [42, 179, 243]. Für ApoC1 konnte ebenfalls ein fördernder Effekt auf Zellproliferation und Migration bei gesteigerter Resistenz gegenüber Apoptose in mehreren malignen Erkrankungen, darunter Pankreas-, Prostata- und kolorektale Karzinome, festgestellt werden [229, 284, 291]. Dabei wurden innerhalb der verschiedenen Studien jedoch unterschiedliche Mechanismen der Vermittlung dieses Effekts angenommen. Weithin konnte in tierexperimentellen Studien ein anti-proliferativer, pro-apoptotischer und damit gegenteiliger Effekt von ApoC1 auf Tumoren der Brust festgestellt werden [286], sodass eine einfache Zuordnung von ApoC1 als Vermittler pro- oder anti-apoptotischer Eigenschaften nicht ohne Weiteres möglich ist.

Im Falle des apoptoseinduzierenden Faktors FasL konnten veränderte Serumlevel bereits in verschiedensten Krebsformen festgestellt werden [109], welche teilweise mit Prognose und Krankheitsstadium der Tumoren korrelierten [187, 209, 300]. Zudem wurde der therapeutische Nutzen durch diverse cytotoxische Therapien gezeigt, die die Sensibilität maligner Zellen gegenüber Fas-vermittelter Apoptose durch erhöhte Expression des Fas-Rezeptors steigerten [318]. TRAIL stellt ein weiteres Zytokin dar, das dafür bekannt ist, selektive Apoptose in Tumorzellen durch Bindung transmembranöser Todesrezeptoren zu induzieren [12, 41, 314]. Dabei wird TRAIL eine protektive Rolle in der Krebsentwicklung zugeschrieben [35], weswegen der TRAIL-Signalweg als Zielstruktur einiger anti-Krebstherapien anvisiert wurde [122].

Für einige dieser apoptotischen Marker konnte ebenfalls bereits eine Relevanz in der Pa-

thogenese verschiedener Formen der PH sowie mögliche therapeutische und diagnostische Ansatzpunkte gezeigt werden. So konnte beispielsweise durch gentechnische Suppression der Survivin-Funktion als anti-apoptotischem Akteur bereits eine Reduktion der PVR sowie der Hypertrophie der pulmonalarteriellen Media und des rechten Ventrikels in MCT-Ratten mit folglich gesteigertem Überleben gezeigt werden [179]. TRAIL konnte ebenfalls bereits als entscheidender Faktor in der Pathogenese der PAH identifiziert werden [52, 98]. Zudem konnten erhöhte Serumlevel in Patienten mit PAH nachgewiesen werden, die mit der Schwere ihrer Erkrankung korrelierten [159], wodurch TRAIL einen möglichen Biomarker zur Diagnose sowie Bestimmung der Prognose darstellen könnte. Weiterhin führte der Einsatz eines TRAIL-R3 neutralisierenden Antikörpers zur Reversion der PAH im Tiermodell [98] und eröffnete damit neue therapeutische Möglichkeiten. Das Potential apoptotischer Faktoren als Elemente der Pathogenese, mögliche Biomarker sowie Ansatzpunkte neuer Therapieformen in Krebserkrankungen und anderen Formen der PH eröffnet damit Perspektiven in Form eines möglichen Einflusses dieser in höhen- und hypoxieinduzierten Veränderungen der pulmonalen Strombahn. Die Untersuchung der mRNA-Expression dieser in hypoxieexponierten Zellen der humanen Gefäßwand sowie deren Plasmakonzentration in der Zirkulation akut und chronisch höhenexponierter Probanden war Gegenstand dieser Arbeit.

### **4.3 Strukturelle Veränderungen pulmonaler Gefäßwände unter Hypoxie**

Strukturelle Umbauten pulmonaler Gefäße durch Hypoxie führen zur Verdickung der Gefäßwände und konsekutiv durch Versteifung dieser und Obliteration des Gefäßlumens zur Erhöhung der PVR [91, 210]. Dabei sind alle Schichten der pulmonalen Gefäßwand – Intima, Media und Adventitia – durch diese betroffen [127], wobei der quantitativ bedeutendste Anteil dieser Größenzunahme durch Wachstum der Media hervorgerufen wird [113]. So besteht das Kennzeichen hypoxieinduzierter PH und pulmonalvaskulärer Umbauten dauerhafter Höhenbewohner vor allem in einer progressiven Muskularisierung pulmonaler Gefäße durch Proliferation und Reduktion der Apoptose glatter Muskelzellen sowie in der Ausbreitung dieser in vormals unmuskularisierte Arteriolen („de-novo“-Muskularisierung) [10, 103]. Dieses hypoxieinduzierte *Remodeling* konnte in unterschiedlicher Ausprägung bereits in verschiedensten Spezies festgestellt werden, die re-

gelhaft zu Forschungszwecken als Modell verschiedener Formen der humanen PH eingesetzt werden [279]. Die charakteristische Hypertrophie der Media pulmonaler Arterien sowie deren Neuauftreten in weiter distal gelegenen Gefäßen, die mikroskopisch unter Normoxie keine mediale Wandschicht erkennen ließen, konnte in der vorliegenden Arbeit durch histologische Lungenschnitte chronisch hypoxieexponierter Mäuse, als weit verbreitetes Modell der PH mit jedoch vergleichsweise eher schwach ausgeprägtem *Remodeling* [279], demonstriert werden. Dabei weist dieses Modell aufgrund der Hypoxie als auslösendem Stimulus eine wesentlich engere Beziehung zur 3. Gruppe der PH sowie den Bedingungen in großen Höhen auf als andere etablierte tierexperimentelle Modelle der PH, wie beispielsweise der MCT-induzierten PH [211], und stellt damit das geeignetste Modell höheninduzierter pulmonalvaskulärer Umbauten dar.

#### 4.4 Experimentelles Design der in vitro-Studien

Aufgrund der im Vergleich zu den anderen Schichten der Gefäßwand herausragenden Hypertrophie der Media im Rahmen des hypoxieinduzierten, pulmonalvaskulären *Remodelings*, die auf zellulärer Ebene auf Migration aber auch auf gesteigerte Proliferation und Reduktion der Apoptose glatter Muskelzellen zurückzuführen ist [210, 333], wurde in vitro die mRNA-Expression verschiedener apoptotischer Faktoren in humanen PSMCs untersucht, die über verschiedene Zeiträume hypoxischen Bedingungen (1% O<sub>2</sub>, über 24, 48 und 72 h) ausgesetzt worden waren.

Es bestehen jedoch komplexe Interaktionen der am Gefäßaufbau beteiligten Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten innerhalb dieser Umbauten [210]. So sezernieren vaskuläre Endothelzellen als Reaktion auf Hypoxie verschiedene Wachstumsfaktoren glatter Muskelzellen, wie beispielsweise PDGF, FGF oder *insulin-like growth factor 1* (IGF1) [140, 210], und auch umliegende Fibroblasten regulieren die Proliferation benachbarter Zellen durch parakrine Sekretion mitogener und inflammatorischer Zytokine [51]. Zwar sind einige dieser Wachstumsfaktoren wie FGF oder EGF ebenfalls im verwendeten Wachstumsmedium enthalten, doch können die komplexen Interaktionen durch in vitro Kultivierung einer Einzelnen dieser Zellreihen nicht abgebildet werden und könnten dadurch eine mögliche Limitation der Untersuchung rein kultivierter PSMCs darstellen.

Über den Einfluss akuter Hypoxie auf in vitro kultivierte PSMCs bestehen Widersprüche innerhalb der wissenschaftlichen Literatur [210]. So konnte in mehreren Studien

nachgewiesen werden, dass akute Hypoxie allein einen effektiven Stimulus für die Proliferation humaner PASMCs in vitro darstellt [7, 30, 47, 73, 76, 162, 225, 282, 292], wohingegen einige andere keinen Einfluss der Hypoxie auf die Proliferation [55, 146] oder sogar eine Reduktion dieser in PASMCs [62, 281] zeigen konnten. Diese Widersprüche könnten zum Teil auf deutliche Unterschiede des experimentellen Aufbaus der verschiedenen Studien zurückzuführen sein [210]. So bestanden beträchtliche Differenzen in der Dichte der eingesäten PASMCs, der Schwere der Hypoxie sowie der Konzentration des dem Medium zugefügten fetalen Kälberserums zwischen den unterschiedlichen Untersuchungen [210]. Dabei wurden die PASMCs in allen Studien, die einen Rückgang der Proliferation beschrieben, in sehr hohen Dichten  $\geq 10.000$  Zellen/cm<sup>2</sup> gesät [55, 62, 281], wodurch es zur Kontaktinhibition zwischen den Zellen und damit zur Inhibition der Proliferation kommen könnte [210]. Dieser Zusammenhang zwischen hypoxischer Proliferation und Dichte der Zelleinsaat konnte durch *Kuehl et al.* bestätigt werden [145]. Während in den Untersuchungen, die eine Proliferation der PASMCs unter Hypoxie feststellen konnten, häufig moderate hypoxische Verhältnisse (1-5% O<sub>2</sub>) herrschten und zur Stimulation der Proliferation meist eine Konzentration des beigefügten Serums >2% gewählt wurde, erfolgte der Nachweis reduzierter Proliferation der PASMCs häufig unter Anoxie und Konzentrationen des fetalen Kälberserums <2% [210]. Um andere Effekte außer der vorliegenden Hypoxie auf die Proliferationsrate kultivierter, humaner PASMCs auszuschließen, wurde daher, um Kontaktinhibition vorzubeugen, eine Dichte von ca. 4.000 Zellen/cm<sup>2</sup> zur Einsaat gewählt und dem Wachstumsmedium ein Anteil von 5% fetalem Kälberserum zugesetzt. Weiterhin wurden die kultivierten Zellen aufgrund der größeren Nähe zu den physiologischen Verhältnissen zwar einer schweren Hypoxie von 1% O<sub>2</sub> jedoch keinen anoxischen Verhältnissen ausgesetzt. Letztlich ließ sich ein positiver Effekt der Hypoxie auf die Proliferation, der unter diesen Umständen kultivierten hPASMCs durch gesteigerte BrdU-Inkorporation hypoxisch inkubierter Zellen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle in der vorliegenden Arbeit bestätigen.

### **4.5 mRNA-Expressionsprofil verschiedener apoptotischer Marker**

Zelluläre Apoptose stellt einen wichtigen und komplexen Vorgang innerhalb physiologischer und pathologischer Prozesse des Körpers dar [139, 250].

Dabei nehmen Caspasen unter anderem eine entscheidende Rolle in der Vermittlung als auch der Ausführung apoptotischer Prozesse ein [108, 139]. Durch die Ergebnisse dieser

Arbeit konnte eine Steigerung der mRNA-Expression von Casp 1 und Casp 3 nach hypoxischer Inkubation humaner PSMCs gezeigt werden [139].

Im Falle der Casp 3 konnte eine verhältnismäßig leichte Erhöhung der mRNA-Expression gegenüber der normoxischen Kontrolle nachgewiesen werden, die sich über die verschiedenen Zeitpunkte der Inkubation als annähernd konstant erwies. Obwohl PH im Allgemeinen durch „apoptotische Resistenz“ und gesteigerte Proliferation verschiedener Zellen der Gefäßwand charakterisiert wird [40, 156, 339, 343], konnte bereits ebenfalls im Lungengewebe von Ratten des MCT-Modells der PH eine Erhöhung der mRNA-Expression von Casp 3 festgestellt werden [110]. Jedoch muss bei der Interpretation dieser Ergebnisse bedacht werden, dass zwar eine Erhöhung der mRNA-Expression besteht, die Casp 3 auf Proteinebene ihre pro-apoptotische Funktion, in Form einer Spaltung wichtiger Strukturproteine, der Hemmung von Apoptoseinhibitoren sowie der Fragmentierung der DNA durch Aktivierung der CAD [66, 87, 203, 248], jedoch erst durch proteolytische Spaltung ihrer Proform in die aktive Form der Casp 3, im Rahmen der apoptotischen Signalkaskade, erhält [178]. Es bedürfte also weiterer Untersuchungen aktivierter Caspase 3-Levels auf Proteinebene, um diesen Effekt zu bestätigen. Zudem wird die Interpretation der apoptotischen Funktion während hypoxischer Exposition durch bestehende Hinweise darauf, dass Casp 3 durch Spaltung bestimmter Substrate sogar anti-apoptotische Eigenschaften vermitteln könnte, weiter erschwert [139, 148, 340]. In diesem Zusammenhang könnte RasGap als Sensor der Caspaseaktivität eine Rolle spielen, da es bei geringer Caspaseaktivität als Substrat dieser gespalten wird und durch sein N-terminales Fragment anti-apoptotische Funktionen vermittelt, wohingegen es bei stärkerer Aktivität der Caspasen durch weitere Spaltung dieses Fragmentes zur Potenzierung des apoptotischen Effekts kommt [340].

Bei der im Vergleich stärker ausfallenden Erhöhung der mRNA-Expression der Casp 1 konnte eine weitere Steigerung dieser nach 72 h hypoxischer Inkubation nachgewiesen werden. Obwohl die klassischerweise zu den pro-inflammatorischen Caspasen gezählte Casp 1 einigen Studien zufolge ebenfalls zur Aktivierung von BID und damit zum Anstoß des intrinsischen Signalwegs der Apoptose [94, 346] fähig ist, überwiegt wohl durch gesteigerte Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-18 ein pro-inflammatorischer, pro-proliferativer Effekt innerhalb der hypoxischen Exposition glatter Muskelzellen. So konnte in einer erst kürzlich erschienen Studie zu hypoxisch induzierter PH an Mäusen mit Caspase-1-*knock-out* gezeigt werden, dass diese vermutlich über den Casp1/IL-18/IL-6/STAT3-Signalweg zur Proliferation glatter Muskelzellen führt [302]. Weiterhin konnte im Tiermodell gezeigt

## Diskussion

werden, dass eine medikamentöse Inhibition der Caspase 1 mit einem milderen Fortschreiten der PH durch Reduktion des vaskulären Remodelings, rechtsventrikulärer Hypertrophie und rechtsventrikulären systolischen Druckniveaus einhergeht [350], so dass sich die gewonnenen Resultate einer Erhöhung der Casp 1-mRNA-Expression unter Hypoxie in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen befinden und eine mögliche Rolle von Casp 1 in der Entwicklung höheninduzierter pulmonalvaskulärer Veränderungen suggerieren.

Survivin und FLIP werden in der wissenschaftlichen Literatur im Allgemeinen als anti-apoptotische Regulatoren betrachtet [42, 108, 139, 179, 243]. Die Ergebnisse dieser Arbeit wiesen dabei auf eine Steigerung der m-RNA-Expression sowohl von Survivin als auch von FLIP in hypoxieexponierten PSMCs im Vergleich zur normoxischen Kontrolle hin.

Die Rolle von Survivin, das in der vorliegenden Studie eine prominente Steigerung der mRNA-Expression aufwies, wurde in den letzten Jahren vermehrt in PH untersucht [139]. Hierbei konnte eine entscheidende Rolle in der Vermittlung pro-proliferativer und anti-apoptotischer Effekte auf die pulmonalarterielle Media festgestellt sowie mögliche Therapieoptionen durch Inhibition des in gesunden Zellen kaum exprimierten Survivins *in vitro* sowie in MCT-Ratten demonstriert werden [69, 179, 348, 349]. Folglich fügen sich die hier erhobenen Ergebnisse einer Steigerung der Genexpression Survivins in PSMCs unter hypoxischen Bedingungen in dieses Bild ein.

Die im Vergleich zwar nicht so prominente, jedoch über alle Zeitpunkte der hypoxischen Inkubation konstante Erhöhung der mRNA-Expression von FLIP in hPSMCs, dessen Expression bereits ebenfalls in mehreren Tumorformen als erhöht nachgewiesen wurde [61, 138, 303–305, 315], könnte durch Inhibition der rezeptorvermittelten Signalkaskade der Apoptose [243] sowie seine bereits in der Tumorgenese beobachteten pro-proliferativen Eigenschaften [16, 182, 242, 243] ebenfalls zur Proliferation der Media im Rahmen hypoxisch induzierter PH beitragen.

Mit Hinblick auf ApoC1, dessen mRNA-Expression in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als erhöht unter Hypoxie nachgewiesen werden konnte, ist die Zuordnung apoptotischer oder anti-apoptotischer Eigenschaften innerhalb der hypoxischen Exposition humaner PSMCs nicht einfach zutreffen. Zwar konnten in mehreren Tumorformen positive Effekte von ApoC1 auf die Zellproliferation bei gesteigerter Resistenz gegenüber Apoptose festgestellt werden [229, 284, 291], jedoch wurden dabei unterschiedliche Mechanismen der Vermittlung dieses Effekts angenommen. Zudem konnten bereits exakt gegenteilige

Effekte in Form eines Rückgangs der Tumormasse durch Inhibition der Proliferation und gesteigerte Apoptose in tierexperimentellen Studien zu Brustkrebs gezeigt werden [286]. Es bedürfte also weiterer Untersuchungen eines möglichen apoptotischen oder proliferativen Effekts auf hPASCs unter Hypoxie, sollte sich ApoC1 als möglicher Faktor des höhen- oder hypoxieinduzierten, pulmonalvaskulären *Remodelings* erweisen.

In den Fällen von TRAIL und FasL konnte eine deutliche Erhöhung der m-RNA-Expression beider Zielproteine während hypoxischer Exposition humaner PASCs im Vergleich zu deren normoxischen Kontrollen festgestellt werden. Beide Marker konnten durch die wissenschaftliche Literatur in Verbindung mit PH gebracht werden [1, 35, 98, 139].

FasL ist in der Lage durch Bindung an seinen zellulären Rezeptor Fas und die damit verbundene Induktion des extrinsischen Signalwegs der Apoptose pro-apoptische Eigenschaften zu vermitteln [108]. In diesem Zusammenhang konnte bereits eine gesteigerte Proteinexpression von FasL in PASCs isoliert aus an PAH erkrankten Patienten *in vitro* gezeigt werden, nachdem diese mit PGI<sub>2</sub> behandelt wurden [1]. Die Behandlung der Zellen führte zu signifikant gesteigerter Apoptose der PAH-PASCs auch im Vergleich zu non-PAH-PASCs [1]. Interessanterweise führte PGI<sub>2</sub> auch nicht zur Erhöhung der FasL-Proteinexpression in Non-PAH-PASCs [1], sodass hier ein für die pathologisch veränderten PASCs spezifischer Signalweg zu vermuten ist. Weiterhin korrelierte die gesteigerte FasL-Serumkonzentration von mit PGI<sub>2</sub> behandelten PAH-Patienten mit der eingesetzten Dosis [1]. In der Studie wurde gefolgert, dass PGI<sub>2</sub> in hohen Konzentrationen zur Apoptoseinduktion in PAH-PASCs via IP<sub>3</sub>-Rezeptor und Steigerung der FasL-Expression führt [1]. In der hier vorgelegten Untersuchung konnte ebenfalls eine Steigerung der mRNA-Expression Fas-Ligands in PASCs festgestellt werden, die hypoxischer Inkubation ausgesetzt waren, sodass ein fraglich gesteigerter apoptotischer Einfluss Fas-Ligands in rein kultivierten PASCs unter Hypoxie bestehen könnte.

Interessanterweise wird TRAIL, das für gewöhnlich dafür bekannt ist, selektive Apoptose in Tumorzellen durch Bindung einer seiner Todesrezeptoren (DR4, DR5) auszulösen [12, 41, 314], aufgrund erhöhter mRNA-Levels in PASCs von an PAH erkrankten Patienten sowie erhöhten Serumlevels innerhalb dieses Patientenkollektivs [159] ebenfalls, jedoch als pro-proliferativer Faktor glatter Muskelzellen, mit der Pathogenese der PAH in Verbindung gebracht [52, 98, 129, 264, 272]. Dabei konnte TRAIL als erforderlicher Faktor für die Entwicklung der PAH in mehreren Modellen dieser gezeigt werden und bewies

zudem seine Bedeutung durch Beobachtung der Rückbildung einer experimentell ausgebildeten PAH durch anti-TRAIL-Antikörper [98]. Dieser Effekt von TRAIL auf PASCs soll dabei unter anderem durch einen seiner „Köder“-Rezeptoren DcR1 sowie in Abhängigkeit von ERK 1/2 und NFκB ausgelöst werden [98, 129, 264, 272]. Die beobachtete Erhöhung der TRAIL-mRNA-Expression unter Hypoxie steht also in Übereinstimmung mit der in PAH gezeigten pro-proliferativen Funktion von TRAIL.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine komplexe Komposition verschiedener apoptotischer Akteure in Zellen der pulmonalen Gefäßwand unter Hypoxie und in der Tat eine Dysregulation des apoptotischen Prozesses besteht [139]. Die Interpretation dessen geht jedoch über eine vereinfachte Erklärung basierend nur auf gesteigerten oder reduzierten Expressionsmustern sowie historisch bekannten pro- oder anti-apoptotischen Eigenschaften der einzelnen apoptotischen Akteure hinaus [139].

### **4.6 Experimentelles Design der Humanstudien**

Innerhalb der Krebsforschung konnte festgestellt werden, dass eine gestörte Regulation der Apoptose zur Freisetzung apoptotischer Produkte in die humane Blutzirkulation führt, die als potentielle Biomarker der Erkrankung genutzt werden könnten [109, 139]. Bisher bestanden jedoch noch keine Untersuchungen zum Expressionsprofil apoptotischer Marker in der Zirkulation akut oder chronisch höhenexponierter Menschen. [139]

Daher wurden in der vorliegenden Studie die Plasmakonzentrationen von ApoC1, TRAIL und FasL einer Stichprobe kirgisischer Flachlandbewohner untersucht, die für eine kurze Zeit den Umweltbedingungen großer Höhen ausgesetzt wurden. Gleichzeitig wurden die Profile derselben Marker im Plasma permanenter Bewohner des kirgisischen Hochlands analysiert, die eine höheninduzierte PH entwickelt hatten oder frei von dieser pulmonal-vaskulären Erkrankung geblieben waren. Als Vergleichsgruppe diente zusätzlich eine Gruppe permanenter Bewohner der Flachlandregionen Kirgistans. Zusätzlich wurden die Plasmakonzentrationen von BNP, einem kardialen Biomarker, der regelhaft im Feld der PH eingesetzt wird [8, 181], bestimmt. [139]

Zur Untersuchung des Effekts akuter und chronischer Exposition gegenüber großen Höhen wurde eine deutliche Höhenexposition von  $\geq 3.000$  Hm in beiden Studien gewählt. Negative Effekte durch die Umweltbedingungen großer Höhen einschließlich akuter und chronischer Formen der Höhenkrankheit sowie die HAPH können bereits ab einer Höhe von ca. 2.500 Hm auftreten [91]. Zur Kontrolle genetischer Einflüsse in die Adaptation

und Akklimation an große Höhen [91, 92, 219, 336] wurde sichergestellt, dass alle Teilnehmer der Studie ethnische Kirgisen waren. Weiterhin wurde die körperliche Belastung der Probanden aufgrund möglicher Einflüsse in die Akklimation und das Auftreten akuter Höhenkrankheiten [333, 335] innerhalb der Studie zu akuter Höhenexposition während der ersten Tage der Exposition limitiert und stufenweise an einen gewöhnlichen Tagesablauf ohne besondere Belastung angenähert.

Zur Einschätzung des PAP während akuter sowie dauerhafter Exposition gegenüber großen Höhen wurden echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Zwar stellt die Rechtsherz-Katheterisierung den Goldstandard in der Messung des PAP dar, doch ist diese mit erheblicher Invasivität verbunden und weist dadurch deutliche Risiken für die untersuchten Probanden auf [104]. Weiterhin wäre diese Untersuchung aufgrund des logistischen Aufwands sowie der örtlichen Begebenheiten der Höhenuntersuchungen ohne die Möglichkeit einer zeitnahen und umfänglichen Notfallversorgung im Falle periinterventioneller Komplikationen kaum durchführbar gewesen. Aus diesem Grund wurde auf die non-invasive, echokardiographische Bestimmung des TRG als Surrogatparameter des sPAP zurückgegriffen, was eine etablierte *Screening*-Methode in der Diagnostik der PH darstellt [81, 337, 342]. Diese stellte ebenfalls eine Grundlage der Zuordnung kirgisischer Höhenbewohner in die Gruppe der an PH erkrankten Probanden dar. So wurden dieser Gruppe Probanden mit einem  $\text{TRG} \geq 40$  mmHg zugeordnet, wodurch eine hohe Wahrscheinlichkeit des Bestehens einer PH hervorgeht [81, 193, 283]. Probanden der Non-PH-Gruppe kirgisischer Höhenbewohner wiesen alle einen  $\text{TRG} \leq 23$  mmHg auf.

Weiterhin wurden anthropometrische Daten einschließlich Alter, Geschlecht, BMI und Körperoberfläche zu allen Studienteilnehmern erhoben. In der Gruppe der chronischen Höhenexposition stellten sich die Messdaten zu BMI und Körperoberfläche als vergleichbar zwischen allen Gruppen dar, jedoch ließ sich erkennen, dass die Gruppe der Flachlandkontrolle im Durchschnitt jünger war und eine andere Geschlechterverteilung aufwies, was eine mögliche Limitation der Studie darstellen könnte und ggf. in der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss [139]. In der Gruppe der akuten Höhenexposition stellten sich alle erhobenen anthropometrischen Daten als vergleichbar unter den Teilnehmern dar.

#### **4.7 Plasmakonzentration zirkulierender Marker in akut und chronisch höhenexponierten Probanden**

Verschiedene Alterationen der Plasmakonzentration kardialer und apoptotischer Signale konnten während akuter und chronischer Höhenexposition kirgisischer Probanden festgestellt werden.

Betrachtet man den Verlauf der Plasmakonzentration des kardialen Biomarkers BNP während akuter Exposition gegenüber großen Höhen, so zeigte dieser einen initialen Trend zur Steigerung mit zunehmender Zeit der Höhenexposition im Vergleich zum Ausgangsniveau unter Flachlandbedingungen [139]. Nach Tag 7 konnte jedoch eine Tendenz zum Rückgang der erhöhten BNP-Konzentrationen mit sichtbarer Reduktion dieser nach Rückkehr ins Flachland festgestellt werden [139]. Mit Hinblick auf den gleichzeitig erhobenen Verlauf der TRG-Werte, die zu Beginn der Höhenexposition zunächst stark anstiegen und mit fortschreitender Dauer dieser sich erneut dem Niveau der Ausgangsmessung annäherten, könnte es sich dabei um eine leicht verzögerte Reaktion des BNP-Spiegels auf gesteigerte rechtskardiale Nachlast durch einen Anstieg des PAP handeln. Diese Vermutung wird gestützt durch die bekannte Synthetisierung und Freisetzung von BNP in Kardiomyozyten als Reaktion auf ventrikulären Stress im Sinne erhöhter Wandspannung sowie Druck- und Volumenbelastung, wobei die durch BNP initiierte gesteigerte Diurese, Natriurese sowie arterielle und venöse Vasodilatation des systemischen Kreislaufs in einer Reduktion des intravasalen Volumens und der ventrikulären Vor- und Nachlast resultiert [63, 245]. Ebenfalls findet BNP in der Therapiekontrolle, Risikobewertung und Prognostik manifester PH Anwendung [81]. Obwohl BNP keinen spezifischen Biomarker für PH darstellt, korreliert es gut mit der Belastungskapazität nach NYHA und lässt Rückschlüsse auf die Mortalität zu [70, 78, 153, 154, 199, 319]. Jedoch ergab sich keine klare Veränderung der zirkulierenden Profile dieses kardialen Biomarkers in dauerhaften Höhenbewohnern verglichen mit der Flachlandkontrolle, mit Ausnahme einer nicht signifikanten Verstärkung in Höhenbewohnern ohne PH [139]. Allerdings tendieren BNP-Level zu einer hohen Variabilität und sollten daher im klinischen Kontext beurteilt werden [81]. Zudem stellen die meisten der erhobenen BNP-Werte sowohl im Kontext der PH als auch einer möglichen Herzinsuffizienz Werte kaum oberhalb üblicher Grenzwerte der Normvarianz dar oder finden sich im geringen bis mittleren Risikobereich [80, 81, 174].

Die zirkulierenden ApoC1-Konzentrationen akut höhenexponierter Probanden stellten

sich als überwiegend vergleichbar innerhalb der verschiedenen Zeitpunkte der Exposition dar, während sich unter dauerhaften Höhenbewohnern im Vergleich zur Flachlandkontrolle erhöhte ApoC1-Levels in der Zirkulation abzeichneten [139]. Dennoch legen die erhobenen Daten weder während akuter noch chronischer Höhenexposition eine wesentliche Alteration der ApoC1-Plasmakonzentration überzeugend nahe [139].

Interessanterweise erfolgten Veränderungen der TRAIL-Plasmakonzentrationen während akuter und chronischer Höhenexposition der Probanden in entgegengesetzter Richtung [139]. Auf der einen Seite stiegen die zirkulierenden Plasmakonzentrationen von TRAIL bei Bewohnern des Flachlands im Laufe akuter Höhenexposition mit der Anzahl der dort verbrachten Tage deutlich an und fielen nach Rückkehr in Flachlandregionen durch signifikante Reduktion erneut auf ein etwas höheres Niveau als das vor Beginn der Exposition ab [139]. Auf der anderen Seite zeichnete sich jedoch ein deutlicher, wenn auch nicht signifikanter Trend zur Reduktion der TRAIL-Plasmakonzentrationen in Bewohnern des kirgisischen Hochlands, verglichen mit der Flachlandkontrolle, ab, der besonders bei denen auffiel, die eine höheninduzierte PH entwickelt hatten [139]. Weiterhin finden sich innerhalb der wissenschaftlichen Literatur Studien, die erhöhte Serumlevel von TRAIL in Patienten eines weiten Spektrums verschiedener Formen der PH nachweisen konnten [139, 159]. Darunter fanden sich Patienten mit verschiedenen Formen der PAH, CTEPH sowie PH aufgrund von Linksherzkrankungen. Jedoch wurden in diese Untersuchungen keine Patienten mit HAPH oder anderen Vertretern der hypoxieinduzierten 3. Gruppe der PH (vgl. **Tab. 1.2**) mit eingeschlossen [159]. Allerdings konnten innerhalb derselben Studie erhöhte Serum-TRAIL-Konzentrationen in Mäusen des hypoxieinduzierten Modells der PH, verglichen zu deren normoxischen Kontrollen, festgestellt werden [159]. TRAIL konnte als erforderlicher Faktor der Pathogenese in verschiedenen Nagetiermodellen der PH identifiziert und mit erhöhter Expression in PSMCs, isoliert aus an PAH erkrankten Patienten [98], sowie durch die hier vorliegende Studie in rein kultivierten, hypoxieexponierten PSMCs in vitro nachgewiesen werden. Dabei soll TRAIL in vitro einen mitogenen und pro-migratorischen Stimulus für PSMCs durch Vermittlung des DcR1 sowie der ERK1/2 darstellen [98]. Allerdings wäre TRAIL durch Bindung verschiedener seiner zellulären und löslichen Rezeptoren prinzipiell dazu in der Lage sowohl pro-apoptische als auch pro-proliferative zelluläre Effekte zu vermitteln [35, 147]. Aufgrund all dieser Diskrepanzen sind weitere Studien dringend notwendig, um die exakte Rolle dieses apoptotischen Signals sowohl während akuter als auch chronischer Höhenexposition sowie im Rahmen der Entwicklung einer HAPH zu identifizieren [139].

Letztlich konnten deutlich klarere Ergebnisse mit Hinblick auf die untersuchten Plasmakonzentrationen zirkulierenden Fas-Ligands sowohl während akuter als auch chronischer Exposition gegenüber großen Höhen erhoben werden [139]. So zeigte sich in Flachlandbewohnern, die akut den Umweltbedingungen großer Höhen ausgesetzt worden waren, eine deutliche und signifikante Reduktion der FasL-Plasmakonzentrationen [139]. Diese Reduktion verstärkte sich im Laufe der Höhenexposition und blieb trotz der kurzen Zeitspanne dieser selbst nach kurzfristiger Re-Exposition gegenüber Flachlandbedingungen konstant auf gesenktem Niveau. Zudem zeigten sich die Plasmakonzentrationen Fas-Ligands verglichen mit denen der Flachlandkontrolle als signifikant erniedrigt in Bewohnern der Höhenregionen, die eine PH entwickelt hatten [139]. Interessanterweise konnten im Plasma nicht an PH erkrankter Höhenbewohner ebenfalls verminderte FasL-Konzentrationen, verglichen mit Bewohnern des Flachlands, festgestellt werden, auch wenn diese sich nicht als statistisch signifikant erwiesen [139]. Zu guter Letzt ergab sich weiterhin eine negative Korrelation zwischen den zirkulierenden Konzentrationen Fas-Ligands und der Höhe des TRG in der Untersuchung zu chronischer Höhenexposition, wodurch potentielle Eigenschaften dieses apoptotischen Markers als Biomarker innerhalb der chronischen Effekte großer Höhen sowie der höheninduzierten PH angezeigt werden [139]. Die Serumkonzentrationen Fas-Ligands, der als Induktor des extrinsischen Signalwegs der Apoptose bekannt ist [5, 11, 198, 222], konnten in Übereinstimmung mit den hier erhobenen Ergebnissen durch die wissenschaftliche Literatur, wie oben bereits beschrieben, als relevant im Feld pulmonalvaskulärer Erkrankungen und speziell der PAH identifiziert werden [1, 139, 246]. Dabei konnte ein Anstieg der FasL-Expression in aus PAH-Patienten isolierten PSMCs nachgewiesen werden, nachdem diese in vitro mit PGI<sub>2</sub> behandelt worden waren [1, 139]. Die Behandlung mit PGI<sub>2</sub> war jedoch neben der Steigerung der zellulären FasL-Expression ebenfalls mit erhöhter Induktion der Apoptose innerhalb der PSMCs assoziiert [1, 139]. Diesem Gedanken folgend wurde in der vorliegenden Arbeit schließlich ein direkter Einfluss Fas-Ligands auf die Proliferation und apoptotische Aktivität kultivierter PSMCs untersucht [139].

### **4.8 Apoptotische und proliferative Effekte Fas-Ligands auf hPSMCs**

Durch Kultivierung humaner PSMCs in Medien mit verschiedenen Konzentrationen eines rekombinanten, löslichen FasL und anschließender Bestimmung der apoptotischen Aktivität mittels eines lumineszenzbasierten Apoptoseassays konnte in der vorliegenden

Arbeit nachgewiesen werden, dass FasL zur Steigerung apoptotischer Prozesse innerhalb hPASCs führt [139]. Damit in Einklang stehend konnten pro-apoptotische Effekte von FasL auf hPASCs ebenfalls in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben werden [139, 316, 345]. Weiterhin wurden die Effekte Fas-Ligands auf die Proliferation humaner PASCs in der vorliegenden Arbeit sowohl durch erneute Zugabe des rekombinanten, löslichen FasL als auch durch Zusatz eines Fas-Rezeptor-blockierenden Antikörpers (Anti-Fas) ins Kulturmedium der PASCs und anschließende Bestimmung der relativen Zellproliferation mittels eines kolorimetrischen Immunassays untersucht. Dabei konnten durch Rückgang der Proliferation unter Einfluss des rekombinanten, löslichen FasL klar anti-proliferative Eigenschaften Fas-Ligands sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Verhältnissen nachgewiesen werden [139]. Diese konnten ebenfalls durch gesteigerte Proliferation humaner PASCs sowohl unter Basalbedingungen als auch unter hypoxischen Verhältnissen nach Blockade des zellulären Fas-Rezeptors durch Anti-Fas untermauert werden [139]. Weiterhin bestätigte sich dieser anti-proliferative Einfluss des Fas-Signalwegs auf hPASCs durch Blockade des Fas-Rezeptors nach Stimulation der Zellen mit PDGF, einem Wachstumsfaktor mit sowohl mitogenen als auch anti-apoptotischen Eigenschaften in glatten Muskelzellen und verschiedenen weiteren Geweben, der eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der PAH sowie hypoxieinduzierter PH inne hat und zum *Remodeling* pulmonaler Gefäße beiträgt [75, 139, 253, 309]. Alterationen der FasL-Konzentration könnten also durch dessen pro-apoptotische und anti-proliferative Einflüsse auf hPASCs einen entscheidenden Faktor innerhalb des durch apoptotische und proliferative Dysregulation geprägten pulmonalvaskulären *Remodelings* in großen Höhen darstellen.

#### **4.9 FasL im Kontext höheninduzierter PH**

Die deutliche Reduktion der FasL-Konzentration in der Zirkulation akut sowie chronisch höhenexponierter Probanden legt einen Einfluss dieses apoptotischen Faktors in der Vermittlung physiologischer und pathophysiologischer Effekte großer Höhen nahe [139]. Aufgrund der eminenten Verminderung in Höhenbewohnern, die eine PH entwickelt hatten, sowie dem Nachweis der Vermittlung anti-proliferativer und pro-apoptotischer Funktionen Fas-Ligands in hPASCs sowohl unter hypoxischen Bedingungen als auch unter Einfluss eines für die Pathogenese der PH entscheidenden Wachstumsfaktors könnte die Dysregulation von FasL eine wichtige Rolle im Kontext höheninduzierter PH einnehmen

[139]. Zur Untersuchung einer möglichen Integration von FasL in die Pathophysiologie hypoxieinduzierten pulmonalvaskulären *Remodelings* sowie zur Ermittlung dessen möglichen diagnostischen sowie therapeutischen Potentials bedarf es jedoch weiterer Forschung.

Die negative Korrelation plasmatischer FasL-Konzentrationen mit der Höhe des gemessenen TRG in dauerhaften Bewohnern des Hochlandes legt zunächst einmal eine potentielle Verwendung dieses apoptotischen Markers in der Diagnostik erhöhter pulmonalarterieller Druckniveaus innerhalb dieses Patientenkollektivs nahe. Das Ausbleiben einer Bestätigung dieser Korrelation innerhalb akut höhenexponierter Probanden ist dabei am ehesten auf das Überwiegen der HPV als Ursache des gesteigerten PAP in den Frühphasen hypoxischer Exposition zurückzuführen [333]. Im Laufe chronischer Exposition gegenüber großen Höhen und der damit verbundenen Hypoxie nehmen strukturelle Veränderungen des vaskulären *Remodelings*, in dessen Kontext die Rolle von FasL zu sehen ist, zunehmend mehr Bedeutung in der Erhöhung und Aufrechterhaltung des pulmonalarteriellen Druckniveaus ein [210, 333]. Jedoch zeigt die frühzeitige Reduktion der Plasmakonzentration Fas-Ligands selbst nach akuter Höhenexposition ebenfalls eine mögliche Rolle des Fas-Signalwegs in die Frühphase hypoxieinduzierten vaskulären *Remodelings*, das im Laufe der Zeit durch gesteigerte Proliferation und „apoptotische Resistenz“ vaskulärer Zellen zur Hypertrophie der Gefäßwand und damit durch Obliteration des Gefäßlumens zur Steigerung der PVR und zur Erhöhung des PAP führt [40, 156, 210, 339, 343]. Zur Analyse einer potentiellen Nutzung zirkulierender FasL-Levels zur Detektion oder Prognostik der HAPH bedarf es jedoch größer angelegter Untersuchungen, die eine Aussage hinsichtlich Spezifität, Sensitivität sowie prognostischer Relevanz erniedrigter FasL-Plasmakonzentrationen innerhalb chronisch höhenexponierter Populationen zulassen.

Das therapeutische Potential Fas-Ligands innerhalb Pulmonaler Hypertonie konnte bereits durch *Akagi et al.* demonstriert werden, die einen pro-apoptotischen Effekt von PGI<sub>2</sub> auf PAH-PASMCs, vermittelt durch IP<sub>3</sub>-Rezeptoren sowie eine Steigerung der zellulären FasL-Expression, nachwiesen [1]. Dabei korrelierten unter der Therapie gesteigerte Serum-FasL-Konzentrationen signifikant positiv mit der eingesetzten PGI<sub>2</sub>-Dosis in Patienten mit IPAH [1]. Diese pro-apoptotischen Eigenschaften PGI<sub>2</sub>s in PAH-PASMCs eröffnen neben den bekannten vasodilatatorischen und anti-proliferativen Effekten dieses Medikaments [43] unter Umständen die Möglichkeit einer Umkehr oder Reduktion des vas-

kulären *Remodelings* in vivo. Durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigten pro-apoptischen und anti-proliferativen Effekte Fas-Ligands auf hPASMCs in vitro sowie die Reduktion von dessen Plasmakonzentration in Höhenbewohnern mit HAPH ergeben sich möglicherweise ebenfalls neue Optionen zur Erweiterung der bisher stark eingeschränkten Therapiemöglichkeiten der HAPH. Jedoch scheidet eine einfache systemische Anwendung von Fas-Agonisten, wie einem rekombinanten FasL oder Fas-aktivierenden Antikörpern, durch deren fulminante toxische Nebenwirkungen in gesunden Geweben [158, 207, 223] aus, sodass der Entschlüsselung der vorgelagerten Signalkaskade der FasL-Expression im Rahmen der Exposition gegenüber Hypoxie und großen Höhen eine entscheidende Bedeutung in der Suche nach einer möglichst spezifischen Therapieoption der HAPH zukommt.

Dabei ist die Genese reduzierter Plasmakonzentrationen Fas-Ligands während akuter und chronischer Höhenexposition bisher ungeklärt. Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit eine Alteration der FasL-mRNA-Expression in kultivierten hPASMCs unter Hypoxie festgestellt werden, jedoch zeigte sich hier eine Steigerung der Expression auf mRNA-Ebene, welche durch weitere Untersuchungen der Proteinexpression Fas-Ligands in diesen bestätigt werden sollte. Es bleibt jedoch zu beachten, dass eine Reinkultur humaner PASMCs nicht die Komplexität der vielfältigen Interaktionen zwischen den am Gefäßwandaufbau beteiligten Zelltypen widerspiegeln kann [210]. So könnten in vivo vaskuläre Endothelzellen und Fibroblasten durch Sekretion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise PDGF oder IGF1 [210], die FasL-Expression humaner PASMCs unter Hypoxie beeinflussen. Hier wäre beispielsweise eine Signalvermittlung über den PI3K/Akt-Signalweg vorstellbar, durch den PDGF in verschiedenen Geweben überwiegend die Inhibition der Apoptose und Steigerung der Proliferation vermittelt [50, 132, 253, 307, 308]. Akt vermittelt seinen zellulären Überlebens-effekt durch Inhibition pro-apoptischer Proteine wie Caspase 9 oder Bad, aber auch durch Phosphorylierung und damit Inhibition von Proteinen der humanen *Forkhead*-Familie, die als Transkriptionsfaktoren unter anderem zur Induktion des FasL-Gens führen [36, 128, 158, 316]. Es resultiert also eine Reduktion der zellulären FasL-Expression. Aufgrund dieses und weiterer möglicher Signalwege bedarf es der genauen Untersuchung zellulärer Interaktionen im Rahmen des vaskulären *Remodelings* speziell im Hinblick möglicher Einflüsse auf die Expression Fas-Ligands. Weiterhin könnten vaskuläre Endothelzellen oder umliegende Immunzellen, die nachweislich in der Lage sind FasL zu exprimieren [158],

selbst, durch verminderte Expression unter Hypoxie, an der Reduktion der Plasmakonzentration Fas-Ligands in großen Höhen beteiligt sein sowie durch Minderung parakriner Effekte dieses zur Senkung der Apoptoserate humaner PASMCs und damit zur Hypertrophie der pulmonalvaskulären Media beitragen. Es werden also zusätzliche Untersuchungen der hypoxischen FasL-Expression weiterer Zellreihen der pulmonalen Gefäßwand und darüber hinaus benötigt, um dessen erniedrigte Plasmakonzentration während akuter und chronischer Höhenexposition zu erklären. Zudem gilt es die genauen Mechanismen der Freisetzung Fas-Ligands als löslichen Faktor in die Zirkulation versus der Expression als zellgebundenes Transmembranprotein zu identifizieren, wobei proteolytische Spaltung durch Metalloproteasen sowie verschiedene Spleißvarianten eine Rolle spielen könnten [128, 158]. Abschließend wird der Entschlüsselung der exakten Funktion der verschiedenen löslichen und membrangebundenen Varianten Fas-Ligands unter dem Hintergrund ihrer apoptotischen aber auch möglicher non-apoptotischer Signalwege [155] im Kontext vaskulären *Remodelings* eine entscheidende Rolle zukommen.

### **4.10 Fazit & zukünftige Perspektiven**

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse erwiesen zum ersten Mal eine Reduktion zirkulierender Konzentrationen des apoptotischen Akteurs Fas-Ligand während akuter und chronischer Exposition gegenüber den Umweltbedingungen großer Höhen. Weiterhin implizieren dessen pro-apoptotische und anti-proliferative Eigenschaften in relevanten Zellen der pulmonalen Gefäßwand eine wichtige Rolle der Dysregulation Fas-Ligands im Kontext pulmonalvaskulären *Remodelings* und der höheninduzierten Pulmonalen Hypertonie.

Hierbei muss in der weiteren Forschung jedoch berücksichtigt werden, dass der immensen Komplexität der Pathogenese hypoxieinduzierter Pulmonaler Hypertonie mit wechselseitigen Interaktionen verschiedener Zellreihen und molekularer Faktoren ebenso vielseitige und komplexe Funktionen apoptotischer Signale gegenüber stehen. Daher wird zukünftig der Entschlüsselung der vorgeschalteten Signalkaskade sowie der exakten Funktion der verschiedenen Expressionsvarianten Fas-Ligands im Rahmen der Exposition gegenüber Hypoxie und großen Höhen eine entscheidende Bedeutung zukommen. Ebenfalls bedarf es weiterer Untersuchungen, um dessen mögliches therapeutisches und diagnostisches Potential in höhenexponierten Populationen zu evaluieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Exposition gegenüber großen Höhen kann durch die Effekte akuter und chronischer Hypoxie auf das kardiopulmonale System neben akut höheninduzierten Erkrankungen zur Entwicklung einer höheninduzierten Pulmonalen Hypertonie führen. Dabei spielt die Dysregulation von Proliferation und Apoptose eine entscheidende Rolle in der Pathogenese Pulmonaler Hypertonie, da diese zu *Remodeling*-Prozessen der pulmonalen Gefäßwand und damit zur Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks beiträgt. Aufgrund dieser und weiterer zellulärer Anomalien wurde die Pulmonale Hypertonie in den letzten Jahren häufig als tumorähnliche Erkrankung beschrieben.

Ein Ungleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Signalwege sowie eine Alteration zirkulierender, apoptotischer Signale konnte bereits für mehrere Pathologien mit Dysregulation der Apoptose wie Tumorerkrankungen, Herzerkrankungen und andere Formen der Pulmonalen Hypertonie beschrieben werden. Jedoch war bisher nichts über die Expressionsprofile apoptotischer Signale in der Zirkulation akut und chronisch höhenexponierter Menschen bekannt.

Verglichen zu normoxischen Bedingungen konnte in der vorliegenden Arbeit durch Methoden der mRNA-Quantifizierung eine erhöhte Genexpression verschiedener zellulärer, apoptotischer Signale in humanen, pulmonalarteriellen, glatten Muskelzellen (PASMCs) unter Hypoxie gezeigt werden. Unter den analysierten zirkulierenden, apoptotischen Signalen zeigte Fas-Ligand eine deutliche und zeitabhängige Reduktion seiner Plasmakonzentration in akut höhenexponierten Bewohnern des Flachlands. Zudem konnte ebenfalls eine Reduktion der Plasmakonzentration Fas-Ligands in Höhenbewohnern mit Pulmonaler Hypertonie verglichen mit der Flachlandkontrolle festgestellt werden. Weiterhin ergab sich eine negative Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen Fas-Ligands und der Höhe der erhobenen TRG (trikuspidaler Regurgitationsgradient) -Werte in dauerhaften Bewohnern des Hoch- und Flachlands. Abschließend konnte ein pro-apoptotischer und anti-proliferativer Effekt Fas-Ligands auf humane PASMCs *in vitro* nachgewiesen werden.

Die Zusammenschau dieser Ergebnisse zeigt eine Reduktion zirkulierender Fas-Ligand-Levels während akuter und chronischer Exposition gegenüber großen Höhen. Aufgrund der pro-apoptotischen und anti-proliferativen Funktionen Fas-Ligands in humanen PASMCs impliziert diese Arbeit weiterhin eine mögliche Rolle der Dysregulation Fas-Ligands im Kontext höheninduzierter Pulmonaler Hypertonie.

## **6 SUMMARY**

Besides acute altitude-induced diseases, exposition to high-altitude environment with its acute and chronic hypoxic effects on the cardiopulmonary system can lead to development of high-altitude pulmonary hypertension. Contributing to remodelling processes of the pulmonary vessel wall and thereby to an increase of pulmonary arterial pressure, dysregulation of proliferation and apoptosis plays a key role in the pathogenesis of pulmonary hypertension. Due to these and further cellular abnormalities, pulmonary hypertension has often been described as a cancer-like disease in recent years.

So far, an imbalance of pro- and anti-apoptotic molecular pathways as well as an alteration of circulating apoptotic signals have been described in pathologies associated with dysregulated apoptosis such as cancer, heart disease, and other forms of pulmonary hypertension. However, there is a lack of research regarding the expression profiles of apoptotic signals in the circulation of humans exposed to the acute and chronic effects of high altitude.

In the present study, methods of mRNA quantification revealed increased gene expression of various cellular apoptotic signals in human pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) under hypoxia compared to normoxic conditions. Among the analysed circulating apoptotic signals, Fas ligand showed a prominent and time-dependant decrease in plasma concentration in lowlanders acutely exposed to high altitude. Moreover, a reduction of Fas ligand plasma concentration was found in highlanders with pulmonary hypertension, as compared to lowland controls. Furthermore, a negative correlation between Fas ligand plasma concentrations and the TRG (tricuspid regurgitant gradient) values of permanent high- and lowland inhabitants was detected. Finally, a pro-apoptotic and anti-proliferative effect of Fas ligand on human PASMCs was verified *in vitro*.

These findings demonstrate a reduction of circulating Fas ligand levels during acute and chronic exposure to high-altitude environment. This study furthermore implicates a potential role of dysregulated Fas ligand in high-altitude pulmonary hypertension due to its pro-apoptotic and anti-proliferative effect in human PASMCs.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### Formelzeichen & Symbole

n	Anzahl
x	-fach/mal
°	Grad
>	größer
≥	größer gleich
<	kleiner
≤	kleiner gleich
*	mal
-	minus
±	plus-minus
/	pro / geteilt durch / oder
~	proportional zu
%	Prozent/-prozentig
p	Signifikanzwert
&	und
≈	ungefähr

### Chemische (Summen-)Formeln & Elementensymbole

Ar	Argon
Ca	Calcium
Ca <sup>+</sup>	Calcium-Ionen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
Fe	Eisen
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
K <sup>+</sup>	Kalium-Ionen
Mg	Magnesium
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ionen
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxyd
O <sub>2</sub>	<i>Oxygenium – Sauerstoff</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxyd

### Griechisches Alphabet

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
Δ	Delta (Differenz)

## Abkürzungsverzeichnis

$\eta$	Eta
$\kappa$	Kappa
$\mu$	My (Mikro-, $10^{-6}$ )
$\pi$	Pi

## Einheiten

$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
A	Ampere
cm	Zentimeter
$\text{cm}^2$	Quadratzentimeter
d	<i>day</i> - Tag
dL	Deziliter
ft	<i>Feet</i> - Fuß
g	<i>Gramm</i>
G	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde/-stündig
Hm	Höhenmeter (Höhe in Metern über dem Meeresspiegel)
in.	Inch
kg	Kilogramm
L	Liter
M	Molar
m	Meter
$\text{m}^2$	Quadratmeter
mA	Milliampere
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol	Mol ( $6,02214076 \times 10^{23}$ Teilchen)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pg	Pikogramm
pH	<i>potentia hydrogenii</i> - negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}_3\text{O}^+$ -Konzentration
RPM	<i>revolutions per minute</i> - Umdrehungen pro Minute
sec	<i>second</i> - Sekunde
WE	Wood-Einheit

## Geläufige Abkürzungen

A.	<i>arteria</i> - Arterie
Aa.	<i>arteriae</i> - Arterien

Abb.	Abbildung
Anti-	gegen
bzw.	Beziehungsweise
ca.	<i>circa</i> - ungefähr
et al.	<i>et alteri</i> - und andere
ggf.	gegebenenfalls
Hrsg.	Herausgeber
inkl.	<i>inklusive</i> – einschließlich
Kontr.	Kontrolle
Lfd.	laufend
M.	Membrana
Nr.	Nummer
Pro-	für
RT	Raumtemperatur
spez.	spezifisch
UK	<i>United Kingdom</i> - Vereinigtes Königreich
USA	<i>United States of America</i> - Vereinigte Staaten von Amerika
V.	<i>vena</i> – Vene
vs.	<i>versus</i> - gegen
Vv.	<i>venae</i> – Venen
z.B.	zum Beispiel

### Wissenschaftliche Termini

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> - erworbenes Immun-Defizienz-Syndrom
AIF	<i>apoptosis activating factor</i> - apoptoseinduzierender Faktor
Akt	Proteinkinase B (PKB)
AMS	<i>acute mountain sickness</i> – akute Höhenkrankheit
Anti-Fas	Fas-Rezeptor neutralisierender Antikörper
APAF-1	<i>apoptosis activating factor 1</i> - apoptoseaktivierender Faktor 1
APOC1 / ApoC1	Apolipoprotein C1
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> – akutes Lungenversagen
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain</i> - apoptoseinduzierendes speck-ähnliches Protein mit Caspaserekrutierungsdomäne
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> - B-Zelllymphom-Protein 2
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIR	<i>baclovirus inhibitor of apoptosis repeat</i> – Baclovirus-Apoptoseinhibitor Repeat
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BNP	<i>B-type natriuretic peptide</i> - B-Typ natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	<i>body surface area</i> – Körperoberfläche
CAD	Caspase aktivierte DNase
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
Casp	Caspase
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i> - C-C-Motifchemokinligand
CD40L	<i>cluster of differentiation 40 ligand</i> - Differenzierungscluster-40-Ligand
cDNA	<i>complementary DNA</i> - komplementäre DNA
cFLIP	<i>cellular FLIP</i> - zelluläres FLIP
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
CMS	<i>chronic mountain sickness</i> - chronische Höhenkrankheit
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> - chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CpcPH	<i>Combined post- and pre- capillary PH</i> - kombiniert post- und präkapilläre PH
CPI	<i>Cardio-Pulmonary Institute</i> - Kardio-Pulmonales Institut
CT	Computertomographie
CTEPH	Chronisch thromboembolische Pulmonale Hypertonie
CW	<i>continuous wave</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i> - C-X-C-Motifchemokinligand
DcR	<i>decoy receptor</i> - “Köder”-Rezeptor
DD	<i>death domain</i> - Todesdomäne
DED	<i>death effector domain</i> – Todeseffektordomäne
Diablo	<i>direct IAP-binding protein with low pI</i> - direkt IAP-bindendes Protein mit niedrigem pI
DISC	<i>death-inducing signalling complex</i> - todesinduzierender Signalkomplex
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> - Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> - Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
DR	<i>death receptor</i> – Todesrezeptor
dRn	Delta Rn
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> - Doppelstrang-DNA
dT	Desoxythymidin
ECAM	<i>endothelial cell adhesion molecule</i> - Endothelzelladhäsionsmolekül
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> - epidermaler Wachstumsfaktor
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> - Enzymgebundener Immun(ad)sorptions-Test
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i> - extrazellulär regulierte Kinase
ERS	<i>European Respiratory Society</i> - Europäische Gesellschaft für Atemwegserkrankungen
ESC	<i>European Society of Cardiology</i> - Europäische Gesellschaft für Kardiologie
ET-1	Endothelin 1

EvG	Elastica-van-Gieson
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i> - Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FasL / FASLG	Fas-Ligand
FBS	<i>fetal bovine serum</i> - fetales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> – Fibroblastenwachstumsfaktor
FLIP	<i>FADD-like ICE inhibitory proteins</i> - FADD ähnliche ICE-Inhibitorproteine
FP	<i>forward primer</i> - Vorwärtsprimer
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> - Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HA	<i>high altitude</i> - große Höhe
HACE	<i>high-altitude cerebral edema</i> – Höhenhirnödem
HAPE	<i>high-altitude pulmonary edema</i> - Höhenlungenödem
HAPH	<i>high-altitude pulmonary Hypertension</i> - höheninduzierte Pulmonale Hypertonie
Hb	Hämoglobin
HDAC	Histondeacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i> – Hypoxieinduzierbarer Faktor
Hox	Hypoxie
hPASMCs	<i>human pulmonal arterial smooth muscle cells</i> - humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen
HPV	Hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion
HVR	<i>hypoxic ventilatory response</i> - hypoxisch ventilatorische Antwort
HZV	Herzzeitvolumen
IAPs	<i>Inhibitors of apoptosis</i> - Inhibitoren der Apoptose
ICAD	Inhibitor der CAD
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> - interzelluläres Adhäsionsmolekül
ICE	<i>Interleukin-1-converting enzyme</i> - Interleukin-1-Konversionsenzym
IGF1	<i>insulin-like growth factor</i> - insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
IKK $\gamma$	<i>inhibitor of NF<math>\kappa</math>B subunit <math>\gamma</math></i> - Inhibitor von NF $\kappa$ B Untereinheit $\gamma$
IL	Interleukin
IPAH	Idiopathische Pulmonalarterielle Hypertonie
IpcPH	<i>isolated post-capillary PH</i> - isoliert postkapilläre PH
LA	<i>low altitude</i> - geringe Höhe
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i> - Monozyten-Lockstoff-Protein
MCT	Monocrotalin

## Abkürzungsverzeichnis

MISC	<i>motility-inducing signaling complex</i> – Motilität induzierender Signalkomplex
mPAP	pulmonalarterieller Mitteldruck
mRNA	<i>messenger RNA</i> - Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(-phosphat)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> - Nationales Zentrum für Biotechnologische Information
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor of <math>\kappa</math>-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> - nukleärer Faktor des $\kappa$ -Leichtkettenverstärkers aktivierter B-Zellen
NLR	<i>nucleotide-binding domain leucine-rich repeat</i> - Nukleotidbindedomäne Leucin-reiche Wiederholung
Nox	Normoxie
NPPB	<i>Natriuretic peptide B</i> - Natriuretisches Peptid B
NTproBNP	N-terminales-pro-BNP
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
p <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAP	<i>pulmonary arterial pressure</i> - pulmonalarterieller Druck
PASMC	<i>pulmonary arterial smooth muscle cell</i> - pulmonalarterielle glatte Muskelzelle
PAWP	<i>pulmonary arterial wedge pressure</i> - pulmonalarterieller Wedge-Druck
P <sub>B</sub>	Barometrischer Luftdruck
PBGD	<i>human porphobilinogen deaminase</i> - Humane Porphobilinogendeaminase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCH	<i>Pulmonary capillary haemangiomatosis</i> - pulmonalkapilläre Hämangiomatose
pCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> - plättchenabstammender Wachstumsfaktor
PFP	Plättchenfreies Plasma
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PH	Pulmonale Hypertonie
pH <sub>2</sub> O	Wasserdampfdruck
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
p <sub>i</sub> O <sub>2</sub>	Inspiratorischer Sauerstoffpartialdruck
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PVOD	<i>Pulmonary veno-occlusive disease</i> - pulmonale venookklusive Erkrankung
PVR	<i>pulmonary vascular resistance</i> - pulmonaler Gefäßwiderstand (pulmonalvaskuläre Resistance)
qRT-PCR	Quantitative Real time-PCR

RasGap	<i>Ras GTPase activating protein</i> - Ras-GTPase aktivierendes Protein
rhEGF	<i>recombinant human epidermal growth factor</i> - rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor
rhFGF-B	<i>recombinant human fibroblast growth factor-B</i> - rekombinanter humaner Fibroblastenwachstumsfaktor B
RIPK1	<i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i> - rezeptoerinteragierende Serin/Threonin-Proteinkinase 1
Rn	<i>normalized reporter signal</i> - normalisiertes Reporter-Signal
RNA	<i>ribonucleic acid</i> - Ribonukleinsäure
ROS	<i>reaktive oxygen species</i> - reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>reverse primer</i> - Rückwärtsprimer
RPM	<i>revolutions per minute</i> - Umdrehungen pro Minute
SD	<i>standard deviation</i> - Standardabweichung
SDF	<i>stromal cell-derived factor</i> - Bindegewebfaktor
sGC	<i>soluble guanylate cyclase</i> - Lösliche Guanylatzyklase
Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspases</i> - zweiter Caspasenaktivator aus Mitochondrien
sPAP	systolischer pulmonalerarterieller Druck
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i> - Signalwandler und Aktivator der Transkription 3
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tBID	<i>truncated BID</i> - gekürztes BID
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> - Tumornekrosefaktor
TNFSF10	<i>Tumor necrosis factor superfamily 10 (TRAIL)</i> - Tumornekrosefaktor-Superfamilie 10 (TRAIL)
TNFSF6	<i>Tumor necrosis factor superfamily 6 (Fas Ligand)</i> - Tumornekrosefaktor-Superfamilie 6 (Fas Ligand)
TRAF2	<i>TNF receptor associated factor 2</i> - TNF-rezeptorassoziiierter Faktor 2
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> - TNF-verwandter apoptoseinduzierender Ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
TRG	<i>tricuspid regurgitant gradient</i> - trikuspidaler Regurgitationsgradient
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPC6	<i>transient receptor potential cation channel 6</i> - transienter Rezeptorpotentialkationenkanal
TTE	Transthorakale Echokardiographie
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
UV	Ultraviolett-Strahlung
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i> - Gefäßzelladhäsionsmolekül
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> - vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor
WM	Wachstumsmedium

## Abkürzungsverzeichnis

---

WSPH	<i>world symposium on pulmonary hypertension</i> - Weltsymposium zu Pulmonaler Hypertonie
------	---

---

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1.1:</b> Blut-Luft-Schranke des Alveolarseptums (Schema) .....	04
<b>Abbildung 1.2:</b> Stark vereinfachtes Schema des menschlichen Blutkreislaufs .....	05
<b>Abbildung 1.3:</b> Systematik der Blutgefäße .....	07
<b>Abbildung 1.4:</b> Mechanismen der Pathophysiologie hypoxieinduzierter PH.....	15
<b>Abbildung 1.5:</b> Höhenregionen der Erde .....	19
<b>Abbildung 1.6:</b> Barometrischer Luftdruck ( $P_B$ ) in Abhängigkeit vom Höhengiveau....	19
<b>Abbildung 1.7:</b> Grad der Adaptation in Relation zur Zeit .....	22
<b>Abbildung 1.8:</b> Grundzüge der apoptotischen Signalkaskade .....	26
<b>Abbildung 2.1:</b> Histologische Färbungen im Vergleich .....	44
<b>Abbildung 2.2:</b> Neubauer-Zählkammer .....	47
<b>Abbildung 2.3:</b> Agarose-Gelelektrophorese .....	52
<b>Abbildung 2.4:</b> Humanstudien zu akuter und chronischer Höhenexposition .....	55
<b>Abbildung 2.5:</b> Testprinzip Sandwich-ELISA.....	57
<b>Abbildung 2.6:</b> Testprinzip kompetitiver ELISAs.....	58
<b>Abbildung 3.1:</b> Vaskuläres <i>Remodeling</i> peripherer, pulmonaler Arterien in Mäuselungen nach hypoxischer Inkubation .....	59
<b>Abbildung 3.2:</b> Vaskuläres <i>Remodeling</i> bronchusnaher, pulmonaler Arterien in Mäuselungen nach hypoxischer Inkubation.....	60
<b>Abbildung 3.3:</b> Genexpressionsprofil verschiedener apoptotischer Marker in humanen, pulmonalarteriellen, glatten Muskelzellen (PASMCs) nach Hypoxieexposition I.....	61
<b>Abbildung 3.4:</b> Genexpressionsprofil verschiedener apoptotischer Marker in PASMCs nach Hypoxieexposition II .....	63
<b>Abbildung 3.5:</b> Zirkulierende apoptotische Marker in humanen Probanden während akuter Höhenexposition .....	67
<b>Abbildung 3.6:</b> Zirkulierende apoptotische Marker in humanen Probanden, die dauerhaft in großen Höhen leben .....	70
<b>Abbildung 3.7:</b> Korrelationsanalyse zwischen den zirkulierenden Fas-Ligand-Levels und dem Regurgitationsgradienten der Trikuspidalklappe (TRG) während akuter und chronischer Höhenexposition.....	71
<b>Abbildung 3.8:</b> Pro-apoptotische und anti-proliferative Effekte Fas-Ligands in humanen PASMCs.....	74

## **9 TABELLENVERZEICHNIS**

<b>Tabelle 1.1:</b> Funktionelle Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie .....	09
<b>Tabelle 1.2:</b> Aktuelle klinische Klassifikation der PH (Nizza, 2018) .....	11
<b>Tabelle 2.1:</b> Verwendete Puffer Medien und Lösungen.....	39
<b>Tabelle 2.2:</b> Liste der verwendeten Primersequenzen .....	41
<b>Tabelle 2.3:</b> Färbeprotokolle histologischer Färbungen.....	45
<b>Tabelle 2.4:</b> Mastermix-Zusammensetzung für Reverse-Transkriptase-Reaktion.....	49
<b>Tabelle 2.5:</b> Inkubationsschritte der Reverse-Transkriptase-Reaktion .....	49
<b>Tabelle 2.6:</b> Reaktionsmix-Zusammensetzung Real time-PCR .....	50
<b>Tabelle 2.7:</b> Real time-PCR-Reaktionsprogramm.....	50
<b>Tabelle 3.1:</b> Akute Höhenexposition - anthropometrische und echokardiographische Daten humaner Probanden .....	64
<b>Tabelle 3.2:</b> Chronische Höhenexposition - anthropometrische und echokardiographische Daten humaner Probanden .....	68

## 10 LITERATUR

1. **Akagi S, Nakamura K, Matsubara H, Kusano KF, Kataoka N, Oto T, Miyaji K, Miura A, Ogawa A, Yoshida M, Ueda-Ishibashi H, Yutani C, Ito H** (2013): Prostaglandin I<sub>2</sub> induces apoptosis via upregulation of Fas ligand in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol* 165(3): S. 499–505
2. **Aldashev AA, Sarybaev AS, Sydykov AS, Kalmyrzaev BB, Kim EV, Mamanova LB, Maripov R, Kojonazarov BK, Mirrakhimov MM, Wilkins MR, Morrell NW** (2002): Characterization of high-altitude pulmonary hypertension in the Kyrgyz: association with angiotensin-converting enzyme genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 166(10): S. 1396–1402
3. **Aldashev AA, Kojonazarov BK, Amatov TA, Sooronbaev TM, Mirrakhimov MM, Morrell NW, Wharton J, Wilkins MR** (2005): Phosphodiesterase type 5 and high altitude pulmonary hypertension. *Thorax* 60(8): S. 683–687
4. **Alexander AF, Jensen R** (1963): Pulmonary vascular pathology of high altitude-induced pulmonary hypertension in cattle. *Am J Vet Res* 24: S. 1112–1122
5. **Algeciras-Schimmich A, Le Shen, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME** (2002): Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22(1): S. 207–220
6. **Altieri DC** (2003): Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 3(1): S. 46–54
7. **Ambalavanan N, Mariani G, Bulger A, Philips III JB** (1999): Role of nitric oxide in regulating neonatal porcine pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Biol Neonate* 76(5): S. 291–300
8. **Anwar A, Ruffenach G, Mahajan A, Eghbali M, Umar S** (2016): Novel biomarkers for pulmonary arterial hypertension. *Respir Res* 17(1): S. 88
9. **Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JGN, Weir EK** (2008): Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochon-

- dria-ROS-HIF-1 $\alpha$ -Kv1.5 O<sub>2</sub>-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294(2): S. H570-H578
10. **Arias-Stella J, Saldana M** (1963): The terminal portion of the pulmonary arterial tree in people native to high altitudes. *Circulation* 28: S. 915–925
  11. **Ashkenazi A, Dixit VM** (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381): S. 1305–1308
  12. **Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH** (1999): Safety and anti-tumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104(2): S. 155–162
  13. **Audi SH, Dawson CA, Rickaby DA, Linehan JH** (1991): Localization of the sites of pulmonary vasomotion by use of arterial and venous occlusion. *J Appl Physiol* 70(5): S. 2126–2136
  14. **Aumüller G** (2010): *Anatomie*, 2. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart. ISBN: 978-3-13-136042-7
  15. **Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, Krichman AM, Farber HW, Frost AE, Barst RJ, Benza RL, Liou TG, Turner M, Giles S, Feldkircher K, Miller DP, McGoon MD** (2010): Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* 137(2): S. 376–387
  16. **Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D** (2010): Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 42(2): S. 210–213
  17. **Bailey DM, Davies B, Young IS** (2001): Intermittent hypoxic training: implications for lipid peroxidation induced by acute normoxic exercise in active men. *Clin Sci (Lond)* 101(5): S. 465–475
  18. **Bailey DM, Ainslie PN, Jackson SK, Richardson RS, Ghatei M** (2004): Evidence against redox regulation of energy homeostasis in humans at high altitude. *Clin Sci (Lond)* 107(6): S. 589–600

19. **Bailey DM, Roukens R, Knauth M, Kallenberg K, Christ S, Mohr A, Genius J, Storch-Hagenlocher B, Meisel F, McEneny J, Young IS, Steiner T, Hess K, Bartsch P** (2006): Free radical-mediated damage to barrier function is not associated with altered brain morphology in high-altitude headache. *J Cereb Blood Flow Metab* 26(1): S. 99–111
20. **Bailey DM, Evans KA, James PE, McEneny J, Young IS, Fall L, Gutowski M, Kewley E, McCord JM, Moller K, Ainslie PN** (2009): Altered free radical metabolism in acute mountain sickness: implications for dynamic cerebral autoregulation and blood-brain barrier function. *J Physiol (Lond)* 587(1): S. 73–85
21. **Bajou K, Peng H, Laug WE, Maillard C, Noel A, Foidart JM, Martial JA, Declercq YA** (2008): Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer Cell* 14(4): S. 324–334
22. **Barry PW, Pollard AJ** (2003): Altitude illness. *BMJ* 326(7395): S. 915–919
23. **Bartsch P, Maggiorini M, Ritter M, Noti C, Vock P, Oelz O** (1991): Prevention of high-altitude pulmonary edema by nifedipine. *N Engl J Med* 325(18): S. 1284–1289
24. **Bartsch P, Swenson ER** (2013): Clinical practice: Acute high-altitude illnesses. *N Engl J Med* 368(24): S. 2294–2302
25. **Bartsch P, Bailey DM, Berger MM, Knauth M, Baumgartner RW** (2004): Acute mountain sickness: controversies and advances. *High Alt Med Biol* 5(2): S. 110–124
26. **Bartsch P, Swenson ER** (2013): Acute high-altitude illnesses. *N Engl J Med* 369(17): S. 1666–1667
27. **Basnyat B, Murdoch DR** (2003): High-altitude illness. *The Lancet* 361(9373): S. 1967–1974
28. **Basu M, Malhotra AS, Pal K, Prasad R, Kumar R, Prasad BAK, Sawhney RC** (2007): Erythropoietin levels in lowlanders and high-altitude natives at 3450 m. *Aviat Space Environ Med* 78(10): S. 963–967

29. **Baumgartner RW, Bartsch P, Maggiorini M, Waber U, Oelz O** (1994): Enhanced cerebral blood flow in acute mountain sickness. *Aviat Space Environ Med* 65(8): S. 726–729
30. **Benitz WE, Coulson JD, Lessler DS, Bernfield M** (1986): Hypoxia inhibits proliferation of fetal pulmonary arterial smooth muscle cells in vitro. *Pediatr Res* 20(10): S. 966–972
31. **Berghold F, Brugger H, Burtscher M, Domej W, Durrer B, Fischer R, Paal P, Schaffert W, Schobersberger W, Sumann G** (2019): *Alpin- und Höhenmedizin*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-662-56395-3
32. **Bigham A, Bauchet M, Pinto D, Mao X, Akey JM, Mei R, Scherer SW, Julian CG, Wilson MJ, Lopez Herraes D, Brutsaert T, Parra EJ, Moore LG, Shriver MD** (2010): Identifying signatures of natural selection in Tibetan and Andean populations using dense genome scan data. *PLoS Genet* 6(9): S. e1001116
33. **Blanc-Brude OP, Yu J, Simosa H, Conte MS, Sessa WC, Altieri DC** (2002): Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. *Nat Med* 8(9): S. 987–994
34. **Bossone E, Bordini BD, Mazza A, Allegra L** (2005): Pulmonary arterial hypertension: the key role of echocardiography. *Chest* 127(5): S. 1836–1843
35. **Braithwaite AT, Marriott HM, Lawrie A** (2018): Divergent Roles for TRAIL in Lung Diseases. *Front Med (Lausanne)* 5: S. 212
36. **Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME** (1999): Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96(6): S. 857–868
37. **Chan SY, Rubin LJ** (2017): Metabolic dysfunction in pulmonary hypertension: from basic science to clinical practice. *Eur Respir Rev* 26(146)
38. **Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT** (2000): Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem* 275(33): S. 25130–25138

39. **Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, Jung B, Dideberg O, Margolis RL** (2000): Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell* 6(1): S. 183–189
40. **Chen M, Liu Y, Yi D, Wei L, Li Y, Zhang L** (2014): Tanshinone IIA Promotes Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Apoptosis in Vitro by Inhibiting the JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* 33(4): S. 1130–1138
41. **Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M, Chenevert TL, Ross BD, Rehemtulla A** (2000): Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): S. 1754–1759
42. **Chiou S-K, Jones MK, Tarnawski AS** (2003): Survivin - an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit* 9(4): S. PI25-9
43. **Clapp LH, Finney P, Turcato S, Tran S, Rubin LJ, Tinker A** (2002): Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(2): S. 194–201
44. **Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN** (1992): Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 286(Pt 2): S. 331–334
45. **Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF** (1992): Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 61(4): S. 451–453
46. **Cookson BT, Brennan MA** (2001): Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* 9(3): S. 113–114
47. **Cooper AL, Beasley D** (1999): Hypoxia stimulates proliferation and interleukin-1alpha production in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 277(4): S. H1326-37
48. **D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, Levy PS, Pietra GG, Reid**

- LM, Reeves JT, Rich S, Vreim CE, Williams GW, Wu M** (1991): Survival in Patients with Primary Pulmonary Hypertension: Results from a National Prospective Registry. *AIM* 115(5): S. 343–349
49. **Daniels RA, Turley H, Kimberley FC, Liu XS, Mongkolsapaya J, Ch'en P, Xu XN, Jin BQ, Pezzella F, Screaton GR** (2005): Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell Research* 15(6): S. 430–438
50. **Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN** (1996): Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem* 271(48): S. 30835–30839
51. **Davie NJ, Gerasimovskaya EV, Hofmeister SE, Richman AP, Jones PL, Reeves JT, Stenmark KR** (2006): Pulmonary artery adventitial fibroblasts cooperate with vasa vasorum endothelial cells to regulate vasa vasorum neovascularization: a process mediated by hypoxia and endothelin-1. *Am J Pathol* 168(6): S. 1793–1807
52. **Dawson S, Arnold N, Pickworth J, Francis S, Lawrie A** (2014): TRAIL Deficient Mice Are Protected from Sugen/Hypoxia Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Diseases* 2(3): S. 260–273
53. **Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA** (1997): Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186(7): S. 1165–1170
54. **Dehnert C, Risse F, Ley S, Kuder TA, Buhmann R, Puderbach M, Menold E, Mereles D, Kauczor H-U, Bartsch P, Fink C** (2006): Magnetic resonance imaging of uneven pulmonary perfusion in hypoxia in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 174(10): S. 1132–1138
55. **Dempsey EC, McMurtry IF, O'Brien RF** (1991): Protein kinase C activation allows pulmonary artery smooth muscle cells to proliferate to hypoxia. *Am J Physiol* 260(2 Pt 1): S. L136-45
56. **Dickens LS, Boyd RS, Jukes-Jones R, Hughes MA, Robinson GL, Fairall L, Schwabe JWR, Cain K, Macfarlane M** (2012): A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol Cell* 47(2): S. 291–305

57. **Dietrich A, Kalwa H, Fuchs B, Grimminger F, Weissmann N, Gudermann T** (2007): In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium* 42(2): S. 233–244
58. **Drenckhahn D (Hrsg)** (2008): Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem, 17. Aufl. Anatomie, Bd 1. Elsevier, Urban & Fischer, München. ISBN: 978-3-437-42342-0
59. **Dromparis P, Michelakis ED** (2013): Mitochondria in vascular health and disease. *Annu Rev Physiol* 75: S. 95–126
60. **Dromparis P, Sutendra G, Michelakis ED** (2010): The role of mitochondria in pulmonary vascular remodeling. *J Mol Med* 88(10): S. 1003–1010
61. **Du X, Bao G, He X, Zhao H, Yu F, Qiao Q, Lu J, Ma Q** (2009): Expression and biological significance of c-FLIP in human hepatocellular carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 28: S. 24
62. **Eddahibi S, Fabre V, Boni C, Martres MP, Raffestin B, Hamon M, Adnot S** (1999): Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin. *Circ Res* 84(3): S. 329–336
63. **El-Khuffash A, Molloy EJ** (2007): Are B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal-pro-BNP useful in neonates? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 92(4): S. F320-4
64. **Ellsworth AJ, Larson EB, Strickland D** (1987): A randomized trial of dexamethasone and acetazolamide for acute mountain sickness prophylaxis. *Am J Med* 83(6): S. 1024–1030
65. **Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR** (1998): Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273(23): S. 14363–14367

66. **Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S** (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662): S. 43–50
67. **Euler USv, Liljestrand G** (1946): Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat. *Acta Physiologica Scandinavica* 12(4): S. 301–320
68. **Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B** (1999): Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun* 266(3): S. 699–717
69. **Fan Z, Liu B, Zhang S, Liu H, Li Y, Wang D, Liu Y, Li J, Wang N, Liu Y, Zhang B** (2015): YM155, a selective survivin inhibitor, reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats via upregulating voltage-gated potassium channels. *Clin Exp Hypertens* 37(5): S. 381–387
70. **Fijalkowska A, Kurzyna M, Torbicki A, Szewczyk G, Florczyk M, Pruszczyk P, Szturmowicz M** (2006): Serum N-terminal brain natriuretic peptide as a prognostic parameter in patients with pulmonary hypertension. *Chest* 129(5): S. 1313–1321
71. **Fink SL, Cookson BT** (2006): Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* 8(11): S. 1812–1825
72. **Fourie PR, Coetzee AR, Bolliger CT** (1992): Pulmonary artery compliance: its role in right ventricular-arterial coupling. *Cardiovasc Res* 26(9): S. 839–844
73. **Frank DB, Abtahi A, Yamaguchi DJ, Manning S, Shyr Y, Pozzi A, Baldwin HS, Johnson JE, Caestecker MP de** (2005): Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 97(5): S. 496–504
74. **Freeman K, Shalit M, Stroh G** (2004): Use of the Gamow Bag by EMT-basic park rangers for treatment of high-altitude pulmonary edema and high-altitude cerebral edema. *Wilderness Environ Med* 15(3): S. 198–201
75. **Freyhaus H ten, Dagnell M, Leuchs M, Vantler M, Berghausen EM, Caglayan E, Weissmann N, Dahal BK, Schermuly RT, Ostman A, Kappert K, Rosenkranz S** (2011): Hypoxia enhances platelet-derived growth factor signaling

- in the pulmonary vasculature by down-regulation of protein tyrosine phosphatases. *Am J Respir Crit Care Med* 183(8): S. 1092–1102
76. **Frid MG, Aldashev AA, Dempsey EC, Stenmark KR** (1997): Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res* 81(6): S. 940–952
77. **Frisancho AR, Frisancho HG, Milotich M, Brutsaert T, Albalak R, Spielvogel H, Villena M, Vargas E, Soria R** (1995): Developmental, genetic, and environmental components of aerobic capacity at high altitude. *Am J Phys Anthropol* 96(4): S. 431–442
78. **Fritz JS, Blair C, Oudiz RJ, Dufton C, Olschewski H, Despain D, Gillies H, Kawut SM** (2013): Baseline and follow-up 6-min walk distance and brain natriuretic peptide predict 2-year mortality in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 143(2): S. 315–323
79. **Füessl HS** (2010): Anamnese und Klinische Untersuchung (mit Auskultationsbefunden von Herz und Lunge auf DVD), 4. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart. ISBN: 978-3-13-126884-6
80. **Gaggin HK, Januzzi JL** (2013): Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochim Biophys Acta* 1832(12): S. 2442–2450
81. **Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M** (2016): 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 37(1): S. 67–119
82. **Galiè N, McLaughlin VV, Rubin LJ, Simonneau G** (2019): An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. *Eur Respir J* 53(1)

83. **Galluzzi L, López-Soto A, Kumar S, Kroemer G** (2016): Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity* 44(2): S. 221–231
84. **Garbers DL** (1992): Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 71(1): S. 1–4
85. **Ginosar Y, Malhotra A, Schwartz E** (2013): High altitude, continuous positive airway pressure, and obstructive sleep apnea: subjective observations and objective data. *High Alt Med Biol* 14(2): S. 186–189
86. **Gochuico BR, Zhang J, Ma BY, Marshak-Rothstein A, Fine A** (2000): TRAIL expression in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(5): S. L1045-50
87. **Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM** (1998): Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 78(8): S. 893–913
88. **Green H, Roy B, Grant S, Burnett M, Tupling R, Otto C, Pipe A, McKenzie D** (2000): Downregulation in muscle Na(+)-K(+)-ATPase following a 21-day expedition to 6,194 m. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 88(2): S. 634–640
89. **Greenleaf JE, Hinghofer-Szalkay H, Rossler A, Farrell PA, Loomis JL, Fedele MJ, West J, Cowell SA** (2001): Plasma sodium-osmotic dissociation and hormonal interaction with drinking-induced hypervolemia at 2800 m altitude. *Aviat Space Environ Med* 72(6): S. 522–528
90. **Greksa LP** (1988): Effect of altitude on the stature, chest depth and forced vital capacity of low-to-high altitude migrant children of European ancestry. *Hum Biol* 60(1): S. 23–32
91. **Grimminger J, Richter M, Tello K, Sommer N, Gall H, Ghofrani HA** (2017): Thin Air Resulting in High Pressure: Mountain Sickness and Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Can Respir J* 2017: S. 8381653
92. **Groves BM, Droma T, Sutton JR, McCullough RG, McCullough RE, Zhuang J, Rapmund G, Sun S, Janes C, Moore LG** (1993): Minimal hypoxic pulmonary hypertension in normal Tibetans at 3,658 m. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 74(1): S. 312–318

93. **Gstraunthaler G, Lindl T** (2013): Zell- und Gewebekultur, *Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*, 7. Aufl. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-642-33112-1
94. **Guégan C, Vila M, Teismann P, Chen C, Onténiente B, Li M, Friedlander RM, Przedborski S, Teissman P** (2002): Instrumental activation of bid by caspase-1 in a transgenic mouse model of ALS. *Molecular and Cellular Neuroscience* 20(4): S. 553–562
95. **Guégan JP, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Ducret T, Quignard J-F, Vacher P, Legembre P** (2020): CD95/Fas and metastatic disease: What does not kill you makes you stronger. *Semin Cancer Biol* 60: S. 121–131
96. **Hackett PH, Yarnell PR, Hill R, Reynard K, Heit J, McCormick J** (1998): High-altitude cerebral edema evaluated with magnetic resonance imaging: clinical correlation and pathophysiology. *JAMA* 280(22): S. 1920–1925
97. **Hakim TS, Michel RP, Minami H, Chang HK** (1983): Site of pulmonary hypoxic vasoconstriction studied with arterial and venous occlusion. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 54(5): S. 1298–1302
98. **Hameed AG, Arnold ND, Chamberlain J, Pickworth JA, Paiva C, Dawson S, Cross S, Long L, Zhao L, Morrell NW, Crossman DC, Newman CMH, Kiely DG, Francis SE, Lawrie A** (2012): Inhibition of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) reverses experimental pulmonary hypertension. *J Exp Med* 209(11): S. 1919–1935
99. **Heinrich PC, Löffler G** (2014): Biochemie und Pathobiochemie, 9. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer, Heidelberg. ISBN: 978-3-642-17971-6
100. **Herold G (Hrsg)** (2015): Innere Medizin 2015, *Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Selbstverl., Köln. ISBN: 978-3-9814660-4-1
101. **Herrero R, Kajikawa O, Matute-Bello G, Wang Y, Hagimoto N, Mongovin S, Wong V, Park DR, Brot N, Heinecke JW, Rosen H, Goodman RB, Fu X, Martin TR** (2011): The biological activity of FasL in human and mouse lungs is determined by the structure of its stalk region. *J Clin Invest* 121(3): S. 1174–1190

102. **Hertl M** (2017): Interventionsmöglichkeiten von Inkretinmimetika in den Pathogeneseprozess der pulmonalen Hypertonie sowie daraus abgeleitete potenzielle therapeutische Konsequenzen. [Inauguraldissertation], Justus-Liebig-Universität Gießen
103. **Hislop A, Reid L** (1976): New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp Pathol* 57(5): S. 542–554
104. **Hoepfer MM, Lee SH, Voswinckel R, Palazzini M, Jais X, Marinelli A, Barst RJ, Ghofrani HA, Jing Z-C, Opitz C, Seyfarth H-J, Halank M, McLaughlin V, Oudiz RJ, Ewert R, Wilkens H, Kluge S, Bremer H-C, Baroke E, Rubin LJ** (2006): Complications of right heart catheterization procedures in patients with pulmonary hypertension in experienced centers. *J Am Coll Cardiol* 48(12): S. 2546–2552
105. **Hoepfer MM, Ghofrani HA, Gorenflo M, Grünig E, Rosenkranz S, Schranz D** (2010): Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie. *Kardiologe* 4(3): S. 189–207
106. **Hoepfer MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, Jing Z-C, Gibbs JSR** (2016): A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet Respiratory Medicine* 4(4): S. 306–322
107. **Hoepfer MM, Ghofrani H-A, Grünig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S** (2017): Pulmonary Hypertension. *Dtsch Arztebl Int* 114(5): S. 73–84
108. **Holdenrieder S, Stieber P** (2004): Apoptotic markers in cancer. *Clin Biochem* 37(7): S. 605–617
109. **Holdenrieder S, Stieber P** (2010): Circulating apoptotic markers in the management of non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark* 6(3-4): S. 197–210
110. **Hong YM, Kwon JH, Choi S, Kim KC** (2014): Apoptosis and inflammation associated gene expressions in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats after bosentan treatment. *Korean Circ J* 44(2): S. 97–104
111. **Honig A** (1989): Peripheral arterial chemoreceptors and reflex control of sodium and water homeostasis. *Am J Physiol* 257(6 Pt 2): S. R1282-302

112. **Hopkins SR, Garg J, Bolar DS, Balouch J, Levin DL** (2005): Pulmonary blood flow heterogeneity during hypoxia and high-altitude pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med* 171(1): S. 83–87
113. **Howell K, Preston RJ, McLoughlin P** (2003): Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation. *J Physiol (Lond)* 547(Pt 1): S. 133–145
114. **Hunt PJ, Yandle TG, Nicholls MG, Richards AM, Espiner EA** (1995): The amino-terminal portion of pro-brain natriuretic peptide (Pro-BNP) circulates in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 214(3): S. 1175–1183
115. **Imray C** (2012): Acetazolamide for the prophylaxis of acute mountain sickness. *BMJ* 345: S. e7077
116. **Imray C, Wright A, Subudhi A, Roach R** (2010): Acute mountain sickness: pathophysiology, prevention, and treatment. *Prog Cardiovasc Dis* 52(6): S. 467–484
117. **Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J** (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388(6638): S. 190–195
118. **Jansohn M** (2012): Gentechnische Methoden, *Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag; Imprint, Heidelberg. ISBN: 978-3-8274-2429-7
119. **Jensen JB, Wright AD, Lassen NA, Harvey TC, Winterborn MH, Raichle ME, Bradwell AR** (1990): Cerebral blood flow in acute mountain sickness. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 69(2): S. 430–433
120. **Jin B, Luo X-P, Ni H-C, Shi H-M** (2010): Phosphodiesterase type 5 inhibitors for high-altitude pulmonary hypertension: a meta-analysis. *Clin Drug Investig* 30(4): S. 259–265
121. **Johnson ME, Howerth EW** (2004): Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol* 41(6): S. 599–607
122. **Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ** (2008): The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8(10): S. 782–798

123. **Jong MC, Hofker MH, Havekes LM** (1999): Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3): S. 472–484
124. **Kallenberg K, Bailey DM, Christ S, Mohr A, Roukens R, Menold E, Steiner T, Bartsch P, Knauth M** (2007): Magnetic resonance imaging evidence of cytotoxic cerebral edema in acute mountain sickness. *J Cereb Blood Flow Metab* 27(5): S. 1064–1071
125. **Kallenberg K, Dehnert C, Dorfler A, Schellinger PD, Bailey DM, Knauth M, Bartsch PD** (2008): Microhemorrhages in nonfatal high-altitude cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(9): S. 1635–1642
126. **Kasic JF, Yaron M, Nicholas RA, Lickteig JA, Roach R** (1991): Treatment of acute mountain sickness: hyperbaric versus oxygen therapy. *Ann Emerg Med* 20(10): S. 1109–1112
127. **Kato M, Staub NC** (1966): Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia. *Circ Res* 19(2): S. 426–440
128. **Kavurma MM, Khachigian LM** (2003): Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ* 10(1): S. 36–44
129. **Kavurma MM, Schoppet M, Bobryshev YV, Khachigian LM, Bennett MR** (2008): TRAIL stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of NF-kappaB and induction of insulin-like growth factor-1 receptor. *J Biol Chem* 283(12): S. 7754–7762
130. **Kayser B, Hulsebosch R, Bosch F** (2008): Low-dose acetylsalicylic acid analog and acetazolamide for prevention of acute mountain sickness. *High Alt Med Biol* 9(1): S. 15–23
131. **Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV** (1994): Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8): S. 2013–2026
132. **Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J** (1997): Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J* 16(10): S. 2783–2793

133. **Klausen K** (1966): Cardiac output in man in rest and work during and after acclimatization to 3,800 m. *J Appl Physiol* 21(2): S. 609–616
134. **Kojonazarov B, Isakova J, Imanov B, Sovkhozova N, Sooronbaev T, Ishizaki T, Aldashev AA** (2012): Bosentan reduces pulmonary artery pressure in high altitude residents. *High Alt Med Biol* 13(3): S. 217–223
135. **Kojonazarov B, Myrzaakhmatova A, Sooronbaev T, Ishizaki T, Aldashev A** (2012): Effects of fasudil in patients with high-altitude pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 39(2): S. 496–498
136. **Kojonazarov BK, Imanov BZ, Amatov TA, Mirrakhimov MM, Naeije R, Wilkins MR, Aldashev AA** (2007): Noninvasive and invasive evaluation of pulmonary arterial pressure in highlanders. *Eur Respir J* 29(2): S. 352–356
137. **Korf H-W, Schiebler TH** (2007): *Anatomie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; mit 111 Tabellen*, 10. Aufl. Steinkopff, [Heidelberg]. ISBN: 978-3-7985-1770-7
138. **Korkolopoulou P, Goudopoulou A, Voutsinas G, Thomas-Tsagli E, Kapralos P, Patsouris E, Saetta AA** (2004): c-FLIP expression in bladder urothelial carcinomas: its role in resistance to Fas-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations. *Urology* 63(6): S. 1198–1204
139. **Kosanovic D, Platzek SM, Petrovic A, Sydykov A, Maripov A, Mamazhakypov A, Sartmyrzaeva M, Muratali Uulu K, Cholponbaeva M, Toktosunova A, Omurzakova N, Duishobaev M, Vroom C, Pak O, Weissmann N, Ghofrani HA, Sarybaev A, Schermuly RT** (2019): Circulating Apoptotic Signals During Acute and Chronic Exposure to High Altitude in Kyrgyz Population. *Front Physiol* 10: S. 54
140. **Kourembanas S, Hannan RL, Faller DV** (1990): Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest* 86(2): S. 670–674
141. **Krammer PH** (1999): CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 71: S. 163–210

142. **Krasteva V, Brodeur MR, Tremblay F-L, Falstraull L, Brissette L** (2010): Apolipoprotein C-I reduces cholesteryl esters selective uptake from LDL and HDL by binding to HepG2 cells and lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1801(1): S. 42–48
143. **Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S** (2001): Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276(23): S. 20633–20640
144. **Kryger M, McCullough R, Doekel R, Collins D, Weil JV, Grover RF** (1978): Excessive polycythemia of high altitude: role of ventilatory drive and lung disease. *Am Rev Respir Dis* 118(4): S. 659–666
145. **Kuehl KS, Bruttig SP, Singer DV, Rubio R, Berne RM** (1981): Growth of aortic vascular smooth muscle cells in lowered oxygen tension. *Cell Tissue Res* 216(3): S. 591–602
146. **Lanner MC, Raper M, Pratt WM, Rhoades RA** (2005): Heterotrimeric G proteins and the platelet-derived growth factor receptor-beta contribute to hypoxic proliferation of smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33(4): S. 412–419
147. **Lawrie A** (2014): The role of the osteoprotegerin/tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand axis in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol* 63(3): S. 114–117
148. **Le Goff A, Ji Z, Leclercq B, Bourette RP, Mougel A, Guerardel C, Launoit Y de, Vicogne J, Goormachtigh G, Fafeur V** (2012): Anti-apoptotic role of caspase-cleaved GAB1 adaptor protein in hepatocyte growth factor/scatter factor-MET receptor protein signaling. *J Biol Chem* 287(42): S. 35382–35396
149. **Leist M, Jaattela M** (2001): Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8): S. 589–598
150. **Leonard WR, DeWalt KM, Stansbury JP, McCaston MK** (1995): Growth differences between children of highland and coastal Ecuador. *Am J Phys Anthropol* 98(1): S. 47–57

151. **Leon-Velarde F, Gamboa A, Rivera-Ch M, Palacios J-A, Robbins PA** (2003): Selected contribution: Peripheral chemoreflex function in high-altitude natives and patients with chronic mountain sickness. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 94(3): S. 1269-78; discussion 1253-4
152. **Leon-Velarde F, Maggiorini M, Reeves JT, Aldashev A, Asmus I, Bernardi L, Ge R-L, Hackett P, Kobayashi T, Moore LG, Penaloza D, Richalet J-P, Roach R, Wu T, Vargas E, Zubieta-Castillo G, Zubieta-Calleja G** (2005): Consensus statement on chronic and subacute high altitude diseases. *High Alt Med Biol* 6(2): S. 147–157
153. **Leuchte HH, Holzapfel M, Baumgartner RA, Ding I, Neurohr C, Vogeser M, Kolbe T, Schwaiblmair M, Behr J** (2004): Clinical significance of brain natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43(5): S. 764–770
154. **Leuchte HH, El Nounou M, Tuerpe JC, Hartmann B, Baumgartner RA, Vogeser M, Muehling O, Behr J** (2007): N-terminal pro-brain natriuretic peptide and renal insufficiency as predictors of mortality in pulmonary hypertension. *Chest* 131(2): S. 402–409
155. **Levoine N, Jean M, Legembre P** (2020): CD95 Structure, Aggregation and Cell Signaling. *Front Cell Dev Biol* 8: S. 314
156. **Li YX, Run L, Shi T, Zhang YJ** (2017): CTRP9 regulates hypoxia-mediated human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, apoptosis and migration via TGF- $\beta$ 1/ERK1/2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 490(4): S. 1319–1325
157. **Lichtblau M, Saxer S, Furian M, Mayer L, Bader PR, Scheiwiller PM, Mademilov M, Sheraliev U, Tanner FC, Sooronbaev TM, Bloch KE, Ulrich S** (2020): Cardiac function and pulmonary hypertension in Central Asian highlanders at 3250 m. *European Respiratory Journal* 56(2): S. 1902474
158. **Linkermann A, Qian J, Lettau M, Kabelitz D, Janssen O** (2005): Considering Fas ligand as a target for therapy. *Expert Opin Ther Targets* 9(1): S. 119–134

159. **Liu H, Yang E, Lu X, Zuo C, He Y, Jia D, Zhu Q, Yu Y, Lv A** (2015): Serum levels of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand correlate with the severity of pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* 33: S. 39–46
160. **Lockshin RA, Osborne B, Zakeri Z** (2000): Cell death in the third millennium. *Cell Death Differ* 7(1): S. 2–7
161. **Low EV, Avery AJ, Gupta V, Schedlbauer A, Grocott MPW** (2012): Identifying the lowest effective dose of acetazolamide for the prophylaxis of acute mountain sickness: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 345: S. e6779
162. **Lu S-Y, Wang D-S, Zhu M-Z, Zhang Q-H, Hu Y-Z, Pei J-M** (2005): Inhibition of hypoxia-induced proliferation and collagen synthesis by vasonatrin peptide in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Life Sci* 77(1): S. 28–38
163. **Luks AM, McIntosh SE, Grissom CK, Auerbach PS, Rodway GW, Schoene RB, Zafren K, Hackett PH** (2014): Wilderness Medical Society practice guidelines for the prevention and treatment of acute altitude illness: 2014 update. *Wilderness Environ Med* 25(4 Suppl): S. S4-14
164. **Lüllmann-Rauch R** (2012): Taschenlehrbuch Histologie, *10 Tabellen*, 4. Aufl. Thieme E-Book Library Studium & Lehre. Thieme, Stuttgart. ISBN: 978-3-13-129244-5
165. **MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES** (1997): Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272(41): S. 25417–25420
166. **Maggiorini M, Léon-Velarde F** (2003): High-altitude pulmonary hypertension: a pathophysiological entity to different diseases. *Eur Respir J* 22(6): S. 1019–1025
167. **Maggiorini M, Brunner-La Rocca H-P, Peth S, Fischler M, Böhm T, Bernheim A, Kiencke S, Bloch KE, Dehnert C, Naeije R, Lehmann T, Bartsch P, Mairbaurl H** (2006): Both tadalafil and dexamethasone may reduce the incidence of high-altitude pulmonary edema: a randomized trial. *AIM* 145(7): S. 497–506
168. **Majno G, Joris I** (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146(1): S. 3–15

169. **Mandegar M, Fung Y-CB, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX-J** (2004): Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res* 68(2): S. 75–103
170. **Marcus JT, Gan CT-J, Zwanenburg JJM, Boonstra A, Allaart CP, Gotte MJW, Vonk-Noordegraaf A** (2008): Interventricular mechanical asynchrony in pulmonary arterial hypertension: left-to-right delay in peak shortening is related to right ventricular overload and left ventricular underfilling. *J Am Coll Cardiol* 51(7): S. 750–757
171. **Marshall JD, Bazan I, Zhang Y, Fares WH, Lee PJ** (2018): Mitochondrial dysfunction and pulmonary hypertension: cause, effect, or both. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 314(5): S. L782-L796
172. **Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A** (1997): A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7(12): S. 1003–1006
173. **Martin D, Windsor J** (2008): From mountain to bedside: understanding the clinical relevance of human acclimatisation to high-altitude hypoxia. *Postgrad Med J* 84(998): S. 622-627
174. **Martindale JL, Wakai A, Collins SP, Levy PD, Diercks D, Hiestand BC, Fermann GJ, deSouza I, Sinert R** (2016): Diagnosing Acute Heart Failure in the Emergency Department: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acad Emerg Med* 23(3): S. 223–242
175. **Master S, Gottstein J, Blei AT** (1999): Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 30(4): S. 876–880
176. **Mathai SC, Hassoun PM** (2012): Pulmonary arterial hypertension in connective tissue diseases. *Heart Fail Clin* 8(3): S. 413–425
177. **McGoon M, Gutterman D, Steen V, Barst R, McCrory DC, Fortin TA, Loyd JE** (2004): Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 126(1 Suppl): S. 14S-34S

178. **McIlwain DR, Berger T, Mak TW** (2013): Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(4): S. a008656
179. **McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Bonnet S, Puttagunta L, Michelakis ED** (2005): Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 115(6): S. 1479–1491
180. **Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME** (1997): FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 16(10): S. 2794–2804
181. **Mellor A, Boos C, Holdsworth D, Begley J, Hall D, Lumley A, Burnett A, Hawkins A, O'Hara J, Ball S, Woods D** (2014): Cardiac Biomarkers at High Altitude. *High Alt Med Biol* 15(4): S. 452–458
182. **Micheau O** (2003): Cellular FLICE-inhibitory protein: an attractive therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets* 7(4): S. 559–573
183. **Mirrakhimov AE, Hill NS** (2014): Primary antiphospholipid syndrome and pulmonary hypertension. *Curr Pharm Des* 20(4): S. 545–551
184. **Mirrakhimov AE, Strohl KP** (2016): High-altitude Pulmonary Hypertension: an Update on Disease Pathogenesis and Management. *Open Cardiovasc Med J* 10: S. 19–27
185. **Mirrakhimov AE, Ali AM, Barbaryan A, Prueksaritanond S** (2013): Human Immunodeficiency Virus and Pulmonary Arterial Hypertension. *ISRN Cardiology* 2013: S. 11
186. **Miyashita T, Kawakami A, Nakashima T, Yamasaki S, Tamai M, Tanaka F, Kamachi M, Ida H, Migita K, Origuchi T, Nakao K, Eguchi K** (2004): Osteoprotegerin (OPG) acts as an endogenous decoy receptor in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of fibroblast-like synovial cells. *Clin Exp Immunol* 137(2): S. 430–436
187. **Mizutani Y, Hongo F, Sato N, Ogawa O, Yoshida O, Miki T** (2001): Significance of serum soluble Fas ligand in patients with bladder carcinoma. *Cancer* 92(2): S. 287–293

188. **Montgomery AB, Luce JM, Michael P, Mills J** (1989): Effects of dexamethasone on the incidence of acute mountain sickness at two intermediate altitudes. *JAMA* 261(5): S. 734–736
189. **Moore LE, Brennan P, Karami S, Menashe I, Berndt SI, Dong LM, Meisner A, Yeager M, Chanock S, Colt J, Schwartz K, Davis F, Zaridze D, Mattveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Holcatova I, Boffetta P, Chow W-H, Rosenberg PS, Rothman N** (2009): Apolipoprotein E/C1 locus variants modify renal cell carcinoma risk. *Cancer Res* 69(20): S. 8001–8008
190. **Moore LG** (2001): Human genetic adaptation to high altitude. *High Alt Med Biol* 2(2): S. 257–279
191. **Morrell NW W** (2001): Genetic and molecular mechanisms of pulmonary hypertension. *Clin Med (Lond)* (1): S. 138–145
192. **Motley HL, Cournand A** (1947): The influence of short periods of induced acute anoxia upon pulmonary artery pressures in man. *Am J Physiol* 150(2): S. 315–320
193. **Mukerjee D, St George D, Knight C, Davar J, Wells AU, Du Bois RM, Black CM, Coghlan JG** (2004): Echocardiography and pulmonary function as screening tests for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 43(4): S. 461–466
194. **Murray TR, Chen L, Marshall BE, Macarak EJ** (1990): Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3(5): S. 457–465
195. **Muza SR, Beidleman BA, Fulco CS** (2010): Altitude preexposure recommendations for inducing acclimatization. *High Alt Med Biol* 11(2): S. 87–92
196. **Naeije R** (2010): Physiological adaptation of the cardiovascular system to high altitude. *Prog Cardiovasc Dis* 52(6): S. 456–466
197. **Nagasaka Y, Bhattacharya J, Nanjo S, Gropper MA, Staub NC** (1984): Micropuncture measurement of lung microvascular pressure profile during hypoxia in cats. *Circ Res* 54(1): S. 90–95

198. **Nagata S** (1997): Apoptosis by death factor. *Cell* 88(3): S. 355–365
199. **Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Kakishita M, Fukushima K, Okano Y, Nakanishi N, Miyatake K, Kangawa K** (2000): Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 102(8): S. 865–870
200. **Negi PC, Marwaha R, Asotra S, Kandoria A, Ganju N, Sharma R, Kumar RV, Bhardwaj R** (2014): Prevalence of high altitude pulmonary hypertension among the natives of Spiti Valley--a high altitude region in Himachal Pradesh, India. *High Alt Med Biol* 15(4): S. 504–510
201. **Netzer N, Strohl K, Faulhaber M, Gatterer H, Burtscher M** (2013): Hypoxia-related altitude illnesses. *J Travel Med* 20(4): S. 247–255
202. **Netzer NC, Strohl KP** (1999): Sleep and Breathing in Recreational Climbers at an Altitude of 4200 and 6400 Meters: Observational Study of Sleep and Patterning of Respiration During Sleep in a Group of Recreational Climbers. *Sleep Breath* 3(3): S. 75–82
203. **Nicholson DW** (1999): Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6(11): S. 1028–1042
204. **Niessner A, Hohensinner PJ, Rychli K, Neuhold S, Zorn G, Richter B, Hülsmann M, Berger R, Mörtl D, Huber K, Wojta J, Pacher R** (2009): Prognostic value of apoptosis markers in advanced heart failure patients. *Eur Heart J* 30(7): S. 789–796
205. **Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M** (1993): Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 12(9): S. 3679–3684
206. **Oeing CU, Tschope C, Pieske B** (2016): The new ESC Guidelines for acute and chronic heart failure 2016. *Herz* 41(8): S. 655–663
207. **Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S** (1993): Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364(6440): S. 806–809

208. **Olschewski H, Hoepfer MM, Borst MM, Ewert R, Grünig E, Kleber F-X, Kopp B, Opitz C, Reichenberger F, Schmeisser A, Schranz D, Schulze-Neick I, Wilkens H, Winkler J, Worth H** (2006): Diagnostik und Therapie der chronischen pulmonalen Hypertonie. *Pneumologie* 60(12): S. 749–771
209. **Osorio LM, Aguilar-Santelises M, Santiago A de, Hachiya T, Mellstedt H, Jondal M** (2001): Increased serum levels of soluble Fas in progressive B-CLL. *Eur J Haematol* 66(5): S. 342–346
210. **Pak O, Aldashev A, Welsh D, Peacock A** (2007): The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. *Eur Respir J* 30(2): S. 364–372
211. **Pak O, Janssen W, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT, Weissmann N** (2010): Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. *Drug Discovery Today: Disease Models* 7(3-4): S. 89–97
212. **Palazzini M, Manes A, Negro L, Marinelli A, Leci E, Gambetti S, Bachetti C, Beciani E, Conficoni E, Branzi A, Galie N** (2009): Pulmonary arterial hypertension. Part I: pathobiologic, pathophysiologic, clinical and diagnostic aspects. *G Ital Cardiol (Rome)* 10(5): S. 271–300
213. **Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM** (1997): An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277(5327): S. 815–818
214. **Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM** (1997): The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276(5309): S. 111–113
215. **Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (Hrsg)** (op. 2018): *Physiologie*, 8. Aufl. Georg Thieme, Stuttgart, New York. ISBN: 978-3-13-242387-9
216. **Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G** (1999): Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 274(53): S. 38241–38250

217. **Parissis JT, Adamopoulos S, Antoniadou C, Kostakis G, Rigas A, Kyrzopoulos S, Iliodromitis E, Kremastinos D** (2004): Effects of levosimendan on circulating pro-inflammatory cytokines and soluble apoptosis mediators in patients with decompensated advanced heart failure. *Am J Cardiol* 93(10): S. 1309–1312
218. **Pasha MAQ, Newman JH** (2010): High-altitude disorders: pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest* 137(6 Suppl): S. 13S-19S
219. **Pei SX, Chen XJ, Si Ren BZ, Liu YH, Cheng XS, Harris EM, Anand IS, Harris PC** (1989): Chronic mountain sickness in Tibet. *Q J Med* 71(266): S. 555–574
220. **Penaloza D, Arias-Stella J** (2007): The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness. *Circulation* 115(9): S. 1132–1146
221. **Peng Y, Yang Z, Zhang H, Cui C, Qi X, Luo X, Tao X, Wu T, Ouzhuluobu, Basang, Ciwangsangbu, Danzengduojie, Chen H, Shi H, Su B** (2011): Genetic variations in Tibetan populations and high-altitude adaptation at the Himalayas. *Mol Biol Evol* 28(2): S. 1075–1081
222. **Peter ME, Krammer PH** (2003): The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10(1): S. 26–35
223. **Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, Ceppi P** (2015): The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* 22(4): S. 549–559
224. **Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A** (1996): Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271(22): S. 12687–12690
225. **Preston IR, Hill NS, Warburton RR, Fanburg BL** (2006): Role of 12-lipoxygenase in hypoxia-induced rat pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(2): S. L367-74
226. **Prindull G** (1995): Apoptosis in the embryo and tumorigenesis. *Eur J Cancer* 31A(1): S. 116–123

227. **Rabinovitch M** (1998): Elastase and the pathobiology of unexplained pulmonary hypertension. *Chest* 114(3 Suppl): S. 213S-224S
228. **Reinard T** (2018): *Molekularbiologische Methoden 2.0*, 2. Aufl. UTB Biologie, Molekularbiologie, Biochemie, Bd 8449. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart. ISBN: 9783825287429
229. **Ren H, Chen Z, Yang L, Xiong W, Yang H, Xu K, Zhai E, Ding L, He Y, Song X** (2019): Apolipoprotein C1 (APOC1) promotes tumor progression via MAPK signaling pathways in colorectal cancer. *Cancer Manag Res* 11: S. 4917–4930
230. **Renner MK, Lang I** (2010): Aktuelle Aspekte der Pulmonalen Hypertonie. *J. Kardiol.* 17(7-8): S. 293–299
231. **Renz-Polster H, Krautzig S (Hrsg)** (2012): *Basislehrbuch Innere Medizin*, 5. Aufl. Urban & Fischer in Elsevier, München. ISBN: 978-3-437-41114-4
232. **Rhodes J** (2005): Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease. *J Appl Physiol* 98(3): S. 1092–1100
233. **Rhodes CJ, Wharton J, Howard L, Gibbs JSR, Vonk-Noordegraaf A, Wilkins MR** (2011): Iron deficiency in pulmonary arterial hypertension: a potential therapeutic target. *Eur Respir J* 38(6): S. 1453–1460
234. **Richalet J-P, Rivera M, Bouchet P, Chirinos E, Onnen I, Petitjean O, Bienvenu A, Lasne F, Moutereau S, León-Velarde F** (2005): Acetazolamide: a treatment for chronic mountain sickness. *Am J Respir Crit Care Med* 172(11): S. 1427–1433
235. **Richalet J-P, Gratadour P, Robach P, Pham I, Déchaux M, Joncquiert-Latarjet A, Mollard P, Brugniaux J, Cornolo J** (2005): Sildenafil inhibits altitude-induced hypoxemia and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 171(3): S. 275–281
236. **Richalet J-P, Rivera-Ch M, Maignan M, Privat C, Pham I, Macarlupu J-L, Petitjean O, Leon-Velarde F** (2008): Acetazolamide for Monge's disease: efficiency and tolerance of 6-month treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 177(12): S. 1370–1376

237. **Richter MJ, Gall H, Tello K, Sommer N, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA** (2015): Medikamentöse Therapie der pulmonalen Hypertonie: Was ist neu? *Der Internist* 56(5): S. 573–582
238. **Rippo MR, Babini L, Prattichizzo F, Graciotti L, Fulgenzi G, Tomassoni Ardori F, Olivieri F, Borghetti G, Cinti S, Poloni A, Fazioli F, Procopio AD** (2013): Low FasL levels promote proliferation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, higher levels inhibit their differentiation into adipocytes. *Cell Death & Disease* 4: S. e594
239. **Robertson JD, Fadeel B, Zhivotovsky B, Orrenius S** (2002): 'Centennial' Nobel Conference on apoptosis and human disease. *Cell Death Differ* 9(4): S. 468–475
240. **Rosati JA, Yoneda KY, Yasmeen S, Wood S, Eldridge MW** (2005): Respiratory health and indoor air pollution at high elevation. *Arch Environ Occup Health* 60(2): S. 96–105
241. **Russo M, Mupo A, Spagnuolo C, Russo GL** (2010): Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 80(5): S. 674–682
242. **Safa AR, Day TW, Wu C-H** (2008): Cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 8(1): S. 37–46
243. **Safa AR** (2012): c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp Oncol* 34(3): S. 176–184
244. **Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA** (1999): Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 107(5): S. 489–506
245. **Saito Y, Nakao K, Itoh H, Yamada T, Mukoyama M, Arai H, Hosoda K, Shirakami G, Suga S, Minamino N** (1989): Brain natriuretic peptide is a novel cardiac hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 158(2): S. 360–368
246. **Saito Y, Nakamura K, Akagi S, Sarashina T, Ejiri K, Miura A, Ogawa A, Matsubara H, Ito H** (2015): Epoprostenol sodium for treatment of pulmonary arterial hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 11: S. 265–270

247. **Salvesen GS, Duckett CS** (2002): IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(6): S. 401–410
248. **Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S** (1999): Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 6(6): S. 495–496
249. **Sartori C, Allemann Y, Trueb L, Delabays A, Nicod P, Scherrer U** (1999): Augmented vasoreactivity in adult life associated with perinatal vascular insult. *The Lancet* 353(9171): S. 2205–2207
250. **Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH** (2001): Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem* 2(1): S. 20–29
251. **Sawka MN, Young AJ, Rock PB, Lyons TP, Boushel R, Freund BJ, Muza SR, Cymerman A, Dennis RC, Pandolf KB, Valeri CR** (1996): Altitude acclimatization and blood volume: effects of exogenous erythrocyte volume expansion. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 81(2): S. 636–642
252. **Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F** (2011): Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 8(8): S. 443–455
253. **Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F** (2005): Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 115(10): S. 2811–2821
254. **Schmidt RF, Lang F, Heckmann M** (2011): *Physiologie des Menschen, Mit Pathophysiologie*, 31. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-642-01650-9
255. **Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J** (1997): TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 7(6): S. 831–836
256. **Schoene RB, Hackett PH, Henderson WR, Sage EH, Chow M, Roach RC, Mills WJ, JR, Martin TR** (1986): High-altitude pulmonary edema. Characteristics of lung lavage fluid. *JAMA* 256(1): S. 63–69

257. **Schoene RB** (2005): Dexamethasone: by safe means, by fair means. *High Alt Med Biol* 6(4): S. 273–275
258. **Schoene RB** (2008): Illnesses at high altitude. *Chest* 134(2): S. 402–416
259. **Schoonman GG, Sandor PS, Nirkko AC, Lange T, Jaermann T, Dydak U, Kremer C, Ferrari MD, Boesiger P, Baumgartner RW** (2008): Hypoxia-induced acute mountain sickness is associated with intracellular cerebral edema: a 3 T magnetic resonance imaging study. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(1): S. 198–206
260. **Schünke M, Schulte E, Schumacher U (Hrsg)** (2012): *Prometheus Lernatlas der Anatomie*, 3. Aufl. Prometheus. Thieme, Stuttgart. ISBN: 978-3-13-139533-7
261. **Schwartz JT** (2014): Glucocorticoids recruit Tgfbr3 and Smad1 to shift transforming growth factor-beta signaling from the Tgfbr1/Smad2/3 axis to the Acvrl1/Smad1 axis in lung fibroblasts. [Inauguraldissertation], Justus-Liebig-Universität Gießen
262. **Schwenke DO, Pearson JT, Umetani K, Kangawa K, Shirai M** (2007): Imaging of the pulmonary circulation in the closed-chest rat using synchrotron radiation microangiography. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 102(2): S. 787–793
263. **Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JI** (1997): TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* 7(9): S. 693–696
264. **Secchiero P, Zerbinati C, Rimondi E, Corallini F, Milani D, Grill V, Forti G, Capitani S, Zauli G** (2004): TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cell Mol Life Sci* 61(15): S. 1965–1974
265. **Seheult RD, Ruh K, Foster GP, Anholm JD** (2009): Prophylactic bosentan does not improve exercise capacity or lower pulmonary artery systolic pressure at high altitude. *Respir Physiol Neurobiol* 165(2-3): S. 123–130
266. **Semenza GL** (2000): HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 88(4): S. 1474–1480

267. **Sime F, Peñaloza D, Ruiz L** (1971): Bradycardia, increased cardiac output, and reversal of pulmonary hypertension in altitude natives living at sea level. *Br Heart J* 33(5): S. 647–657
268. **Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing Z-C, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R** (2009): Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl): S. S43-54
269. **Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olshchewski H, Robbins IM, Souza R** (2013): Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62(25 Suppl): S. D34-41
270. **Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R** (2019): Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 53(1)
271. **Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Gudermann T, Schulz R, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N** (2008): Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J* 32(6): S. 1639–1651
272. **Song S, Choi K, Ryu S-W, Kang SW, Choi C** (2011): TRAIL promotes caspase-dependent pro-inflammatory responses via PKC $\delta$  activation by vascular smooth muscle cells. *Cell Death & Disease* 2(11): S. e223-e223
273. **Sorensen SC, Lassen NA, Severinghaus JW, Coudert J, Zamora MP** (1974): Cerebral glucose metabolism and cerebral blood flow in high-altitude residents. *J Appl Physiol* 37(3): S. 305–310
274. **Speckmann E-J** (2013): *Physiologie*, 6. Aufl. Urban & Fischer in Elsevier, München. ISBN: 978-3-437-41319-3
275. **Sperandio S, Belle I de, Bredesen DE** (2000): An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): S. 14376–14381
276. **Steiner MK, Preston IR** (2008): Optimizing endothelin receptor antagonist use in the management of pulmonary arterial hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 4(5): S. 943–952

277. **Stenmark KR, Gerasimovskaya E, Nemenoff RA, Das M** (2002): Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* 122(6 Suppl): S. 326S-334S
278. **Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG** (2006): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* 99(7): S. 675–691
279. **Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF** (2009): Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(6): S. L1013-32
280. **Stenmark KR, Frid MG, Graham BB, Tuder RM** (2018): Dynamic and diverse changes in the functional properties of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 114(4): S. 551–564
281. **Stiebellehner L, Frid MG, Reeves JT, Low RB, Gnanasekharan M, Stenmark KR** (2003): Bovine distal pulmonary arterial media is composed of a uniform population of well-differentiated smooth muscle cells with low proliferative capabilities. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(4): S. L819-28
282. **Stotz WH, Li D, Johns RA** (2004): Exogenous nitric oxide upregulates p21(waf1/cip1) in pulmonary microvascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 41(3): S. 211–219
283. **Strange G, Playford D, Stewart S, Deague JA, Nelson H, Kent A, Gabbay E** (2012): Pulmonary hypertension: prevalence and mortality in the Armadale echocardiography cohort. *Heart* 98(24): S. 1805–1811
284. **Su W-P, Sun L-N, Yang S-L, Zhao H, Zeng T-Y, Wu W-Z, Wang D** (2018): Apolipoprotein C1 promotes prostate cancer cell proliferation in vitro. *J Biochem Mol Toxicol*: S. e22158
285. **Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK** (2001): Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20(17): S. 2122–2133
286. **Sun Y, Zhang J, Guo F, Zhao W, Zhan Y, Liu C, Fan Y, Wang J** (2016): Identification of Apolipoprotein C-I Peptides as a Potential Biomarker and its Biological Roles in Breast Cancer. *Med Sci Monit* 22: S. 1152–1160

287. **Swenson ER** (2013): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *High Alt Med Biol* 14(2): S. 101–110
288. **Swenson ER, Bärtsch P (Hrsg)** (2014): High Altitude. Springer New York, New York, NY. ISBN: 978-1-4614-8771-5
289. **Swenson ER, Maggiorini M, Mongovin S, Gibbs JSR, Greve I, Mairbaurl H, Bartsch P** (2002): Pathogenesis of high-altitude pulmonary edema: inflammation is not an etiologic factor. *JAMA* 287(17): S. 2228–2235
290. **Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JPT** (2012): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* 92(1): S. 367–520
291. **Takano S, Yoshitomi H, Togawa A, Sogawa K, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Tomonaga T, Nomura F, Miyazaki M** (2008): Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 27(20): S. 2810–2822
292. **Tamm M, Bihl M, Eickelberg O, Stulz P, Perruchoud AP, Roth M** (1998): Hypoxia-induced interleukin-6 and interleukin-8 production is mediated by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor in primary human lung cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(4): S. 653–661
293. **Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S** (1995): Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 14(6): S. 1129–1135
294. **Tannheimer M, Fusch C, Boning D, Thomas A, Engelhardt M, Schmidt R** (2010): Changes of hematocrit and hemoglobin concentration in the cold Himalayan environment in dependence on total body fluid. *Sleep Breath* 14(3): S. 193–199
295. **Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM** (1995): Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81(5): S. 801–809
296. **Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL** (2018): Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ* 360: S. j5492

297. **Ting JP-Y, Willingham SB, Bergstralh DT** (2008): NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 8(5): S. 372–379
298. **Tissot van Patot MC, Leadbetter G, Keyes LE, Bendrick-Peart J, Beckey VE, Christians U, Hackett P** (2005): Greater free plasma VEGF and lower soluble VEGF receptor-1 in acute mountain sickness. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 98(5): S. 1626–1629
299. **Tsuchiya Y, Nakabayashi O, Nakano H** (2015): FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. *Int J Mol Sci* 16(12): S. 30321–30341
300. **Tsutsumi S, Kuwano H, Shimura T, Morinaga N, Mochiki E, Asao T** (2000): Circulating soluble Fas ligand in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 89(12): S. 2560–2564
301. **Tuder RM, Abman SH, Braun T, Capron F, Stevens T, Thistlethwaite PA, Haworth SG** (2009): Development and pathology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl): S. S3-9
302. **Udjus C, Cero FT, Halvorsen B, Behmen D, Carlson CR, Bendiksen BA, Espe EKS, Sjaastad I, Løberg EM, Yndestad A, Aukrust P, Christensen G, Skjøsberg OH, Larsen K-O** (2019): Caspase-1 induces smooth muscle cell growth in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 316(6): S. L999-L1012
303. **Ullenhag GJ, Mukherjee A, Watson NFS, Al-Attar AH, Scholefield JH, Durrant LG** (2007): Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 13(17): S. 5070–5075
304. **Valente G, Manfroi F, Peracchio C, Nicotra G, Castino R, Nicosia G, Kerim S, Isidoro C** (2006): cFLIP expression correlates with tumour progression and patient outcome in non-Hodgkin lymphomas of low grade of malignancy. *Br J Haematol* 132(5): S. 560–570
305. **Valnet-Rabier M-B, Challier B, Thiebault S, Angonin R, Margueritte G, Mouglin C, Kantelip B, Deconinck E, Cahn J-Y, Fest T** (2005): c-Flip protein expression in Burkitt's lymphomas is associated with a poor clinical outcome. *Br J Haematol* 128(6): S. 767–773

306. **van Osta A, Moraine J-J, Melot C, Mairbaur H, Maggiorini M, Naeije R** (2005): Effects of high altitude exposure on cerebral hemodynamics in normal subjects. *Stroke* 36(3): S. 557–560
307. **van Stry M, Kazlauskas A, Schreiber SL, Symes K** (2005): Distinct effectors of platelet-derived growth factor receptor-alpha signaling are required for cell survival during embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(23): S. 8233–8238
308. **Vantler M, Caglayan E, Zimmermann WH, Baumer AT, Rosenkranz S** (2005): Systematic evaluation of anti-apoptotic growth factor signaling in vascular smooth muscle cells. Only phosphatidylinositol 3'-kinase is important. *J Biol Chem* 280(14): S. 14168–14176
309. **Veith C, Zakrzewicz D, Dahal BK, Bálint Z, Murmann K, Wygrecka M, Seeger W, Schermuly RT, Weissmann N, Kwapiszewska G** (2014): Hypoxia- or PDGF-BB-dependent paxillin tyrosine phosphorylation in pulmonary hypertension is reversed by HIF-1 $\alpha$  depletion or imatinib treatment. *Thromb Haemost* 112(6): S. 1288–1303
310. **Vinnikov D, Blanc PD, Brimkulov N, Redding-Jones R** (2013): Five-year lung function observations and associations with a smoking ban among healthy miners at high altitude (4000 m). *J Occup Environ Med* 55(12): S. 1421–1425
311. **Vock P, Brutsche MH, Nanzer A, Bartsch P** (1991): Variable radiomorphologic data of high altitude pulmonary edema. Features from 60 patients. *Chest* 100(5): S. 1306–1311
312. **Vogel JA, Harris CW** (1967): Cardiopulmonary responses of resting man during early exposure to high altitude. *J Appl Physiol* 22(6): S. 1124–1128
313. **Wadsworth RM** (1994): Vasoconstrictor and vasodilator effects of hypoxia. *Trends in Pharmacological Sciences* 15(2): S. 47–53
314. **Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH** (1999): Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5(2): S. 157–163

315. **Wang W, Wang S, Song X, Sima N, Xu X, Luo A, Chen G, Deng D, Xu Q, Meng L, Lu Y, Ma D** (2007): The relationship between c-FLIP expression and human papillomavirus E2 gene disruption in cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 105(3): S. 571–577
316. **Wang S, Wang Y, Jiang J, Wang R, Li L, Qiu Z, Wu H, Zhu D** (2010): 15-HETE protects rat pulmonary arterial smooth muscle cells from apoptosis via the PI3K/Akt pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 91(1-2): S. 51–60
317. **Wang L, Yin J, Nickles HT, Ranke H, Tabuchi A, Hoffmann J, Tabeling C, Barbosa-Sicard E, Chanson M, Kwak BR, Shin H-S, Wu S, Isakson BE, Witzentrath M, Wit C de, Fleming I, Kuppe H, Kuebler WM** (2012): Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction. *J Clin Invest* 122(11): S. 4218–4230
318. **Waring P, Müllbacher A** (1999): Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol* 77(4): S. 312–317
319. **Warwick G, Thomas PS, Yates DH** (2008): Biomarkers in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 32(2): S. 503–512
320. **Waschke J, Böckers TM, Paulsen F (Hrsg)** (2015): *Anatomie, Das Lehrbuch: Sobotta*, 1. Aufl. Elsevier, Urban & Fischer, München. ISBN: 978-3-437-44080-9
321. **Waypa GB, Schumacker PT** (2005): Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 98(1): S. 404–414
322. **Weil JV, Byrne-Quinn E, Sodal IE, Filley GF, Grover RF** (1971): Acquired attenuation of chemoreceptor function in chronically hypoxic man at high altitude. *J Clin Invest* 50(1): S. 186–195
323. **Weir EK, Archer SL** (1995): The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J* 9(2): S. 183–189
324. **Weir EK, Archer SL** (2010): The role of redox changes in oxygen sensing. *Respir Physiol Neurobiol* 174(3): S. 182–191

325. **Weisel FC** (2012): Identifizierung und Charakterisierung molekularer Mechanismen vaskulärer Umbauprozesse bei pulmonaler Hypertonie. [Inauguraldissertation], Justus-Liebig-Universität Gießen
326. **Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T** (2006): Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50): S. 19093–19098
327. **Weissmann N, Sommer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F** (2006): Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 71(4): S. 620–629
328. **Welsch U, Deller T** (2011): Sobotta Lehrbuch Histologie, *Unter Mitarbeit von Thomas Deller*, 3. Aufl. Urban Fischer Verlag - Lehrbücher, München. ISBN: 978-3-437-44431-9
329. **Welsch U, Kummer W (Hrsg)** (2018): Histologie, *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch*, 5. Aufl. Elsevier, München. ISBN: 978-3-437-44434-0
330. **West JB** (2004): The physiologic basis of high-altitude diseases. *AIM* 141(10): S. 789–800
331. **West JB** (2012): High-altitude medicine. *Am J Respir Crit Care Med* 186(12): S. 1229–1237
332. **Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA** (1995): Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3(6): S. 673–682
333. **Wilkins MR, Ghofrani H-A, Weissmann N, Aldashev A, Zhao L** (2015): Pathophysiology and treatment of high-altitude pulmonary vascular disease. *Circulation* 131(6): S. 582–590

334. **Woo KV, Ornitz DM, Singh GK** (2019): Diagnosis and Pathophysiological Mechanisms of Group 3 Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 21(3): S. 16
335. **Wright AD** (2006): Medicine at high altitude. *Clin Med (Lond)* 6(6): S. 604–608
336. **Wu T, Kayser B** (2006): High altitude adaptation in Tibetans. *High Alt Med Biol* 7(3): S. 193–208
337. **Xu X-Q, Jing Z-C** (2009): High-altitude pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev* 18(111): S. 13–17
338. **Xu S, Li S, Yang Y, Tan J, Lou H, Jin W, Yang L, Pan X, Wang J, Shen Y, Wu B, Wang H, Jin L** (2011): A genome-wide search for signals of high-altitude adaptation in Tibetans. *Mol Biol Evol* 28(2): S. 1003–1011
339. **Yang C, Wang S, Liang T, Wang J, Wang K, Wang B** (2001): The roles of bcl-2 gene family in the pulmonary artery remodeling of hypoxia pulmonary hypertension in rats. *Chin Med Sci J* 16(3): S. 182–184
340. **Yang JY, Widmann C** (2001): Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP. *Mol Cell Biol* 21(16): S. 5346–5358
341. **Yi X, Liang Y, Huerta-Sanchez E et al** (2010): Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science* 329(5987): S. 75–78
342. **Yock PG, Popp RL** (1984): Noninvasive estimation of right ventricular systolic pressure by Doppler ultrasound in patients with tricuspid regurgitation. *Circulation* 70(4): S. 657–662
343. **You B, Liu Y, Chen J, Huang X, Peng H, Liu Z, Tang Y, Zhang K, Xu Q, Li X, Cheng G, Shi R, Zhang G** (2017): Vascular peroxidase 1 mediates hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, apoptosis resistance and migration. *Cardiovasc Res* 114(1): S. 188–199
344. **Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL** (1999): Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Invest* 103(5): S. 691–696

345. **Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, Yi ES, Platoshyn O, Thistlethwaite PA, Kriett JM, Yung G, Rubin LJ, Yuan JX-J** (2003): Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(3): S. L740-54
346. **Zhang W-H, Wang X, Narayanan M, Zhang Y, Huo C, Reed JC, Friedlander RM** (2003): Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26): S. 16012–16017
347. **Zhang J, Guo F, Wang L, Zhao W, Zhang D, Yang H, Yu J, Niu L, Yang F, Zheng S, Wang J** (2014): Identification of apolipoprotein C-I as a potential Wilms' tumor marker after excluding inflammatory factors. *Int J Mol Sci* 15(9): S. 16186–16195
348. **Zhang S, Liu B, Zhang B, Fan Z** (2015): The effect of survivin expression on the apoptosis and proliferation of hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 38(1): S. 45–49
349. **Zhang S, Liu B, Fan Z, Wang D, Liu Y, Li J, Wang N, Liu Y, Zhang B** (2016): Targeted inhibition of survivin with YM155 promotes apoptosis of hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells via the upregulation of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Mol Med Rep* 13(4): S. 3415–3422
350. **Zhang M, Xin W, Yu Y, Yang X, Ma C, Zhang H, Liu Y, Zhao X, Guan X, Wang X, Zhu D** (2020): Programmed death-ligand 1 triggers PSMCs pyroptosis and pulmonary vascular fibrosis in pulmonary hypertension. *J Mol Cell Cardiol* 138: S. 23–33



# Circulating Apoptotic Signals During Acute and Chronic Exposure to High Altitude in Kyrgyz Population

Djuro Kosanovic<sup>1,2</sup>, Simon Maximilian Platzek<sup>1</sup>, Aleksandar Petrovic<sup>1</sup>, Akylbek Sydykov<sup>1</sup>, Abdirashit Maripov<sup>3</sup>, Argen Mamazhakypov<sup>1</sup>, Meerim Sartmyrzaeva<sup>3</sup>, Kubatbek Muratali Uulu<sup>3</sup>, Meerim Cholponbaeva<sup>3</sup>, Aidana Toktosunova<sup>3</sup>, Nazgul Omurzakova<sup>3</sup>, Melis Duishobaev<sup>3</sup>, Christina Vroom<sup>1</sup>, Oleg Pak<sup>1</sup>, Norbert Weissmann<sup>1</sup>, Hossein Ardeschir Ghofrani<sup>1</sup>, Akpay Sarybaev<sup>3</sup> and Ralph Theo Schermuly<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Rodrigo Iturriaga,  
Pontificia Universidad Católica  
de Chile, Chile

### Reviewed by:

Vincent Joseph,  
Laval University, Canada  
Soumya Pati,  
Shiv Nadar University, India

### \*Correspondence:

Ralph Theo Schermuly  
ralph.schermuly@  
innere.med.uni-giessen.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Integrative Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

**Received:** 29 June 2018

**Accepted:** 17 January 2019

**Published:** 05 February 2019

### Citation:

Kosanovic D, Platzek SM, Petrovic A, Sydykov A, Maripov A, Mamazhakypov A, Sartmyrzaeva M, Muratali Uulu K, Cholponbaeva M, Toktosunova A, Omurzakova N, Duishobaev M, Vroom C, Pak O, Weissmann N, Ghofrani HA, Sarybaev A and Schermuly RT (2019) Circulating Apoptotic Signals During Acute and Chronic Exposure to High Altitude in Kyrgyz Population. *Front. Physiol.* 10:54. doi: 10.3389/fphys.2019.00054

<sup>1</sup> Chair for Pulmonary Pharmacotherapy, Member of the German Center for Lung Research, Universities of Giessen and Marburg Lung Center, Giessen, Germany, <sup>2</sup> Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <sup>3</sup> Kyrgyz National Centre for Cardiology and Internal Medicine, named after Academician Mirsaid Mirrakhimov, Bishkek, Kyrgyzstan

**Background:** Circulating apoptotic signals (CASs) have been described in the pathologies associated with dysregulated apoptosis, such as cancer, heart diseases, and pulmonary hypertension (PH). However, nothing is known about the expression profiles of these markers in the circulation of humans exposed to acute and chronic effects of high altitude (HA).

**Methods:** Gene expression levels of different apoptotic signals (ASs) were analyzed in human pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) upon hypoxia incubation. In addition, we measured the plasma values of relevant CAS in Kyrgyz volunteers during acute and chronic exposure to HA. Finally, we analyzed the effects of pro-apoptotic mediator Fas ligand (FasL) on apoptosis and proliferation of human PASMCs.

**Results:** Several cellular AS were increased in PASMCs exposed to hypoxia, in comparison to normoxia condition. Among analyzed CAS, there was a prominent reduction of FasL in lowlanders exposed to HA environment. Furthermore, decreased circulatory levels of FasL were found in highlanders with HA-induced PH (HAPH), as compared to the lowland controls. Furthermore, FasL concentration in plasma negatively correlated with tricuspid regurgitant gradient values. Finally, FasL exerted pro-apoptotic and anti-proliferative effects on PASMCs.

**Conclusion:** Our data demonstrated that circulating levels of FasL are reduced during acute and chronic exposure to HA environment. In addition, dysregulated FasL may play a role in the context of HAPH due to its relevant functions on apoptosis and proliferation of PASMCs.

**Keywords:** high altitude, circulating apoptotic markers, Fas ligand, hypoxic pulmonary hypertension, pulmonary artery smooth muscle cells

## INTRODUCTION

High altitude is a well-known extreme environment characterized by hypoxia, among other abiotic factors, and may exert prominent acute and chronic effects on respiratory and cardiovascular systems (Maggiorini and Leon-Velarde, 2003; West, 2012; Mirrakhimov and Strohl, 2016). An important part of the human population inhabits high altitudes of our planet and a large number of people visit these elevations periodically due to several reasons (Mirrakhimov and Strohl, 2016; Azad et al., 2017). Short-term exposure of non-acclimatized people to high altitude may provoke the appearance of several acute mountain disorders, including acute mountain sickness and high-altitude pulmonary edema (West, 2012). Long-term exposure to this challenging external surrounding may lead to development of high altitude-induced pulmonary hypertension (HAPH), which is a pathological condition currently classified in the group 3 of pulmonary hypertension (PH) (Maggiorini and Leon-Velarde, 2003; Simonneau et al., 2013; Mirrakhimov and Strohl, 2016).

In general, pulmonary vascular remodeling as the main attribute of PH pathology appears due to significant dysregulation of normal processes in the pulmonary vascular cells, such as proliferation and apoptosis (Schermuly et al., 2011; Malczyk et al., 2016; Stenmark et al., 2018; Thenappan et al., 2018). Abnormal regulation of apoptosis and occurrence of “apoptotic-resistant” phenotype in pulmonary vascular cells, such as pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs), are important hallmarks of hypoxia-induced PH pathogenesis (Yang et al., 2001; Chen et al., 2014; Li et al., 2017; You et al., 2018). Due to the existence of these cellular abnormalities, e.g., increased proliferation and resistance to apoptosis, PH is often described as a “tumor-like disease” in recent years (Chan and Rubin, 2017; Marshall et al., 2018). However, despite clear advancement in understanding of the role of apoptosis in hypoxia-associated PH and PH in general, many questions remain unresolved and insufficiently investigated.

A disbalance between pro- and anti-apoptotic molecular pathways has been described as an important phenomenon in the cancer field (Holdenrieder and Stieber, 2004). In addition to the general pathobiology of cellular apoptosis, several circulating apoptotic signals (CASs) have been evaluated as promising biomarkers relevant to the tumor pathologies (Holdenrieder and Stieber, 2010). In the field of cardiovascular diseases, some of the apoptotic markers have been also identified in the blood circulation (Parissis et al., 2004; Niessner et al., 2009). With regard to the pulmonary vascular disease, it has been demonstrated that the levels of CASs, namely Fas ligand (FasL) and tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), are changed in response to therapy or altered in patients with PH, respectively (Akagi et al., 2013; Liu et al., 2015). However, almost nothing is known about the profiles of circulating apoptotic markers in the context of human individuals exposed to high altitude hypoxic condition.

Therefore, we investigated for the first time the potential changes in the plasma levels of different apoptotic signals, including FasL, TRAIL and apolipoprotein C1 (ApoC1), in human individuals who live permanently in high altitude

regions and lowland subjects who spent a short period of time in such environment. Finally, the potential alteration in gene expression profile of various apoptotic players, for example caspase (Casp) 1 and 3, survivin, Fas-associated death domain protein (FADD)-like ICE inhibitory protein (FLIP), ApoC1, TRAIL and FasL, was analyzed in human PASMCs exposed to hypoxia for different time durations.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Design

In order to analyze the circulating profiles of various apoptotic markers during acute and chronic exposure to high altitude hypoxia, we have performed two studies among the Kyrgyz population.

First, for the purpose of investigating the people permanently living at high altitude environment, we have selected the human community of Sary-Mogol and Achyk-Suu villages, which are located in Alay and Chon-Alay districts of the province of Osh in the southern part of Kyrgyzstan. These villages are settled at altitudes of 3000–3100 m, but the most of the residents usually spend 3–4 months per year at even higher elevations (3200–3600 m). Importantly, we ensured that all subjects enrolled in the study were ethnic Kyrgyz and were born and permanently living at high altitudes. As the lowland control, we have included the volunteers from Bishkek, Kyrgyzstan (approximately 760 m above the sea level). All participants of the study underwent the general anthropometric and echocardiographic measurements (please see below), followed by collection of the peripheral blood and separation of the citrated platelet free plasma (PPF).

Secondly, for the purpose of investigating the people acutely exposed to high altitude hypoxia, we had a group of healthy Kyrgyz males. Initially, the subjects underwent examination in Bishkek (low altitude (LA 1) at 760 m, with the outside temperature ranging from 28 to 35°C during the study execution). After that, the participants were transported by road to an altitude of 3200 m (Tuya-Ashuu pass, Kyrgyzstan) (Figure 1), where the outside temperature was in the range 5–20°C, while inside the rooms in the research station the temperature was maintained at 22 ± 2°C. The first 2 days after arrival to high altitude environment the subjects took



**FIGURE 1** | High altitude research station near to the Tuya-Ashuu pass (3200 m), Kyrgyzstan. The photograph is original work of one of the authors.

complete rest. During the next 2 days they were allowed to walk at plains and downhill. Thereafter, the participants were involved in common activities, such as indoor games, watching TV, playing table tennis or billiard, along with morning drill, walking and other galley duties. Importantly, all subjects were free of cardiac or neurological problems and were not consuming any kind of medications. In addition to the basal examination in Bishkek (LA 1) at low altitude, all individuals underwent echocardiographic measurements, followed by the collection of the peripheral blood and separation of the EDTA plasma on days 2 (HA 2), 7 (HA 7), and 20 (HA 20) of high altitude exposure, and on the second day after descent to Bishkek at low altitude again (LA 2). In addition, anthropometry was performed in all participants.

Both studies protocols were approved by the Ethics Committees of the National Centre for Cardiology and Internal Medicine, Bishkek, Kyrgyzstan (01-1/08 and 01-1/07) and the faculty of Medicine at Justus-Liebig University, Giessen, Germany (AZ: 236/16). The study was performed in agreement to the principles outlined in the Declaration of Helsinki of the World Medical Association. Finally, written informed consent was obtained from all participants.

### Anthropometric and Echocardiographic Measurements

Several general parameters were obtained, such as age, gender ratio, body mass index (BMI), and body surface area (BSA). BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) was calculated using the formula:  $\text{BMI} = \text{weight} (\text{kg})/(\text{height} (\text{m})^2)$ . BSA ( $\text{m}^2$ ) was calculated using the Du Bois formula as follows:  $\text{BSA} = 0.007184 \times [(\text{height} (\text{m}) \times 100)^{0.725} \times (\text{weight} (\text{kg})^{0.425})]$ . The right ventricular to right atrial pressure gradient was used as a surrogate of the estimated systolic pulmonary artery pressure. Continuous-wave Doppler echocardiography was employed to estimate the tricuspid regurgitant gradient (TRG, in mmHg) from the peak flow tricuspid regurgitation velocity by means of the simplified Bernoulli equation measured using continuous-wave Doppler, as previously described (Yock and Popp, 1984). All the above mentioned parameters are presented in the **Table 1** (acute high altitude exposure) and **Table 2** (chronic exposure to high altitude). In the case of acute high altitude study, all general parameters, including age, gender, BMI, and BSA were comparable among all participants (**Table 1**). TRG values were initially increased on the second day (HA 2) of high altitude

**TABLE 2** | Chronic exposure to high altitude – human subjects' anthropometric and echocardiographic data.

	Age (years)	Gender ratio m/f (%)	BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	BSA ( $\text{m}^2$ )	TRG (mmHg)
LA	20.6 ± 2.9	100/0	23.1 ± 1.6	1.9 ± 0.1	20.9 ± 1.6
HA	50.5 ± 11.3	60/40	23.9 ± 4.0	1.7 ± 0.1	20.7 ± 0.4
HA-PH	53.1 ± 14.6	42/58	25.5 ± 5.3	1.7 ± 0.1	46.7 ± 6.0 <sup>*****§§§§</sup>

Adult human subjects permanently living at lowland regions (LA) ( $n = 10$ ) and high altitude (HA) locations were included for the study. Individuals settled at high altitude regions were separated into two groups: highlanders without pulmonary hypertension (PH) (HA) ( $n = 10$ ) and highlanders with PH (HA-PH) ( $n = 12$ ). Various anthropometric and echocardiographic parameters were presented. Results are shown as Mean ± SD ( $n = 10-12$ ). <sup>\*\*\*\*</sup> $p < 0.0001$  LA compared to the HA-PH; <sup>§§§§</sup> $p < 0.0001$  HA compared to the HA-PH. one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test was performed for statistical analysis. m, male; f, female; BMI, body mass index ( $\text{in kg}/\text{m}^2$ ); BSA, body surface area ( $\text{in m}^2$ ); TRG, tricuspid regurgitant gradient ( $\text{in mmHg}$ ).

exposure in comparison to the lowlands (LA 1), and later gradually decreased until return to the low altitude (LA 2) (**Table 1**). There were statistically significant elevations of TRG on the days 2 and 7 at high altitude, as compared to the lowland conditions (LA 1) (**Table 1**). Also, there was a significant increase of TRG values on the day 2 of high altitude exposure, in comparison to the low altitude upon return (LA 2) (**Table 1**).

In the case of chronic exposure to high altitude (**Table 2**), BMI and BSA were comparable among all 3 groups: lowland control subjects (LA), highlanders without (HA;  $\text{TRG} \leq 23 \text{ mmHg}$ ) and with PH (HA-PH;  $\text{TRG} \geq 40 \text{ mmHg}$ ). However, there were noticeable differences in gender ratio and age (lowland control group consisted only of younger males). This fact is a potential limitation of our study. TRG values were significantly increased in highlanders with PH, as compared to the lowland controls and highlanders without PH (**Table 2**).

### Cell Culture and RT-qPCR

Primary human PASMCs were purchased from Lonza and cultured in Smooth Muscle Growth Medium-2 containing supplement-mix. Human PASMCs passage 7 were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  in either normoxic (21%  $\text{O}_2$ ) or hypoxic conditions (1%  $\text{O}_2$ ) for a period of 24, 48, and 72 h. Upon the end of the incubation period cells were lysed in RLT buffer (Qiagen) and total cell RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Complementary DNA (cDNA)

**TABLE 1** | Acute exposure to high altitude – human subjects' anthropometric and echocardiographic data.

Age (years)	Gender Ratio m/f(%)	BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	BSA ( $\text{m}^2$ )	TRG (mmHg)				
				LA1	HA 2	HA 7	HA 20	LA 2
25.4 ± 4.2	100/0	23.0 ± 1.9	1.8 ± 0.1	18.5 ± 1.1	23.0 ± 2.2 <sup>***§§</sup>	20.9 ± 0.8*	19.5 ± 1.6	18.4 ± 1.1

Adult human subjects who initially came from the lowlands (LA 1) ( $n = 8$ ) were exposed to high altitude (HA) for 2 (HA 2) ( $n = 8$ ), 7 (HA 7) ( $n = 8$ ), and 20 (HA 20) ( $n = 8$ ) days. After 20 days, they returned to the lowlands again (LA 2) ( $n = 8$ ). Various anthropometric and echocardiographic parameters at different time points were presented in the table. Results are shown as Mean ± SD ( $n = 8$ ). <sup>\*</sup> $p < 0.05$ ; <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  compared to the LA 1. <sup>§§</sup> $p < 0.01$  compared to the LA 2. Friedman test with Dunn's multiple comparisons test was performed for statistical analysis. m, male; f, female; BMI, body mass index ( $\text{in kg}/\text{m}^2$ ); BSA, body surface area ( $\text{in m}^2$ ); TRG, tricuspid regurgitant gradient ( $\text{in mmHg}$ ).

**TABLE 3** | Primer sequences are given from (5' to 3').

Target	FP	RP
Human ApoC1	AGC AAG GAT TCA GAG TGC CCC	CCT TCA GCT TAT CCA AGG CAC TG
Human Casp1	TGG GAC TCT CAG CAG ATC AAA CA	GGA TGT GGG CAT AGC TGG GT
Human Casp3	GTA GAA GAG TTT CGT GAG TGC TCG	GCA CAC CCA CCG AAA ACC AG
Human FasL	GGA GAA GCA AAT AGG CCA CCC	CCA GAG GCA TGG ACC TTG AGT
Human FLIP	CGG ACT ATA GAG TGC TGA TGG CA	TCC AAC TCA ACC ACA AGG TCC A
Human survivin	AAA GAG CCA AGA ACA AAA TTG C	GAG AGA GAA GCA GCC ACT GTT AC
Human TRAIL	TCC GTC AGC TCG TTA GAA AGA TGAT	GGT CCC AGT TAT GTG AGC TGC
Human porphobilinogen deaminase (PBGD)	CCC ACG CGA ATC ACT CTC AT	TGT CTG GTA ACG GCA ATG CG

FP, forward primer; RP, reverse primer.

was produced by reverse transcriptase polymerase chain reaction via iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Real-time PCR was performed in Mx3000P qPCR system (Stratagene) using the iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Primer sequences are given from (5' to 3') and presented in the Table 3. Human porphobilinogen deaminase (PBGD) served as a housekeeping gene. In order to confirm specific amplification of the expected PCR product, gel electrophoresis and melting curve analysis were performed.

### Apoptosis and Proliferation Assays

For assessment of apoptosis, human PSMCs (3000 cells per well) were seeded in 96-well white-walled plate in Smooth Muscle Growth Medium-2. After 48 h of recovery time cells were stimulated with different concentrations of SuperFasLigand (Enzo Life Sciences) and incubated at 37°C in water saturated incubators for 24 h under normoxic conditions (21% O<sub>2</sub>). The apoptosis Caspase-Glo 3/7 assay (Promega) was performed following the manufacturer's instructions. The luminescence of the caspase cleaved substrate reaction was measured after 30 min of incubation at room temperature.

Proliferation of human PSMCs exposed to normoxic (21% O<sub>2</sub>) or hypoxic conditions (1% O<sub>2</sub>) was assessed by Cell Proliferation ELISA, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay (Sigma Aldrich). In more details, 7500 cells per well were seeded into 24-well plates and following the 24 h starvation period PSMCs were incubated for 24 or 48 h in Smooth Muscle Growth Medium-2. After that the cells were treated with different concentrations of SuperFasLigand or 500 ng/ml of neutralizing anti-Fas antibody ZB4 (Millipore). In addition, PSMCs were incubated for 48 h in Smooth Muscle Basal Medium and stimulated with 50 ng/ml of platelet-derived growth factor (PDGF) (R&D Systems) and/or 500 ng/ml of neutralizing anti-Fas antibody ZB4. The absorbance of the substrate reaction was measured at 370 nm (reference wavelength 492 nm).

### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Citrated platelet free plasma (PFP) or EDTA plasma samples were obtained from the peripheral blood from all participants of the study. In order to analyze the circulating levels of different markers, several ELISA measurements were performed for the following targets (ELISA kits): ApoC1 (Abnova), TRAIL (R&D Systems), FasL (LSBio/R&D Systems) and B-type natriuretic peptide (BNP) (Abnova). The concentrations of the markers were expressed as µg or pg per mL of plasma.

### Data Analysis

Results are presented as Mean ± SD. Unpaired *t*-test with Welch's correction or ordinary one-way ANOVA with Dunnett's or Tukey's multiple comparisons test were used to compare data derived from the cell culture. Data based on ELISA and echocardiographic measurements were analyzed using Friedman test with Dunn's multiple comparisons test, RM one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test or ordinary one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Spearman or Pearson tests were used for the correlation analysis. Statistical significance was considered when *p*-value was < 0.05, < 0.01, < 0.001, and < 0.0001.

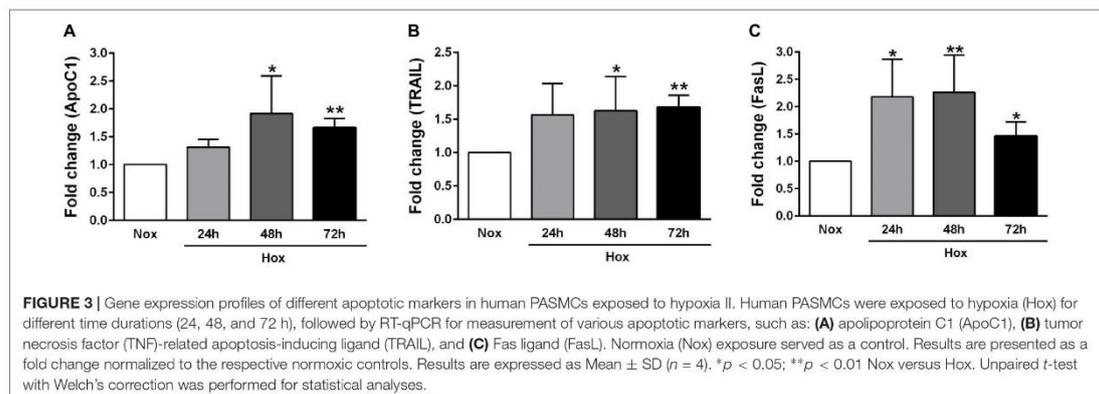
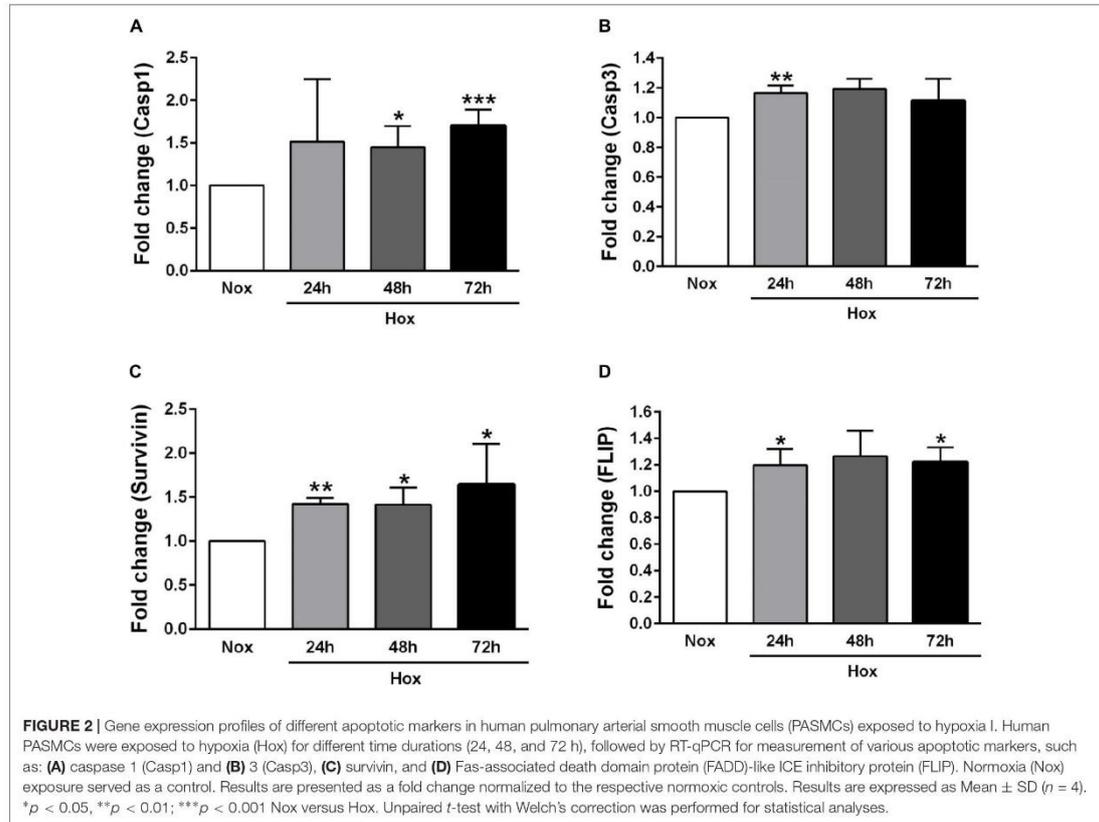
## RESULTS

### Alteration in the Gene Expression Levels of Various Apoptotic Markers in Human PSMCs After Hypoxic Incubation

As already described in Section "Materials and Methods," human PSMCs were exposed to hypoxia condition for different time durations (24, 48, and 72 h), followed by quantification of the gene expression levels of various apoptotic markers, such as Casp1 and 3, survivin, FLIP, ApoC1, TRAIL, and FasL (Figures 2, 3). In general, all investigated apoptotic signals had increased their expression profiles upon hypoxic stimuli in human PSMCs (Figures 2, 3), as compared to the normoxia condition. However, there were no clear and uniform time-dependent changes in the expression profiles of investigated apoptotic markers. The most prominent and statistically significant upregulation was noticed in the case of survivin and FasL, during all time points of hypoxia exposure, in comparison to the respective normoxic controls (Figures 2C, 3C).

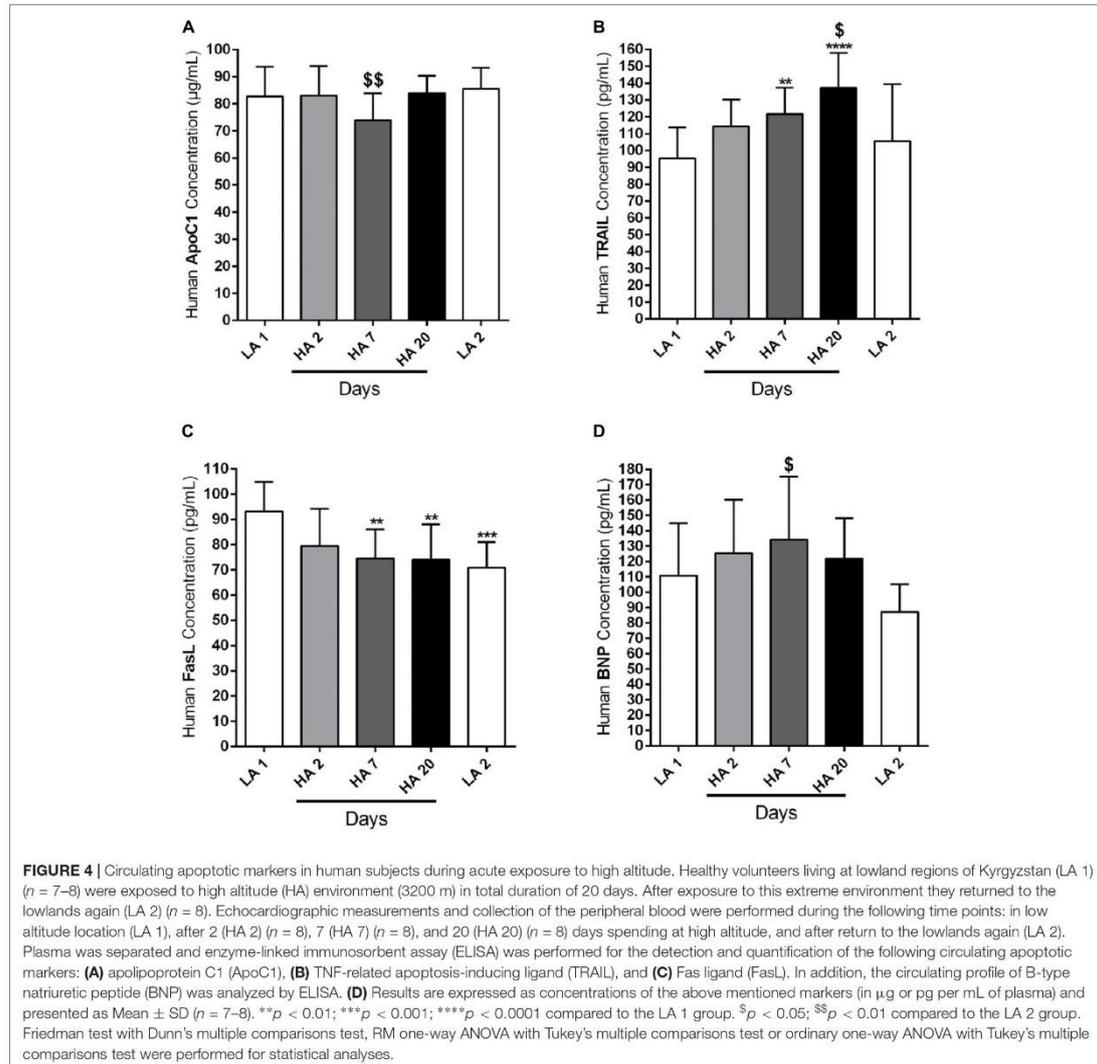
### Circulating Profiles of Apoptotic Markers in Human Subjects Exposed to Acute High Altitude Conditions

We have already mentioned in the Section "Materials and Methods" that circulating levels of different apoptotic markers, such as ApoC1, TRAIL and FasL, were measured by ELISA in the plasma samples of human volunteers taken at different time points: in the lowland conditions (LA 1), on days 2 (HA 2), 7 (HA 7), and 20 (HA 20) of high altitude exposure, and



after return to the low altitude (LA 2). In addition, ELISA was performed in the plasma samples during the same time points in order to analyze the level of circulating BNP. Investigated circulating apoptotic markers had different expression profiles and due to the technical reasons not all values for all enrolled

subjects are available. Apo C1 circulating levels (in  $\mu\text{g/mL}$ ) were comparable among different time points, except on day 7 (HA 7) of high altitude exposure, when the levels of this marker were significantly decreased in comparison to the low altitude upon descent from the high altitude (Figure 4A). Further, circulating

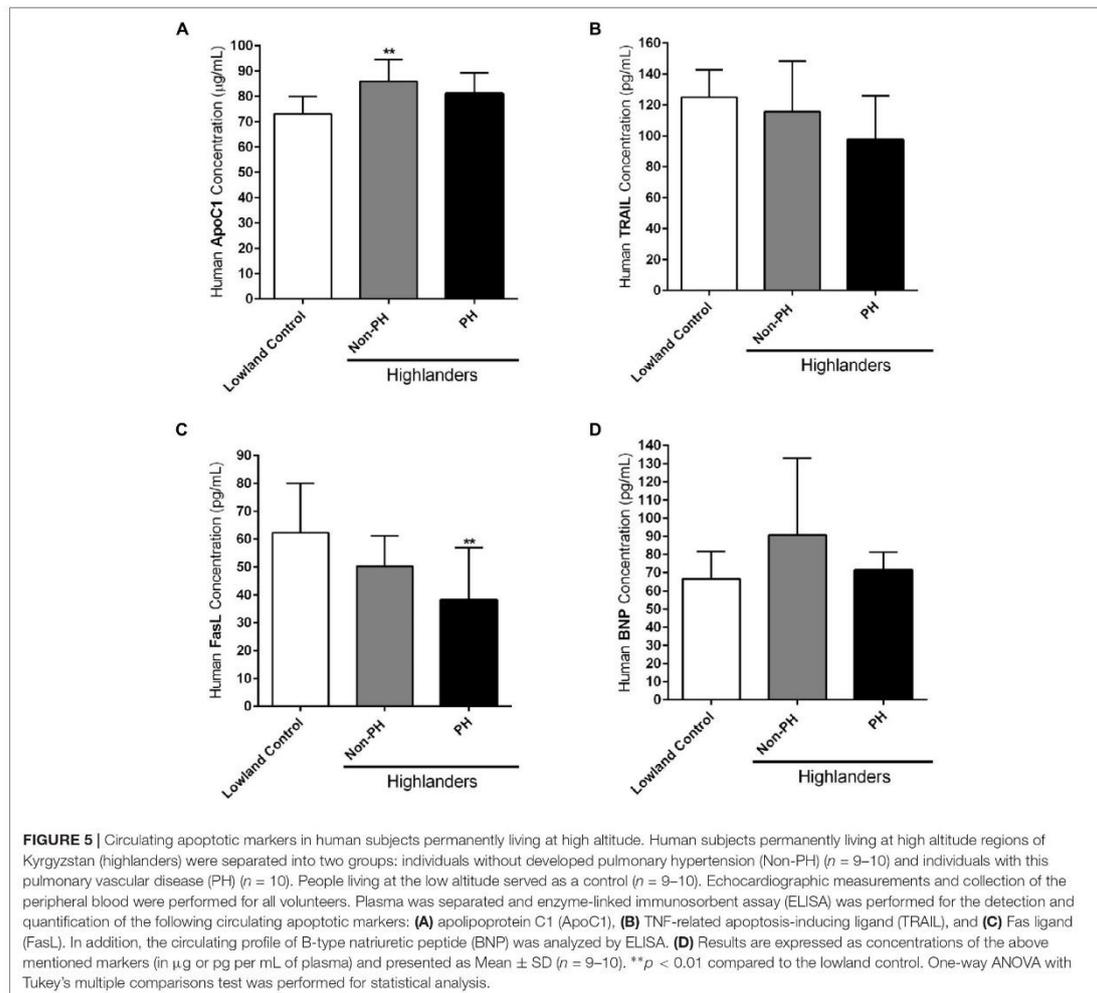


levels of TRAIL (in  $\text{pg/mL}$ ) were gradually increasing due to high altitude exposure, with being significantly enhanced on days 7 (HA 7) and 20 (HA 20), in comparison to the lowland conditions (LA 1) (Figure 4B). After returning to the lowlands again, there was a significant decrease of circulating TRAIL levels (Figure 4B). In the case of FasL (in  $\text{pg/mL}$ ), there was clear, but not time-dependent reduction of the circulating levels of this marker in high altitude conditions, as compared to the lowlands (LA 1) (Figure 4C). Surprisingly, decreased levels of circulating FasL were kept upon return to the low altitude (Figure 4C). Finally, there was a noticeable trend of increased levels of circulating BNP (in  $\text{pg/mL}$ ) during different time points at high altitude, with

prominent reduction upon return to the lowlands (Figure 4D). However, the significant difference was present only between the circulating levels of this marker on day 7 (HA 7) and the second low altitude condition (LA 2) (Figure 4D).

### Circulating Profiles of Apoptotic Markers in Kyrgyz Highlanders and Lowlanders

As already indicated in the Section "Materials and Methods," circulating levels of different apoptotic markers, such as ApoC1, TRAIL and FasL, were measured by ELISA in the plasma samples of human subjects permanently living at high altitudes,

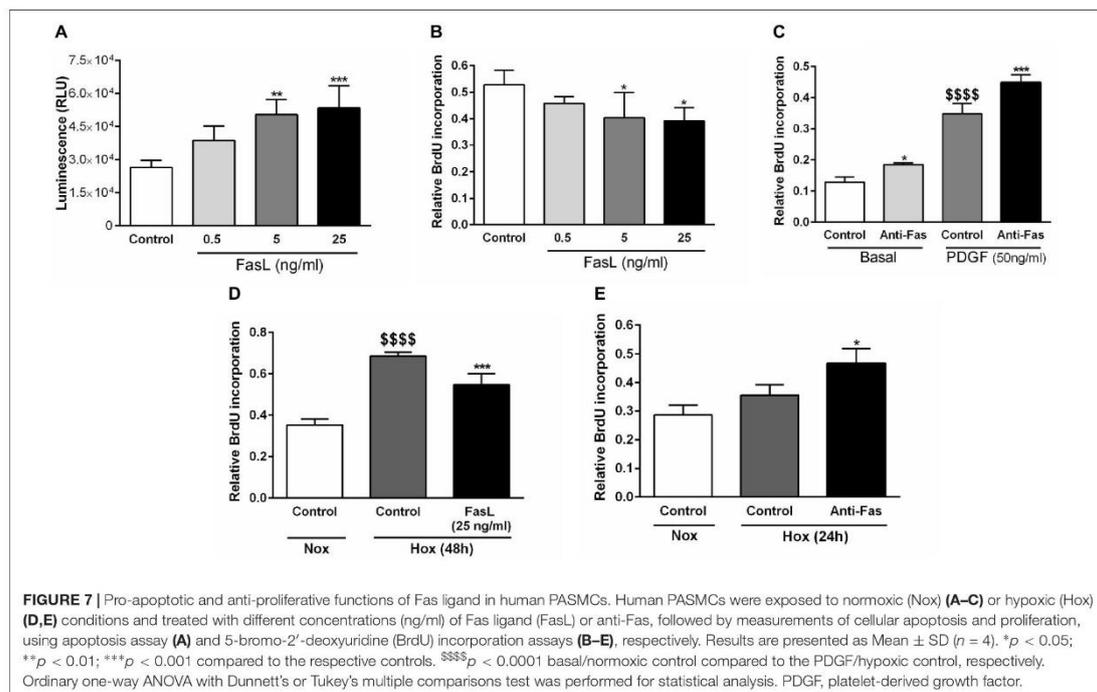
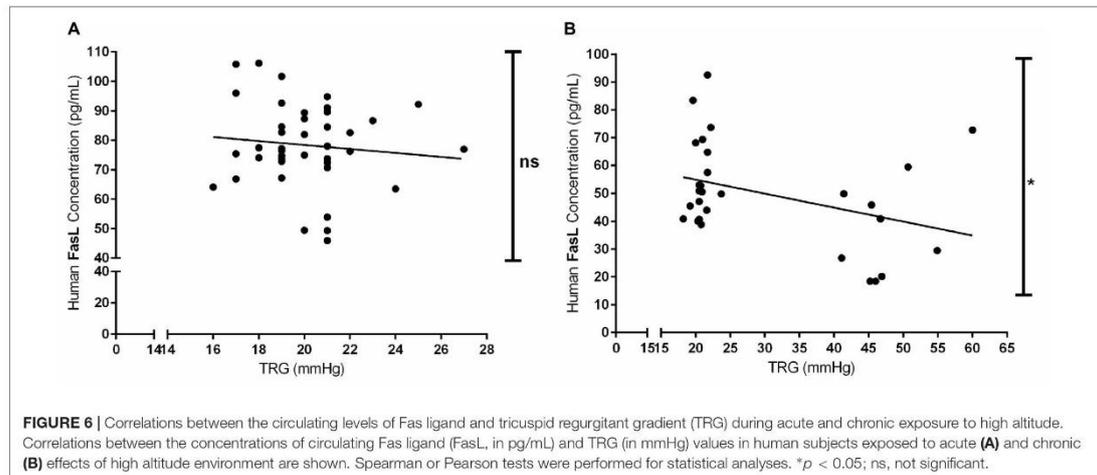


in comparison to the people settled in the lowland locations (Lowland Control). Highlanders were further divided into two groups, those who developed PH (PH) and those who did not develop this pulmonary vascular disease (Non-PH). In addition, ELISA was performed in the plasma samples of these three groups, in order to analyze the level of circulating BNP. Due to the technical reasons not all values for all enrolled subjects are available. ApoC1 circulating levels (in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were increased in both highlander groups, with being statistically significant in the case of highlanders without PH, in comparison to the lowland controls (Figure 5A). TRAIL circulating profile (in  $\text{pg}/\text{mL}$ ) did not reveal significant changes among groups, however, there was a trend of reduction in the level of this marker in highlanders with PH, as compared to the people living at low altitude (Figure 5B). Further, there was a visible decrease in the circulating levels of

FasL (in  $\text{pg}/\text{mL}$ ) in both highlander groups, with statistically significant alteration in highlanders with PH, in comparison to the lowland control (Figure 5C). Finally, there were no significant changes in the context of BNP (in  $\text{pg}/\text{mL}$ ) among different groups (Figure 5D). Surprisingly, there was a trend of elevated levels of circulating BNP in highlanders without PH, as compared to other two groups (Figure 5D).

### Circulating FasL Levels Negatively Correlate With TRG Values in Kyrgyz Population

Furthermore, we have investigated the correlation between the circulating levels of FasL ( $\text{pg}/\text{mL}$ ) in both acute and chronic exposure of Kyrgyz volunteers with TRG values (Figure 6).



Although there was a slight trend, there was no significant correlation between these two parameters in human subjects exposed acutely to high altitude environment (Figure 6A). However, there was a significant negative correlation between circulating levels of FasL and TRG in permanent residents of lowlands and highlands in investigated Kyrgyz population (Figure 6B).

### FasL Exerts Pro-apoptotic and Anti-proliferative Effects in Human PSMCs

Finally, we have analyzed the relevant cellular functions of FasL in human PSMCs, such as apoptosis and proliferation (Figure 7). We have found that different concentrations

(5 and 25 ng/ml) of FasL significantly increased apoptosis of PSMCs (Figure 7A). Furthermore, the same concentrations of this ligand significantly reduced the proliferation of PSMCs under normoxic conditions (Figure 7B). In addition, anti-Fas enhanced the cellular proliferation under the basal conditions as well as during the stimulation with PDGF (Figure 7C). PSMCs were also exposed to hypoxic conditions (Figures 7D,E) and FasL (25 ng/ml) significantly decreased the proliferation of these cells (Figure 7D). Finally, anti-Fas resulted in augmentation of the PSMCs proliferation (Figure 7E). Clearly, FasL demonstrates pro-apoptotic and anti-proliferative properties in human PSMCs.

## DISCUSSION

In general, the findings of our study revealed that:

- (1) There was a prominent enhancement in gene expression of various apoptotic players in human PSMCs exposed to hypoxia condition,
- (2) There were differential changes in investigated circulating apoptotic markers during acute and chronic exposure to high altitude in humans, with the most uniform alteration in FasL,
- (3) FasL levels in plasma negatively correlated with TRG values in Kyrgyz population permanently settled in low and high altitudes, and,
- (4) FasL exerted pro-apoptotic and anti-proliferative functions in human PSMCs.

Cellular apoptosis is an important, complicate and complex process (Sartorius et al., 2001). Under various stimuli, caspases may activate and perform the apoptosis (Sartorius et al., 2001). Results of our study demonstrated an augmentation in gene expression of Casp 1 and 3 after the hypoxia incubation in PSMCs. Despite the fact that PH in general is characterized by "apoptosis-resistant" events, the increase in Casp3 expression was found in the lungs of monocrotaline model and the interpretation has to be taken with caution, since there are also some evidences that caspases may even exert anti-apoptotic features (Sartorius et al., 2001; Yang and Widmann, 2001; Le Goff et al., 2012; Hong et al., 2014).

With regard to other apoptotic players, our study indicated an increase in gene expression profiles of ApoC1, FLIP, and survivin in PSMCs exposed to hypoxia, in comparison to the respective normoxic controls. The literature suggested that ApoC1, FLIP, and survivin are generally considered as anti-apoptotic signals in different conditions (Sartorius et al., 2001; Takano et al., 2008; Portt et al., 2011; Fan et al., 2015; Zhang et al., 2015, 2016). Importantly, survivin is well-investigated in the context of hypoxia-induced PH and our data are in line with the literature sources (Fan et al., 2015; Zhang et al., 2015, 2016).

In the case of TRAIL and FasL, we have shown a noticeable increase in the gene expression for both targets during the hypoxic exposure of PSMCs, as compared to their respective normoxic controls. Limited evidences from the literature implicated these two signals in the context of pulmonary

vascular disease (Hameed et al., 2012; Saito et al., 2015). Interestingly, although TRAIL is usually considered as pro-apoptotic mediator, its role in experimental PH pathogenesis has been described (Hameed et al., 2012). Taken together, it is clear that there is a complex play of different apoptotic mediators and this cellular process is indeed dysregulated in the pulmonary vascular cells exposed to hypoxia, however, it goes beyond the simplistic explanation based only on the expression patterns (increased/decreased) or historically known pro- or anti-apoptotic features of these signals.

In the cancer field, abnormally regulated apoptosis causes the release of apoptotic products into circulation, and they may represent potential biomarkers (Holdenrieder and Stieber, 2010). Up to date, there is no evidence about the expression profile of circulating apoptotic markers in humans exposed to acute and chronic effects of high altitude. In our study, we have investigated the concentration of ApoC1, TRAIL, and FasL in the plasma of Kyrgyz lowlanders who spent a short period of time in high altitude environment. The same signals were explored in the circulation of the permanent dwellers of high altitude who did or did not develop the HAPH, as well as in the blood of lowlanders. In addition, we have analyzed the circulating BNP, which is usually considered as an important cardiac biomarker, relevant to the PH field (Mellor et al., 2014; Anwar et al., 2016). Briefly, BNP has shown a trend to initially increase with days spent at high altitude in the circulation of Kyrgyz volunteers, as compared to the lowland conditions, and after day 7 there was a tendency to decrease, with a visible reduction upon descent to the lowlands again. Similarly, there was no clear change in the circulating profile of this cardiac marker in highlanders compared to the lowlanders, except non-significant augmentation in highlanders without PH.

ApoC1 circulatory levels were mostly comparable during the acute exposure of subjects to high altitude conditions, while there was some signal of increased values of this marker in the circulation of highlanders, in comparison to lowlanders. Yet, the data do not convincingly suggest the significant alteration of ApoC1 neither during acute nor chronic exposure to high altitude conditions.

Interestingly, the circulating concentrations of TRAIL showed the opposite manner in acute versus chronic exposure to high altitude in human volunteers. On one hand, there was a clear augmentation of this marker with days spent at high altitude in the blood of lowlanders, with significant reduction upon descent to low altitude again. On the other hand, there was noticeable, yet insignificant reduction of the circulating levels of TRAIL in highlanders (particularly those who developed HAPH) in comparison to the lowlanders. Furthermore, the literature suggested the elevated values of this marker in PH patients (Liu et al., 2015). Therefore, further studies are crucially needed to reveal the precise role of this apoptotic signal in both acute and chronic exposure to high altitude.

Finally, clearer and more informative results were obtained with focus on FasL in the circulation of humans in both acute and chronic exposure to high altitude geographic locations. There was a significant reduction of circulating FasL values in lowlanders exposed to high altitude environment for a short

period of time. In addition, the circulating concentrations of this apoptotic marker were significantly decreased in highlanders with PH, as compared to the lowlanders. Interestingly, there were attenuated values of FasL in highlanders without PH also, in comparison to the lowland control, however, the change was not statistically significant. Lastly, there was a negative correlation between the circulatory levels of FasL and TRG, clearly indicated the potential biomarker properties of this apoptotic signal in the case of chronic effects of high altitude and HAPH. In accordance with our findings, FasL serum values were shown to be relevant to the field of pulmonary vascular diseases, as evident in the literature (Akagi et al., 2013; Saito et al., 2015). Importantly, FasL expression was increased in PSMCs derived from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension upon the treatment with prostaglandin I<sub>2</sub>, which was associated with induction of apoptosis (Akagi et al., 2013). Following this line of thinking, we have also demonstrated in this study that FasL enhanced the apoptotic process in PSMCs. Consistently, pro-apoptotic features of FasL in PSMCs were described in the literature (Zhang et al., 2003; Wang et al., 2010). Furthermore, we have shown that the same concentrations of FasL used for the assessment of apoptosis significantly reduced the proliferation of these pulmonary vascular cells under normoxic conditions. In addition, the blockage of FasL resulted in increased proliferation of PSMCs under the basal conditions as well as during the stimulation with PDGF. Of note, PDGF signaling is a very well-known player associated with hypoxia and pulmonary vascular remodeling (Schermlay et al., 2005; ten Freyhaus et al., 2011; Veith et al., 2014). Finally, we have demonstrated that FasL exerted anti-proliferative effects on PSMCs exposed to hypoxic conditions, and blockage of FasL resulted in enhancement of the proliferation process.

## REFERENCES

- Akagi, S., Nakamura, K., Matsubara, H., Kusano, K. F., Kataoka, N., Oto, T., et al. (2013). Prostaglandin I<sub>2</sub> induces apoptosis via upregulation of Fas ligand in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Cardiol.* 165, 499–505. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.09.004
- Anwar, A., Ruffenach, G., Mahajan, A., Eghbali, M., and Umar, S. (2016). Novel biomarkers for pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* 17:88. doi: 10.1186/s12931-016-0396-6
- Azad, P., Stobdan, T., Zhou, D., Hartley, I., Akbari, A., Bafna, V., et al. (2017). High-altitude adaptation in humans: from genomics to integrative physiology. *J. Mol. Med.* 95, 1269–1282. doi: 10.1007/s00109-017-1584-7
- Chan, S. Y., and Rubin, L. J. (2017). Metabolic dysfunction in pulmonary hypertension: from basic science to clinical practice. *Eur. Respir. Rev.* 26:170094. doi: 10.1183/16000617.0094-2017
- Chen, M., Liu, Y., Yi, D., Wei, L., Li, Y., and Zhang, L. (2014). Tanshinone IIA promotes pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis in vitro by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* 33, 1130–1138. doi: 10.1159/000358682
- Fan, Z., Liu, B., Zhang, S., Liu, H., Li, Y., Wang, D., et al. (2015). YM155, a selective survivin inhibitor, reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats via upregulating voltage-gated potassium channels. *Clin. Exp. Hypertens.* 37, 381–387. doi: 10.3109/10641963.2014.987390
- Hameed, A. G., Arnold, N. D., Chamberlain, J., Pickworth, J. A., Paiva, C., Dawson, S., et al. (2012). Inhibition of tumor necrosis factor-related

Overall, our study identified for the first time that circulating levels of apoptotic signal FasL are reduced during acute and chronic exposure to high altitude environment. In addition, due to its pro-apoptotic and anti-proliferative functions in the relevant cells of the pulmonary vasculature, dysregulated FasL signal may play an important role in the context of HAPH.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

DK, HG, ASa, and RS conceived, designed, and created the study. DK, SP, AP, ASy, AbM, ArM, MS, KMU, MC, AT, NO, MD, and CV organized the expeditions and performed the field and laboratory measurements. DK, ASa, AbM, HG, ASy, and RS drafted and wrote the manuscript. OP and NW contributed with significant intellectual content. All authors read and approved the manuscript.

## FUNDING

This study was supported by the Cardiovascular Medical Research and Education Fund (CMREF), Universities of Giessen and Marburg Lung Center (UGMLC), Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS), and Ministry of Education and Science of the Kyrgyz Republic (Grant No. 0005823).

## ACKNOWLEDGMENTS

We are eternally thankful to all Kyrgyz volunteers for participation in this study.

- apoptosis-inducing ligand (TRAIL) reverses experimental pulmonary hypertension. *J. Exp. Med.* 209, 1919–1935. doi: 10.1084/jem.20112716
- Holdenrieder, S., and Stieber, P. (2004). Apoptotic markers in cancer. *Clin. Biochem.* 37, 605–617. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.05.003
- Holdenrieder, S., and Stieber, P. (2010). Circulating apoptotic markers in the management of non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark.* 6, 197–210. doi: 10.3233/CBM-2009-0130
- Hong, Y. M., Kwon, J. H., Choi, S., and Kim, K. C. (2014). Apoptosis and inflammation associated gene expressions in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats after bosentan treatment. *Korean Circ. J.* 44, 97–104. doi: 10.4070/kcj.2014.44.2.97
- Le Goff, A., Ji, Z., Leclercq, B., Bourette, R. P., Mougel, A., Guerardel, C., et al. (2012). Anti-apoptotic role of caspase-cleaved GAB1 adaptor protein in hepatocyte growth factor/scatter factor-MET receptor protein signaling. *J. Biol. Chem.* 287, 35382–35396. doi: 10.1074/jbc.M112.409797
- Li, Y. X., Run, L., Shi, T., and Zhang, Y. J. (2017). CTRP9 regulates hypoxia-mediated human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, apoptosis and migration via TGF-beta1/ERK1/2 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 490, 1319–1325. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.020
- Liu, H., Yang, E., Lu, X., Zuo, C., He, Y., Jia, D., et al. (2015). Serum levels of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand correlate with the severity of pulmonary hypertension. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 33, 39–46. doi: 10.1016/j.pupt.2015.06.002
- Maggiolini, M., and Leon-Velarde, F. (2003). High-altitude pulmonary hypertension: a pathophysiological entity to different diseases. *Eur. Respir. J.* 22, 1019–1025. doi: 10.1183/09031936.03.00052403

- Malczyk, M., Veith, C., Schermuly, R. T., Gudermann, T., Dietrich, A., Sommer, N., et al. (2016). NADPH oxidases—do they play a role in TRPC regulation under hypoxia? *Pflugers Arch.* 468, 23–41. doi: 10.1007/s00424-015-1731-3
- Marshall, J. D., Bazan, I., Zhang, Y., Fares, W. H., and Lee, P. J. (2018). Mitochondrial dysfunction and pulmonary hypertension: cause, effect or both. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 314, L782–L796. doi: 10.1152/ajplung.00331.2017
- Mellor, A., Boos, C., Holdsworth, D., Begley, J., Hall, D., Lumley, A., et al. (2014). Cardiac biomarkers at high altitude. *High Alt. Med. Biol.* 15, 452–458. doi: 10.1089/ham.2014.1035
- Mirzakhimov, A. E., and Strohl, K. P. (2016). High-altitude pulmonary hypertension: an update on disease pathogenesis and management. *Open Cardiovasc. Med. J.* 10, 19–27. doi: 10.2174/1874192401610010019
- Niessner, A., Hohensinner, P. J., Rychli, K., Neuhold, S., Zorn, G., Richter, B., et al. (2009). Prognostic value of apoptosis markers in advanced heart failure patients. *Eur. Heart J.* 30, 789–796. doi: 10.1093/eurheartj/ehp004
- Parissis, J. T., Adamopoulos, S., Antoniadis, C., Kostakis, G., Rigas, A., Kyrzopoulos, S., et al. (2004). Effects of levosimendan on circulating pro-inflammatory cytokines and soluble apoptosis mediators in patients with decompensated advanced heart failure. *Am. J. Cardiol.* 93, 1309–1312. doi: 10.1016/j.amjcard.2004.01.073
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., and Greenwood, M. T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim. Biophys. Acta.* 1813, 238–259. doi: 10.1016/j.bbamer.2010.10.010
- Saito, Y., Nakamura, K., Akagi, S., Sarashina, T., Ejiri, K., Miura, A., et al. (2015). Epoprostenol sodium for treatment of pulmonary arterial hypertension. *Vasc. Health Risk Manag.* 11, 265–270. doi: 10.2147/VHRM.S50368
- Sartorius, U., Schmitz, L., and Kramer, P. H. (2001). Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *ChemBiochem.* 2, 20–29. doi: 10.1002/1439-7633(20010105)2:1<20::AID-CBIC20>3.0.CO;2-X
- Schermuly, R. T., Dony, E., Ghofrani, H. A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., et al. (2005). Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Invest.* 115, 2811–2821. doi: 10.1172/JCI24838
- Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., and Grimminger, F. (2011). Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat. Rev. Cardiol.* 8, 443–455. doi: 10.1038/nrcardio.2011.87
- Simonneau, G., Gatzoulis, M. A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., et al. (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, D34–D41. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.029
- Stenmark, K. R., Frid, M. G., Graham, B. B., and Tuder, R. M. (2018). Dynamic and diverse changes in the functional properties of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.* 114, 551–564. doi: 10.1093/cvr/cvy004
- Takano, S., Yoshitomi, H., Togawa, A., Sogawa, K., Shida, T., Kimura, F., et al. (2008). Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 27, 2810–2822. doi: 10.1038/sj.onc.1210951
- ten Freyhaus, H., Dagnell, M., Leuchs, M., Vantler, M., Berghausen, E. M., Caglayan, E., et al. (2011). Hypoxia enhances platelet-derived growth factor signaling in the pulmonary vasculature by down-regulation of protein tyrosine phosphatases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 1092–1102. doi: 10.1164/rccm.200911-1663OC
- Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., and Archer, S. L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ* 360:j5492. doi: 10.1136/bmj.j5492
- Veith, C., Zakrzewicz, D., Dahal, B. K., Balint, Z., Murmann, K., Wygrecka, M., et al. (2014). Hypoxia- or PDGF-BB-dependent paxillin tyrosine phosphorylation in pulmonary hypertension is reversed by HIF-1 $\alpha$  depletion or imatinib treatment. *Thromb. Haemost.* 112, 1288–1303. doi: 10.1160/TH13-12-1031
- Wang, S., Wang, Y., Jiang, J., Wang, R., Li, L., Qiu, Z., et al. (2010). 15-HETE protects rat pulmonary arterial smooth muscle cells from apoptosis via the PI3K/Akt pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91, 51–60. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2009.12.007
- West, J. B. (2012). High-altitude medicine. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 1229–1237. doi: 10.1164/rccm.201207-1323CI
- Yang, C., Wang, S., Liang, T., Wang, J., Wang, K., and Wang, B. (2001). The roles of bcl-2 gene family in the pulmonary artery remodeling of hypoxia pulmonary hypertension in rats. *Chin. Med. Sci. J.* 16, 182–184.
- Yang, J. Y., and Widmann, C. (2001). Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5346–5358. doi: 10.1128/MCB.21.16.5346-5358.2001
- Yock, P. G., and Popp, R. L. (1984). Noninvasive estimation of right ventricular systolic pressure by Doppler ultrasound in patients with tricuspid regurgitation. *Circulation* 70, 657–662. doi: 10.1161/01.CIR.70.4.657
- You, B., Liu, Y., Chen, J., Huang, X., Peng, H., Liu, Z., et al. (2018). Vascular peroxidase 1 mediates hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, apoptosis resistance and migration. *Cardiovasc. Res.* 114, 188–199. doi: 10.1093/cvr/cvx234
- Zhang, S., Fantozzi, I., Tigno, D. D., Yi, E. S., Platoshyn, O., Thistlethwaite, P. A., et al. (2003). Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, L740–L754. doi: 10.1152/ajplung.00284.2002
- Zhang, S., Liu, B., Fan, Z., Wang, D., Liu, Y., Li, J., et al. (2016). Targeted inhibition of survivin with YM155 promotes apoptosis of hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells via the upregulation of voltage-dependent K(+) channels. *Mol. Med. Rep.* 13, 3415–3422. doi: 10.3892/mmr.2016.4977
- Zhang, S., Liu, B., Zhang, B., and Fan, Z. (2015). [The effect of survivin expression on the apoptosis and proliferation of hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells]. *Zhonghua jie he hu xi za zhi* 38, 45–49.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Kosanovic, Platzeck, Petrovic, Sydykov, Maripov, Mamazhakypov, Sartmyrzaeva, Muratali Uulu, Cholponbaeva, Toktosunova, Omurzakova, Duishobaev, Vroom, Pak, Weissmann, Ghofrani, Sarybaev and Schermuly. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



### **13 DANKSAGUNG**

In diesem letzten Teil meiner Dissertation möchte ich die Gelegenheit ergreifen mich bei all jenen zu bedanken, die mich auf dem Weg meiner wissenschaftlichen Arbeit begleitet und auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt...

... Herrn Prof. Dr. Ralph Theo Schermuly, als meinen Doktorvater, für die Möglichkeit der Bearbeitung dieser äußerst interessanten Thematik als Teil seiner Arbeitsgruppe.

... Herrn Dr. Djuro Kosanovic für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die vielen Diskussionen und hilfreichen Ratschläge sowie die kontinuierliche freundschaftliche Unterstützung.

... Herrn Dr. Akylbek Sydykov für die Mitbetreuung dieser Arbeit.

... Herrn Aleksandar Petrovic für die große Unterstützung und vielen Ratschläge in der Durchführung der experimentellen Untersuchungen in freundschaftlichem Verhältnis.

... Frau Christina Vroom, Frau Ingrid Breitenborn-Müller und Frau Ewa Bieniek für ihre stetige Hilfe und Expertise bei allen im Labor anfallenden Problemen und Fragen.

... Herrn Prof. Dr. Akpay Sarybaev, Herrn Abdirashit Maripov, Herrn Argen Mamazhakypov, Frau Meerim Sartmyrzaeva, Herrn Kubatbek Muratali Uulu, Frau Meerim Cholponbaeva, Frau Aidana Toktosunova, Frau Nazgul Omurzakova, Herrn Melis Duis-hobaev für die Studienorganisation und Durchführung der Felduntersuchungen vor Ort in Kirgistan.

... Herrn Prof. Dr. Norbert Weissmann, Herrn Prof. Dr. Hossein Ardeschir Ghofrani und Herrn Dr. Oleg Pak für bedeutende intellektuelle Beiträge.

... den vielen kirgisischen Probanden, die sich freiwillig zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt haben.

... der gesamten Arbeitsgruppe Schermuly für die kollegiale und harmonische Arbeitsatmosphäre.

Zu guter Letzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken ohne deren unerschöpfliche Geduld und immerwährende Unterstützung all das nicht möglich gewesen wäre.