

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Beteiligung des Cystic Fibrosis Transmembrane
Conductance Regulator, des Transient Receptor Potential
Vanilloid 4 und des Connexin 40 Transmembranproteins an der
Entstehung der Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie am
Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hannes Ranke

aus Jena

Datum der Promotion: 09.09.2016

Inhaltsverzeichnis

ENGLISH ABSTRACT	III
DEUTSCHES ABSTRACT.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 PHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER LUNGE	2
1.1.1 LUNGENPERFUSION	2
1.1.1.1 Beeinflussung der Lungenperfusion durch extravasale Faktoren	2
1.1.1.2 Beeinflussung der Lungenperfusion durch intravasale Faktoren	3
1.1.2 HYPOXISCH PULMONALE VASOKONSTRIKTION.....	5
1.2 PULMONALE HYPERTONIE	8
1.2.1 DEFINITION UND KLINISCHE KLASSIFIKATION	8
1.2.2 KLINIK UND DIAGNOSTIK DER PULMONALEN HYPERTONIE	11
1.2.3 PATHOPHYSIOLOGIE DER PULMONALEN HYPERTONIE	13
1.2.3.1 Remodelling der pulmonalen Strombahn	13
1.2.3.2 Vasokonstriktion der pulmonalarteriellen Gefäße.....	15
1.2.3.3 Inflammation als Bestandteil des Pathomechanismus	16
1.2.3.4 Thromboembolische Pathogenese.....	17
1.2.3.5 Genetische Pathogenese	18
1.2.4 THERAPIE DER PULMONALEN HYPERTONIE	18
1.2.4.1 Kalziumkanalblocker.....	19
1.2.4.2 Prostanoiden	20
1.2.4.3 Endothelin-Rezeptor Antagonisten.....	21
1.2.4.4 Phosphodiesteraseinhibitoren	22
1.2.4.5 Invasive Therapien	23
1.3 CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR.....	24
1.4 TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 4	25
1.5 CONNEXIN 40.....	27
2 HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG	27

3	MATERIAL UND METHODIK	29
3.1	VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE	29
3.2	HYPOXIE EXPOSITION	31
3.3	INVASIVE <i>IN VIVO</i> PHASE	32
3.4	INVASIVE <i>EX VIVO</i> PHASE	34
3.5	<i>POST MORTEM</i> UNTERSUCHUNG	36
3.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	37
4	ERGEBNISSE	38
4.1	ENTWICKLUNG DER VERSUCHSTIERE	38
4.2	RECHTSVENTRIKULÄRER SYSTOLISCHER BLUTDRUCK (RVSP).....	40
4.3	FULTON INDEX.....	43
4.4	PULMONALER STRÖMUNGSWIDERSTAND	45
4.5	VASKULÄRES REMODELLING.....	50
5	DISKUSSION	57
5.1	METHODENDISKUSSION: TIERMODELL	58
5.2	METHODENDISKUSSION: FEHLERANALYSE	61
5.3	CHLORIDKANAL CFTR	63
5.4	MECHANOSENSITIVER KALZIUMKANAL TRPV 4	66
5.5	CONNEXIN 40	69
5.6	KLINISCHE BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE	72
5.7	AUSBLICK.....	73
6	ZUSAMMENFASSUNG	76
7	LITERATURVERZEICHNIS	79
8	DANKSAGUNG	93
9	LEBENS LAUF	94
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	95
11	PUBLIKATIONEN	97

English Abstract

The role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, transient receptor potential vanilloid 4 and connexin 40 in a mouse model of chronic hypoxic pulmonary hypertension.

Pulmonary hypertension (PH) is a complex disease characterized by remodelling of pulmonary arterioles, increased pulmonary artery pressure, and right heart hypertrophy. This thesis discusses the role of three transmembrane proteins in the process of vascular remodelling under chronic hypoxia, namely cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and connexin 40 (Cx40).

The study was performed in a murine model of chronic hypoxic pulmonary hypertension. Specific knockout mice for the three transmembrane proteins under investigation (*Cftr^{tm1Unc}-Tg(FAPBCFTR)^{-/-}*, *Trpv4^{-/-}*, *Cx40^{-/-}*) and corresponding C57/Bl6 wildtype mice were bred and separated into two groups.

One group was exposed to hypoxia ($O_2=10\%$), while the other was housed at ambient air ($O_2=21\%$) for 35 days. After five weeks, mouse weight and right ventricular systolic pressure (RVSP) were measured *in vivo*. After exsanguination, pressure-flow relationships were determined in the isolated perfused lung. The heart was removed and the Fulton index was calculated as a measure of right ventricular hypertrophy. Lung sections were histologically processed and haematoxylin and eosin (H.E.) stained, and vessel wall thickness of arterioles was quantitatively measured.

Experiments identified a fundamental contribution of Cx40 to pulmonary vascular remodelling after chronic hypoxia. After five weeks of hypoxia, significant increases in RVSP, Fulton index and wall thickening of pulmonary arterioles were detectable in C57/Bl6 wildtype mice, but were completely absent in *Cx40^{-/-}* mice.

Experiments in *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FAPBCFTR)^{-/-}* and *Trpv4^{-/-}* mice also revealed functional roles of these channels in the development of chronic hypoxic PH, in that RVSP and pulmonary arterial remodelling were significantly attenuated as compared to C57/Bl6

wildtype mice after 35 days of hypoxia, however, the attenuation of hemodynamic changes, as well as vascular and ventricular remodelling was less pronounced for these knockout strains as compared to the Cx40^{-/-} mice.

Based on these data we postulate that TRPV4 and CFTR channels participate in the signalling cascade that ultimately results in the development of chronic pulmonary hypertension whereas Cx40 plays a key mechanistic role in this pathology.

Deutsches Abstract

Die Beteiligung des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, des Transient Receptor Potential Vanilloid 4 und des Connexin 40 Transmembranproteins an der Entstehung der Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie am Mausmodell.

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine komplexe Erkrankung, welche durch Remodelling der pulmonalarteriellen Gefäße, erhöhten mittleren pulmonalarteriellen Druck und Rechtsherzhypertrophie gekennzeichnet ist.

In dieser Dissertation wird die Beteiligung von drei Transmembranproteinen, im speziellen des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-, des Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4)- und des Connexin 40 (Cx40) Transmembranprotein an der Entwicklung und Progression des vaskulären Remodelling unter chronischer Hypoxie untersucht.

Die Studie wurde am Mausmodell der chronisch hypoxischen pulmonalen Hypertonie durchgeführt. Es wurden spezielle Knockout Versuchstiere für die drei Transmembranproteine (*Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}*, *Trpv4^{-/-}*, *Cx40^{-/-}*) und entsprechende C57/Bl6 Wildtyp Mäuse gezüchtet und jeweils in zwei Gruppen eingeteilt.

Die erste Gruppe wurde für 35 Tage hypoxischen Sauerstoffverhältnissen ($O_2=10\%$) ausgesetzt, die zweite Gruppe wurde 35 Tage normalen Sauerstoffverhältnissen ausgesetzt ($O_2=21\%$). Nach fünf Wochen wurden das Gewicht der Mäuse und der rechtsventrikuläre Druck (RVSP) *in vivo* bestimmt. Nach Exsanguination erfolgte *ex vivo* eine direkte Bestimmung der Druck-Fluss Kurven am Modell der isoliert-perfundierten Lunge, sowie die Kalkulation des Fulton Indexes. Nach Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung wurde anschließend in den Lungen die jeweilige Wanddicke der Arteriolen ermittelt. Zum direkten Vergleich der Ergebnisse der Knockout Tier Messungen wurden C57/Bl6 Wildtyp Mäuse ebenfalls hypoxischen oder normoxischen Sauerstoffverhältnissen ausgesetzt und den Messungen unterzogen.

Die Experimente ergaben eine zentrale Beteiligung von Cx40 an den pulmonalen Umbauprozessen und Veränderungen unter Einfluss von chronischer Hypoxie. Nach

fünfwöchiger Hypoxie zeigte sich eine signifikante Erhöhung des RVSP, des Fulton Indexes sowie der Wanddicke der pulmonalarteriellen Gefäße bei den C57/Bl6 Wildtyp Mäusen, welche in der *Cx40*^{-/-} Hypoxie Gruppe nicht nachweisbar waren.

Die Ergebnisse des CFTR Transmembrankanals sowie des TRPV4 Kationenkanals bewiesen ebenfalls deren Beteiligung an der Entwicklung einer Hypoxie induzierten PH. Der RVSP sowie die Hypertrophie der pulmonalarteriellen Gefäßwände nach 35 Tagen Hypoxie war gegenüber der C57/Bl6 Wildtyp Vergleichsgruppe jeweils signifikant erniedrigt. Jedoch konnte nicht in allen Messungen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Wildtyp Vergleichsgruppe festgestellt werden. So unterschied sich die Hypoxie induzierte Rechtsherzhypertrophie in den *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-} und den *Trpv4*^{-/-} Tieren nur marginal von der C57/Bl6 Vergleichsgruppe.

Aufgrund dieser Erkenntnisse postulieren wir, dass TRPV4 und CFTR Transmembranproteine an der Signalkaskade der PH Entstehung beteiligt sind, während das Transmembranprotein Cx40 eine fundamentale Schlüsselrolle in der Pathogenese spielt.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AT II	Angiotensin II
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor-2
Ca ²⁺	Kalziumion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	Zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chloridion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
Cx40	Connexin 40
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
ET1	Endothelin-1
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HPH	hypoxische pulmonale Hypertonie
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HZV	Herz-Zeit-Volumen
ID	Innendurchmesser
IL6	Interleukin-6
INR	International Normalized Ratio
IP ₃	Inositol- _{1,4,5} -Trisphosphat
i.v.	intravenös
K ⁺	Kaliumion
MCT	Monocrotalin
MW	Mittelwert
Na ⁺	Natriumion
NFAT	nukleärer Faktor von aktivierten T-Lymphozyten
NO	Stickstoffmonoxid

NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck
PAP _m	mittlerer pulmonalarterieller Druck
PASMC	pulmonalarterielle Gefäßmuskelzelle
PCWP	pulmonalkapillärer Verschlussdruck
PDE-5	Phosphodiesterase 5
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGI ₂	Prostacyclin
PH	pulmonale Hypertonie
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVR	pulmonaler Gefäßwiderstand
RV	rechter Ventrikel
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck
s.c.	subkutan
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SU5416	Sugen 5416
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TPG	transpulmonaler Gradient
TRP	Transient Receptor Potential
TRPV4	Transient Receptor Potential Vanilloid 4
TXA ₂	Thromboxan
V.	Vene
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

Die pulmonale Hypertonie ist nach internationalen Vereinbarungen als mittlerer pulmonalarterieller Druck (PAP_m) über 25mmHg unter Ruhebedingungen definiert¹. Der rechte Ventrikel (RV) ist dabei nicht mehr in der Lage ein adäquates Herz-Zeit-Volumen (HZV) durch die pathologisch veränderte pulmonale Strombahn zu pumpen. Klinisch äußert sich dieser Mechanismus unter anderem in Form einer Belastungsdyspnoe¹. Im Laufe der Zeit verstärken sich die Symptome durch irreversible pathologische Umbauprozesse des pulmonalen Gefäßsystems: Hypertrophie und verringerte Dehnbarkeit der Adventitia, Media- und Intimahypertrophie sowie Schädigungen der Endotheloberfläche²⁻⁴.

Im Jahr 2013 befanden sich laut Statistischem Bundesamt in Deutschland 9242 Patienten aufgrund von pulmonaler Hypertonie in stationärer Behandlung (ICD10: I27 Sonstige pulmonale Herzkrankheiten)⁵. Diese Anzahl variierte nur geringfügig seit dem Jahr 2010. Der Anteil der über 65-jährigen Patienten war dabei fast viermal so groß wie die Anzahl der Patienten im Altersabschnitt von 45- bis 65 Jahren⁵. Während im Jahr 2003 noch 1518 Patienten an dieser Erkrankung verstarben (Sterbefälle je 100000 Einwohner: 1,8) stieg die Anzahl im Jahr 2013 auf 2165 Todesfälle (Sterbefälle je 100000 Einwohner: 2,7)⁶.

Anhand dieser Zahlen stellt sich die pulmonale Hypertonie (PH) als schwerwiegende Erkrankung mit hohen Sterberaten dar. Jedoch ist die reale Sterberate wesentlich höher, da aufgrund der unspezifischen Symptome viele Diagnosen erst spät oder gar nicht gestellt werden¹.

Die Umsetzung neuer effizienter Therapiemöglichkeiten, die nicht nur ein Fortschreiten der Erkrankung verhindern, sondern auch eine vollständige Heilung anstreben, geht mit einem besseren Verständnis der zugrundeliegenden pathologischen Abläufe einher. In der vorliegenden Arbeit wird die Beteiligung dreier Membranproteine, des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), des Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) und des Connexin 40 (Cx40), an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie untersucht. Das Ziel ist pathophysiologische Prozesse nachzuvollziehen und letztendlich neue Zielstrukturen für therapeutische Interventionen zu identifizieren, die eine verbesserte Therapie der PH ermöglichen.

1.1 Physiologische Grundlagen der Lunge

1.1.1 Lungenperfusion

Die hintereinander geschalteten Körper- und Lungenkreisläufe werden jeweils vom gesamten Herz-Zeit-Volumen (HZV) durchströmt. Aufgrund der geringen Gefäßstrecke und dem großen Gesamtquerschnitt der pulmonalen Kapillaren wird der gesunde Lungenkreislauf als Niederdrucksystem bezeichnet⁷.

Eine entscheidende Größe zur Beurteilung der Lungenperfusion stellt der pulmonale Gefäßwiderstand (PVR) dar. Im Gegensatz zum totalen peripheren Widerstand des Hochdrucksystems des Körperkreislaufes beträgt der PVR nur ein Zehntel dieses Wertes. Im etablierten klinischen Modell wird analog zum Ohm'schen Gesetz der Gefäßwiderstand vereinfacht aus dem Quotient des Druckabfalls ΔP über den pulmonalen Blutkreislauf hinweg und dem HZV bestimmt⁸. Der Druckabfall ΔP wird durch Messung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (PAP_m) und des mittleren pulmonalkapillären Verschlussdrucks ($PCWP_m$) ermittelt, welcher annähernd den mittleren linksatrialen Druck widerspiegelt. Der beschriebene PVR ist in der folgenden Gleichung dargestellt⁸:

$$PVR = \frac{PAP_m - PCWP_m}{HZV}$$

Der PVR und somit die Perfusion des pulmonalen Gewebes kann durch eine Reihe von Faktoren beeinträchtigt werden. Darauf wird in den folgenden Gliederungspunkten genauer eingegangen.

1.1.1.1 Beeinflussung der Lungenperfusion durch extravasale Faktoren

Perivaskuläre Kräfte werden je nach Lokalisation der Gefäße, auf die sie wirken, drei verschiedenen Gefäßgruppen zugeordnet⁹. Die erste Gruppe sind die extrapulmonalen Gefäße, die sich im Mediastinum befinden und aufgrund des negativen Pleuradrucks offen gehalten werden. Vertreter sind beispielweise die Vena und Arteria pulmonalis. Die zweite Gruppe bilden Arterien- und Venenäste des intrapulmonalen Ventilationssystems, welche von elastischen Fasern des Lungengewebes vor allem während der Inspiration dilatiert werden. In der dritten Gruppe befinden sich die Lungenkapillaren, die vor allem vom hydrostatischen Druck beeinflusst werden. In

dieser Gruppe untergliedert man die aufrechte Lunge nach dem erweiterten Modell von West von 1968 in vier Zonen (Tabelle 1) und unterscheidet unter Ruhebedingungen jeweils die Kapillarperfusion⁹.

Tabelle 1: Zonen-Modell der Lunge nach West⁹. p_{al} : Alveolärer Druck; p_{art} und p_v : arterieller und venöser Druck im Lungenkreislauf; p_{int} : interstitieller Druck

Zone I	$p_{al} > p_{art} > p_v$	(Kollaps der Kapillaren)
Zone II	$p_{art} > p_{al} > p_v$	(Limitierte Kapillarbeeinträchtigung)
Zone III	$p_{art} > p_v > p_{al}$	(Aufdehnung der Kapillaren)
Zone IV	$p_{int} > p_{art} > p_v$	(Extraalveoläre Kompression)

In Zone I übersteigt der Alveolardruck aufgrund des zu geringen hydrostatischen Druckes den Perfusionsdruck in den Kapillaren, wodurch es zu einem Kollaps der Gefäße kommt. Physiologisch existiert diese Zone jedoch nicht in relevantem Ausmaß, theoretisch wird dadurch ein Abschnitt der alveolären Totraumventilation beschrieben. In der darunter liegenden Zone II übersteigt der pulmonalarterielle Druck den Alveolardruck. Der Blutfluss kann unter diesen Bedingungen nur entstehen, wenn der intravasale- den transmuralen Druck (Gradient zwischen Pleuradruck und Alveolardruck) überschreitet. In den Zonen III und IV wird der alveoläre Druck vom pulmonalarteriellen und -venösen Druck überschritten, wodurch vor allem der Druckgradient zwischen arteriellem und venösem System die initiale Perfusion bestimmt. Besonders in der untersten Zone IV, eine wenige Zentimeter dicke Schicht, wird der Einfluss des interstitiellen Drucks auf die Perfusion diskutiert. Der interstitielle Druck trägt zu einer geringeren Perfusion in dieser Zone bei.

Einen Sonderfall der Regulation der Lungenperfusion stellt die hypoxische Vasokonstriktion dar¹⁰. Dieser Vorgang wird im Gliederungspunkt 1.1.2 detailliert beschrieben.

1.1.1.2 Beeinflussung der Lungenperfusion durch intravasale Faktoren

Gleichzeitig zu den extravasalen Einflüssen wirken intravasale Kräfte, die sich ebenfalls auf die Lungenperfusion auswirken. Aufgrund des Blutflusses und des Herzschlages wird eine mechanische Belastung auf das lumenale Oberflächenendothel der

Lungengefäße übertragen, welche auf zwei Faktoren basiert: Scher- und Dehnungskräfte^{12,13}. Die Perfusion wird von diesem mechanischen Stress beeinflusst^{11,12}. Die Scherkräfte, die vom Blutfluss mit seinen pulsierenden Rhythmusschwankungen hervorgerufen werden, nehmen je nach Art des Lungengefäßes unterschiedlich starken Einfluss. Am stärksten variieren sie im alveolaren Kapillarsystem. Durch spontan wechselnde Kapillarrekruitierungen und somit temporär fehlende Perfusion einzelner Gefäße werden stark schwankende Werte erzeugt.

Die zweite Gruppe des mechanischen Stresses bilden die Dehnungskräfte. Sie sind abhängig vom Gefäßradius, der Füllungsmenge des Gefäßes sowie von rhythmischen Blutdruckveränderungen. Das pulmonale Gefäßsystem weist dabei eine Besonderheit dieses mechanischen Drucks auf. Der Druck wird nicht wie im großen Kreislauf durch kleine Arterien und Arteriolen absorbiert sondern bis ins Kapillarbett der Lunge weitergeleitet. Somit bewirkt ein erhöhter pulmonalarterieller Druck (PAP) eine verstärkte Gefäßdilataion und Rekrutierung der kleineren Gefäße^{11,12}.

Interessanterweise wiesen bereits Studien membranständige Kationenkanäle nach, die an der Endothelreaktion auf mechanischen Stress beteiligt sind^{13,14}. Im Detail werden unter Druck Kalzium- (Ca^{2+}) permeable Kanäle aktiviert, die zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führen. Ein Vertreter dieser Kanäle ist der Transient Receptor Potential Kanal 4 (TRPV4), welcher im eigenen Gliederungspunkt 1.4 detaillierter beschrieben wird.

Neben den mechanischen Faktoren gibt es zusätzlich endotheliale- und humorale Mediatoren, welche einen Einfluss auf die Lungenperfusion ausüben. Unter Normalbedingungen herrscht in der Lunge ein sehr niedriger Ruhetonus. Es liegen kaum vasokonstringierende und vasodilatierende Stimuli vor¹⁵. Dieses Verhältnis ist jedoch unter chronischer Hypoxie zu Gunsten der vasokonstringierenden Faktoren verschoben¹⁶. In Folge eines PAP_m Anstieges führen aktive und passive Gegenregulationen des Körpers zu einer Reduzierung des Gefäßwiderstandes.

Die vasodilatative Wirkung von NO (Stickstoffmonoxid), PGI_2 (Prostacyclin) und dem Atrialen Natriuretischen Peptid (ANP) verursacht mit Hilfe der Erhöhung des second messengers zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und Guanosinmonophosphat (cGMP) einen Kaliumausstrom aus der Zelle sowie einen Einstrom des intrazellulären Kalziums (Ca^{2+}) in das endoplasmatische Retikulum¹⁷. Die Hyperpolarisation der

Zellmembran, hervorgerufen durch den Kaliumausstrom, führt zu einer Blockade der L-Kalziumkanäle. Die Reduzierung des intrazellulären Ca^{2+} verursacht eine Vasodilatation.

Hingegen bewirken die Gefäßkonstriktoren Thromboxan (TXA_2), Serotonin, Angiotensin II (AT II) und Endothelin-1 (ET1) über membranständige G-Proteine einen Proteinkinase C und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) vermittelten intrazellulären Kalziumanstieg^{3,18,19}. Die zellulären Kaliumkanäle werden geblockt und induzieren eine Depolarisation der Zellmembran, wodurch extrazelluläres Ca^{2+} intrazellulär einströmt. Der intrazelluläre Kalziumanstieg und der bereits zuvor aktivierte Botenstoff IP_3 führen zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} initiiert die Aktin-Myosin Interaktion und somit die Vasokonstriktion. Eine chronische PAP_m Erhöhung führt langfristig zu Endothelschädigungen und irreversiblen Umbauprozessen des pulmonalen Gefäßsystems (siehe Punkt 1.2.3 Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie)^{3,20}.

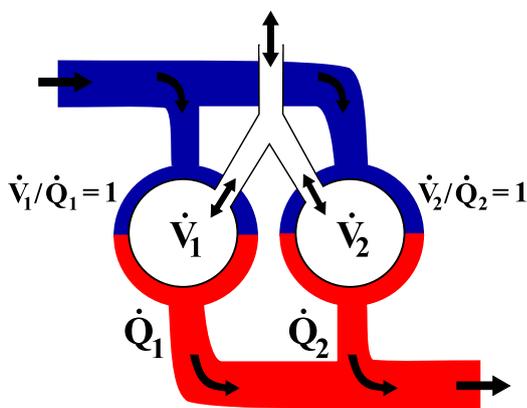
1.1.2 Hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion

Schlecht belüftete Alveolen werden durch Vasokonstriktion der Lungenarteriolen vermindert perfundiert¹⁰. Dieser Prozess ist unter dem Namen Euler-Liljestrand-Mechanismus bekannt und bewirkt eine effektive Umverteilung des Blutes zu Gunsten gut belüfteter Lungenareale, welche einem temporären Shunt entgegenwirkt¹⁸. Werden jedoch gleichzeitig mehrere Alveolen nicht belüftet, führt die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion (HPV) in ihrer Summe zu einer Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes. Das Prinzip der HPV ist nachfolgend anhand des 2-Kompartiment-Lungenmodells nach Sylvester und Mitarbeitern dargestellt¹⁰.

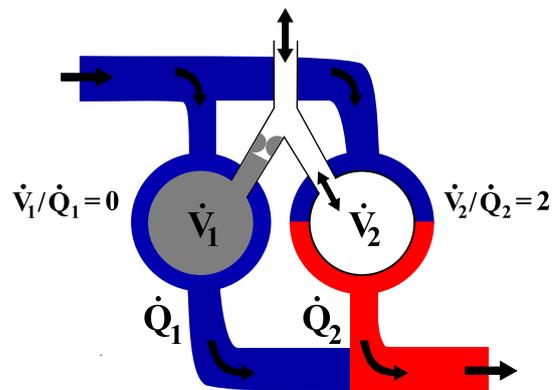
Unter physiologischen Bedingungen liegt das Ventilations-Perfusions-Verhältnis (V/Q) in beiden Lungenhälften optimal bei ungefähr 1 (Abbildung 1A). Wird die Ventilation (V) eines Kompartiments blockiert, ohne dabei die Perfusion dieser Seite zu reduzieren, sinkt das Verhältnis V/Q der betroffenen Seite gegen Null. Hingegen erhöht sich bei gleichbleibendem Atemzeitvolumen die Ventilation der anderen Lungenhälfte auf das Doppelte bei unveränderter Perfusion ($V/Q = 2$). Im Ergebnis nimmt die Hälfte des HZV, welches den nicht belüfteten Lungenlappen perfundiert, nicht mehr am Gasaustausch teil. Jedoch kann die zweite Lungenhälfte das erhöhte Sauerstoffangebot nur bedingt in den Kreislauf aufnehmen. Insgesamt kommt es zu einer verminderten Oxygenierung

des Gesamtblutes (Abbildung 1B). Kann der Körper mit Hilfe der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion die Perfusion der nicht ventilierten Lungenhälfte um 60% minimieren, verändert sich die Perfusion der Lungenhälften auf ein Verhältnis von 20% zu 80% zu Gunsten der besser ventilerten Lungenhälfte¹⁰. Das Ventilations-Perfusions-Missverhältnis der belüfteten Lungenhälfte reduziert sich somit von 2 auf 1,25 (Abbildung 1C). Mit Hilfe des HPV Mechanismus kann die Oxygenierung des Blutes erhöht und somit die negativen Auswirkungen auf den Gesamtkreislauf reduziert werden, ohne dass sich die Ursache der Hypoxie zum Beispiel auf Grund einer Atemwegsobstruktion verändert.

A Normal



B \dot{V}/\dot{Q} Missverhältnis ohne HPV



C \dot{V}/\dot{Q} Missverhältnis mit HPV

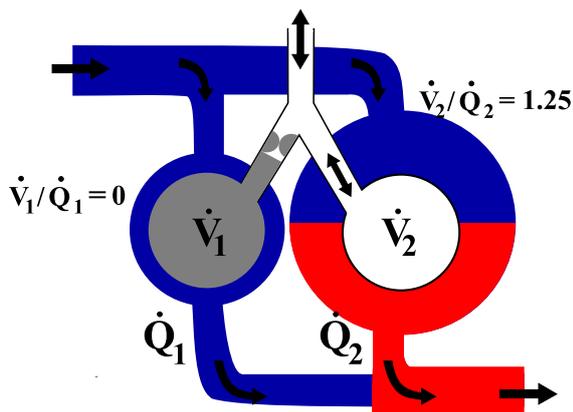


Abbildung 1: 2-Kompartiment-Lungenmodell und schematische Darstellung der HPV¹⁰. \dot{V} steht für Lungenventilation, \dot{Q} für Lungenperfusion. 1 und 2 stehen hierbei für den rechten beziehungsweise linken Lungenflügel **A** Ventilations-Perfusions-Verteilung in der Lunge unter regulären Bedingungen **B** Ventilations-Perfusions-Verteilung in der Lunge unter Belüftung eines einzigen Lungenflügels ohne HPV **C** Ventilations-Perfusions-Verteilung in der Lunge unter Belüftung eines Lungenflügels mit HPV

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist der Einfluss von zentralen Regulationsprozessen auf die hypoxische Vasokonstriktion nicht bekannt, eine geringe modulierende Bedeutung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden¹⁰.

Der genaue Signalweg der HPV wird aktuell noch intensiv erforscht. Die Hypoxie induzierte Schließung der zellmembranständigen Kaliumkanäle bewirkt eine Öffnung der Kalziumkanäle, welche eine Vasokonstriktion initiiert¹⁰. Bekannt ist, dass die pulmonalarterielle Gefäßmuskulatur (PASMC) die Effektorzellen der Vasokonstriktion darstellt¹⁰. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass die HPV vorwiegend auf die muskularisierten pulmonalen Arteriolen und Arterien größer als 30µm im Durchmesser begrenzt ist, jedoch vom Ort des Gasaustausches, den Alveolarkapillaren, gesteuert wird²¹. Dies führt zur Annahme, dass der Sauerstoffsensor- und Effektor räumlich voneinander getrennt sind und somit eine retrograde Signalübermittlung vom Ort des Gasaustausches zu den zirkulär glatte Muskelzellen tragenden Arteriolen und Arterien stattfinden muss. In Untersuchungen an isolierten Lungen zeigten sich unter Hypoxie lokale Depolarisationen der endothelialen Zellmembran, die sich entgegen des Blutstroms bis zum Ort der Vasokonstriktion über interzelluläre gap junctions, bestehend aus Membranproteinen, den Connexinen, ausbreiteten^{22,23}. Ein Vertreter dieser Connexine, das Protein Connexin 40, ist vermutlich an dieser endothelialen Signaltransduktion zentral beteiligt und wurde daher in dieser Dissertation genauer untersucht.

Liegt der alveolaren Minderbelüftung eine chronische Lungenerkrankung zu Grunde, kann sich die aus dem Euler-Liljestrand-Mechanismus resultierende chronische Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes (PVR) nachteilig auswirken²⁴. Globale Hypoxämie führt längerfristig zu einer irreversiblen Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (PAP_m) als Ausdruck einer sogenannten Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie, bei der die Erhöhung des PVR nicht mehr allein auf die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion, sondern auch auf irreversible Endothelschädigung und strukturelle Umbauprozesse in der Gefäßstrombahn zurückzuführen ist^{3,20}. Sie werden im Gliederungspunkt 1.2.3 (Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie) genauer beschrieben. Mit der Zeit entwickelt sich eine pulmonale Hypertonie und es kann zu einem konsekutiven chronischen Cor Pulmonale

kommen. Der permanent erhöhte PAP_m bewirkt dabei Funktionsveränderungen und eine Hypertrophie des rechten Ventrikels²⁵.

1.2 Pulmonale Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist in der heutigen Gesellschaft mit ihrer stetig steigenden Lebenserwartung und zunehmender Multimorbidität ein sehr häufig auftretendes Erkrankungsbild. Nach derzeitigem Erkenntnisstand beträgt die Prävalenz der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) zwischen 15 und 26 Fälle pro einer Million Einwohner²⁶. Allerdings stellt die PAH nur eine Untergruppe der PH dar. Die Prävalenz der PH ist vermutlich um ein Vielfaches höher. Aufgrund der oft späten Diagnose und der unspezifischen Symptome werden viele Fälle erst gar nicht erfasst. Die Auswertung eines französischen Registers aus dem Jahr 2006 ergab einen Zeitraum von 27 Monaten zwischen ersten Symptomen wie zum Beispiel der Belastungsdyspnoe und der Diagnosestellung der PAH²⁷. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wiesen die Patienten bereits fortgeschrittene funktionelle Einschränkungen auf. 75% der Patienten befanden sich im Stadium III und IV nach New York Heart Association functional class (NYHA), der durchschnittliche PAP_m betrug 55(±15)mmHg²⁷.

Die 5-Jahres-Überlebensrate wurde bisher in der Literatur mit circa 30% angegeben. Eine aktuelle Auswertung amerikanischer Zentren zeigte hingegen eine 5-Jahres-Überlebensrate der PAH Patienten von 57%²⁸. Dies wird auf die verbesserte Diagnostik und Therapie in den letzten zwei Jahrzehnten zurückgeführt.

1.2.1 Definition und Klinische Klassifikation

Nach internationalen Vereinbarungen wird die pulmonale Hypertonie (PH) als Anstieg des mittleren pulmonalarteriellen Drucks auf Werte über 25mmHg unter Ruhebedingungen definiert. Werte zwischen 20 und 25mmHg können bereits auf eine beginnende PH hindeuten und werden zum Teil als sogenannte Borderline-Fälle klassifiziert^{1,29}.

Auf Grundlage der EVIAN Konferenz 1998 und einer Modifikation 2003 in Venedig erarbeitete die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation = WHO) eine Einteilung der PH. Dabei dienten klinische Erscheinungsbilder sowie

pathophysiologische Prozesse als Grundlage der Gliederung. 2008 wurde diese Gliederung in Dana Point (Kalifornien) aktualisiert und hat auch nach dem 5. Weltsymposium für Pulmonale Hypertonie 2013 in Nizza (Frankreich) weiter Bestand²⁹.

Tabelle 2: Klassifikation der pulmonalen Hypertonie nach WHO (2013)²⁹.

1	Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
1.1	Idiopathische PAH
1.2	Hereditäre PAH
1.3	Medikamenten-, Drogen-, Toxin- assoziierte PAH
1.4	PAH assoziiert mit
1.4.1	Bindegewebserkrankung
1.4.2	HIV Infektion
1.4.3	Portaler Hypertonie
1.4.4	Angeborene Herzerkrankungen
1.4.5	Schistosomiasis
1.4.6	Chronische hämolytische Anämie
1.5	Persistierende Pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
1.6	Pulmonale veno-okklusive Erkrankungen und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose
2	Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen
2.1	Systolische Dysfunktion
2.2	Diastolische Dysfunktion
2.3	Herzklappenerkrankungen
2.4	Angeborene/erworbene Einfluss/Ausfluss-Obstruktionen des linken Herzens und angeborene Kardiomyopathien
3	Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxämie
3.1	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
3.2	Interstitielle Lungenerkrankung
3.3	Andere Lungenerkrankungen mit gemischtem restriktivem oder obstruktivem Muster
3.4	Schlaf-assoziierte Atemstörung
3.5	Alveoläres Hypoventilationssyndrom
3.6	Chronische Exposition in großer Höhe
3.7	Entwicklungsstörung
4	Chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
5	Pulmonale Hypertonie multifaktorieller oder unklarer Genese
5.1	Hämatologische Erkrankungen: myeloproliferative, Splenektomie
5.2	Systemerkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Zellerkrankung, Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
5.3	Metabolische Erkrankungen: Glykogene Speicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankung
5.4	Andere Erkrankungen: Tumöröse Obstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz mit Hämodialyse, segmentale pulmonale Hypertonien

Im ersten Gliederungspunkt der PH Klassifikation wird die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) beschrieben, welche in die hereditäre, die idiopathisch-sporadische, die

persistierende PH von Neugeborenen sowie die assoziierten Formen untergliedert wird. Der pulmonalkapilläre Verschlussdruck (PCWP) ist dabei definitionsgemäß kleiner gleich 15mmHg, primäre Erkrankungen des Lungenparenchym oder thromboembolische Prozesse treten in diesem Gliederungspunkt nicht auf³⁰.

Die Einteilung nach familiärer PAH wurde aufgrund neuerer genetischer Erkenntnisse durch die hereditäre PAH ersetzt. Bis zu 80% der familiären PAH konnten auf eine Mutation im Bone Morphogenetic Protein Receptor-2 Gen (BMP2) zurückgeführt werden, welches ein Mitglied der Transforming Growth Factor (TGF)- β Signalkaskade darstellt³¹. Zusätzlich konnten in etwa 20% der idiopathischen PAH sporadische Neumutationen im BMP2 Gen identifiziert werden, ohne dass diese in der vorherigen Generation nachweisbar waren³². In der Literatur werden eine Vielzahl von Medikamenten und Toxinen beschrieben, welche in Assoziation mit der PAH Entwicklung stehen. Bereits bei wieder vom Markt genommenen Appetitzüglern (Aminorex-, Fenfluramin Derivate) und Lipidsenkern (Benfluorex Derivate) konnte eine Beteiligung an der Entstehung der PAH nachgewiesen werden³³. Des Weiteren wird bei der Verwendung des Tyrosinkinase Inhibitors Dasatinib und des Interferon-1 ein erhöhtes Risiko einer PAH Entstehung vermutet³³.

Die assoziierten Formen der PAH können zum Beispiel im Rahmen von HIV Infektionen oder kongenitalen pulmonalen Shuntvitien auftreten. An dieser Stelle sind ebenfalls die Kollagenosen zu nennen, denn 15-25% der PAH Patienten sind, zumeist in Form der Systemischen Sklerodermie oder des Systemischen Lupus erythematodes, Kollagenosen assoziiert^{27,34}. Epidemiologische Untersuchungen zeigten andererseits, dass 70% der Patienten mit rheumatischen Erkrankungen eine PH entwickeln³⁵.

Im zweiten Gliederungspunkt der Klassifikation (Tabelle 2) ist die PH kausal auf eine Linksherzpathologie zurückzuführen. Eine resultierende pulmonalvenöse Stauung bewirkt eine Erhöhung des postkapillären pulmonalen Drucks (postkapilläre PH). Definitionsgemäß werden PCWP Werte größer 15mmHg erreicht und weiter einer passiven oder einer reaktiven Form zugeordnet³⁶. Dies geschieht mit Hilfe des transpulmonalen Gradienten (TPG), wobei sich der TPG aus der Druckdifferenz zwischen PAP_m und PCWP berechnet. Reaktive Formen erreichen Druckgradienten über 12mmHg ($TPG > 12\text{mmHg}$), passive Formen überschreiten Werte von 12mmHg nicht ($TPG \leq 12\text{mmHg}$). Während des 5. Weltsymposiums der pulmonalen Hypertonie

2013 wurde der PVR zur besseren Charakterisierung der präkapillären PH herangezogen, stellt aber noch kein etabliertes Kriterium dar^{29,36}.

Im Gliederungspunkt der PH, die im Rahmen einer alveolären Hypoxie oder chronischen Lungenerkrankung entsteht, stellt die COPD (Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung) das häufigste Erscheinungsbild dar³⁷. Bis zu 90% aller COPD Patienten entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung eine pulmonale Hypertonie³⁸. Die chronisch alveoläre Hypoxie bedingt eine anhaltende HPV sowie pathologische Umbauprozesse des Lungengewebes¹⁰. Toxine, die vor allem durch Zigarettenrauch inhaliert werden, besitzen ebenfalls einen starken Einfluss auf die Pathogenese²⁰. Im fortgeschrittenen Stadium führen sie zum klinischen Bild des Cor pulmonale.

Des Weiteren werden die PH aufgrund pulmonaler Entwicklungsstörungen oder die PH aufgrund von Extrembedingungen, insbesondere als Folge längerer Aufenthalte in großen Höhen, dieser Gruppe zugeordnet.

In der vierten Gruppe (Tabelle 2) werden PH durch chronisch thromboembolische Ereignisse klassifiziert. Thromben lagern sich am Endothel der elastischen pulmonalen Arterien an und ersetzen die Intima, woraus eine Lumenreduktion oder ein vollständiger Verschluss des Gefäßes resultiert^{20,29}. Die fünfte Gruppe fasst Erkrankungen zusammen, die nicht den vier vorherigen Gruppen zuzuordnen sind. Beispiele für Auslöser einer PH sind hierbei die Sarkoidose oder durch obstruktives Wachstum den Luftweg einengende Tumore oder Lymphknoten. Die pulmonale Hypertonie aufgrund der Zystischen Fibrose (CF) ist ebenfalls dieser Kategorie zuzuordnen³⁹.

1.2.2 Klinik und Diagnostik der pulmonalen Hypertonie

Die Klinik der PH ist sehr vielfältig. Zu Beginn der Erkrankung sind die Symptome unspezifisch, sie treten meist nur vereinzelt auf. Im weiteren Verlauf nehmen die Beschwerden jedoch zu. Die Diagnose wird sehr häufig spät gestellt, denn die Symptome werden oft anderen Erkrankungen, einer geringen Patientenkonstitution oder dem hohen Alter zugeordnet¹. Die Diagnosestellung erfolgt häufig erst nach Voranschreiten der Symptomatik. Mehr als 20% der Patienten haben PH Symptome für länger als zwei Jahre, bevor eine Diagnose gestellt wird⁴⁰.

Initial wird die PH aufgrund des zunehmenden inadäquaten Herzminutenvolumens unter Belastung symptomatisch, die körperliche Leistungsfähigkeit nimmt ab und es

kommt zu rascher Ermüdung des Patienten⁴¹. Im Verlauf der Erkrankung können Schwindel oder Sinustachykardien sowie Ruhedyspnoe auftreten. Aufgrund zunehmender Wanddicke des rechten Ventrikels können Brustschmerzen und Herzrhythmusstörungen entstehen⁴². Beim dekompensierten Cor pulmonale mit Rechtsherzinsuffizienz treten zusätzlich Zeichen der Leberstauung sowie periphere Ödeme und Halsvenenstauung auf⁴³.

Die klinischen Symptome der PH werden analog der New York Heart Association Skala (NYHA) in vier Gruppen untergliedert⁴⁴. Der ersten Gruppe werden alle Patienten mit PH zugeordnet, die keine klinischen Symptome unter Belastung oder in Ruhebedingungen aufweisen. In Gruppe zwei befinden sich Patienten mit leichten Belastungsschwierigkeiten. Die Symptome Ermüdbarkeit, Belastungsdyspnoe, Brustschmerzen oder Synkopen treten nur bei schwerer bis starker Belastung auf. In der dritten Gruppe treten die klinischen Symptome unter leichter Belastung auf, jedoch bleiben die Patienten unter Ruhebedingungen symptomfrei. PH Patienten mit Rechtsherzversagen oder Patienten, die klinische Symptome unter Ruhebedingungen, beziehungsweise sofortige Beschwerden unter minimaler Belastung aufweisen, werden der vierten Gruppe zugeordnet.

Besteht der Verdacht einer PH, wird eine nicht invasive Doppler Echokardiographie zur Quantifizierung des systolischen PAP empfohlen⁴⁵. Sie stellt die Screening Methode der ersten Wahl dar. Kann in der Echokardiographie eine signifikante Linksherzerkrankung nachgewiesen werden, welche eine PH erklärt, ist die Diagnose einer PH der Gruppe 2 gestellt. Dies ist zumeist unter massiver linksventrikulärer systolischer Dysfunktion oder schwerer Aorten- oder Mitralklappenerkrankung gegeben⁴⁵. Falls die Diagnose noch nicht gestellt ist, der Verdacht einer PH jedoch weiterhin besteht, sollten Lungenfunktionstests, nächtliche Sauerstoffmessungen beziehungsweise Polysomnographien und laborchemische Untersuchungen (zum Beispiel HIV-Serologie, Leberenzyme, Autoimmunserologie) durchgeführt werden^{29,37}. Zudem sollte eine Ventilations-Perfusions-Szintigraphie zum Ausschluss einer thromboembolischen PH erfolgen⁴⁶. Häufig kann in fortgeschrittenen Fällen an dieser Stelle bereits die Diagnose einer PH gestellt werden. Besteht weiterhin der Verdacht ohne eindeutigen Nachweis der PH, erfolgt die exakte Diagnose mittels Rechtsherzkatheter²⁰. Zur Erfassung des Schweregrades der PH und Überwachung oder Beginn einer spezifischen

medikamentösen PH Therapie werden die pulmonalarteriellen Drücke mittels Rechtsherzkatheter invasiv gemessen^{1,29}.

Um dem Voranschreiten der PH entgegenzuwirken, ist eine frühzeitige Diagnose nach Auftreten der ersten Symptome zu stellen. Aufgrund der unspezifischen Symptome sollte differentialdiagnostisch eine PH ausgeschlossen werden. Zumeist weisen Klappenvitien oder eine beginnende Rechtsherzhypertrophie in der Echokardiographie frühzeitig auf eine PH hin⁴⁷. Ein prominenter Pulmonalvenenhilus im Röntgenthorax oder pathologische Angiographien der Lungen sowie PH in der Familienanamnese können ebenfalls auf eine PH hindeuten^{1,33}.

1.2.3 Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie

Die pathophysiologischen Mechanismen der PH unterscheiden sich in den jeweiligen Klassifikationen. Sie beruhen meist auf den Prozessen des Remodellings (histologische Umbauprozesse), der Vasokonstriktion, thromboembolischer Ereignisse und der Inflammation³³. In bestimmten PH Untergruppen besteht zusätzlich eine genetische Pathogenese⁴⁸. In einigen Modellen wird die PH auch als eine Panvasculopathie beschrieben, beinhaltet jedoch alle zuvor genannten Veränderungen⁴⁵.

Eine temporäre Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes aufgrund von Vasokonstriktion oder kleiner Emboli ist prinzipiell reversibel. Erhöht sich der PAP_m jedoch langfristig, finden pathologische Umbauprozesse besonders in den distalen Pulmonalarterien statt.

1.2.3.1 Remodelling der pulmonalen Strombahn

Der Begriff Remodelling ist gleichbedeutend mit zellulären Umbauprozessen. Diese finden im Speziellen im pulmonalen Gefäßsystem statt. Infolge der PH und den damit einhergehenden hypoxischen Verhältnissen treten Umbauprozesse an der Intima, der Media und der Adventitia auf³.

Die Dehnbarkeit der Adventitia mit ihren durchzogenen Gefäßen ist durch chronische Druckerhöhung im pulmonalen System verringert. Metalloproteinasen führen zur Vermehrung von Extrazellulärmatrix. Die einhergehende Versteifung der elastischen

proximalen Pulmonalarterien bewirkt eine verminderte Dehnbarkeit des Gefäßsystems und somit einen erhöhten PVR².

Zellumwandlungen und Einwanderung von pulmonalarteriellen Gefäßmuskelzellen (PASMCs) führen zu einer Verdickung der Muskelschicht vor allem distaler Gefäße, die eine verringerte Dehnungsfähigkeit dieser bewirken¹⁹. Gleichzeitig bewirkt eine Mediaverdickung mittelgroßer Gefäße und kleiner Arteriolen eine Verstärkung der Vasokonstriktion, welche zum Beispiel durch Hypoxie induziert wird²⁴. Die Verdickung der Gefäßmuskelschicht lässt sich histologisch nachweisen. Unter physiologischen Bedingungen weisen pulmonalarterielle Gefäße unterhalb eines Durchmessers von 50µm selten eine geschlossene PASMC Schicht auf, jedoch ist diese bei chronisch pulmonaler Hypertonie regelmäßig nachweisbar¹⁹. Untersuchungen dieser Dissertation bestätigen diese Erkenntnis. Interessanterweise zeigten Arbeitsgruppen bereits eine Beteiligung des Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Kanals, welcher in dieser Dissertation untersucht wird, an der Hypoxie induzierten Migration von PASMCs^{49,50}. Der Kanal wird im nachfolgenden Gliederungspunkt 1.4 beschrieben.

Der genaue Mechanismus der PASMC Proliferation ist noch nicht eindeutig geklärt. Untersuchungen zeigten bisher, dass es unter chronischer Hypoxie zu Depolarisation von Kaliumkanälen kommt und somit das Wachstum der PASMC gefördert und die Apoptose verhindert wird^{51,52}. Ein weiterer entscheidender Bestandteil der Signaltransduktion des Remodellings und der chronisch hypoxischen Vasokonstriktion ist die Rho Kinase. Die Hypoxie initiierte Aktivierung der Rho Kinase führt zu einer PASMC- und Endothelzellmigration sowie Proliferation^{10,50}. Dies konnte auch an PH Modellen nachgewiesen werden¹⁸.

Betrachtet man die Umbauprozesse auf endothelialer Ebene kommt es zur Intimahypertrophie sowie zur Schädigungen der Endotheloberfläche, welche mit einer Gefäßlumeneinengung einhergeht³. Auf endothelialer Rezeptorebene, sind drei Mechanismen zu nennen, die das Remodelling beeinflussen: der Bone Morphogenetic Protein Receptor-2 und -4 (BMPR2, BMPR4), der Endothelin-1 Rezeptor und der Serotoninrezeptor. Untersuchungen zum BMPR2 und -4 zeigten unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit der Lokalisation der PASMC. Eine Aktivierung von BMPR2 und -4 bewirkt eine Wachstumsinhibierung von proximalen PASMCs, hingegen bewirkt eine Aktivierung des BMPR4 distaler PASMC eine Wachstumsinitiierung³. Genetische Defekte dieser beiden Rezeptoren können zu einer idiopathischen PAH führen⁴⁸. Ein

anderer Mechanismus ist der Endothelin-1 Rezeptor. Nach Aktivierung dieses Rezeptors kommt es zu einer Vasokonstriktion, Migration und Proliferation von Gefäßzellen⁵³. Diese wird durch die Aktivierung der Rho Kinase, einer Inaktivierung von Kaliumkanälen und einer intrazellulären Kalziumerhöhung hervorgerufen³. Aus diesem Grund sind Endothelinrezeptorantagonisten ein fester Bestandteil der PAH Therapie, da sie gleichzeitig auf die Vasokonstriktion und das Remodelling Einfluss nehmen. Die dritte Gruppe bilden die Serotoninrezeptoren, welche nach Aktivierung eine vermehrte Proliferation von PSMCs und Remodelling bewirken³.

Pulmonale Venen sind in den Umbauprozessen des Remodellings bis auf zwei Ausnahmen nicht betroffen. Die erste Ausnahme bildet die pulmonale veno-okklusive Erkrankung, in der Venolen und septale Venen ähnlich der Arteriolen an den Umbauprozessen beteiligt sind⁵⁴. Die zweite Ausnahme stellt die große Gruppe der pulmonalen Hypertonie aufgrund von Linksherzpathologien dar⁵⁵. Es kommt analog zur veno-okklusiven Erkrankung, zu einer Erhöhung des pulmonalvenösen Druckes über 15mmHg und zu Veränderungen des venösen Stromgebietes. Strukturelle Umbauprozesse konnten im gleichen Ausmaß an der Intima, Media und Adventitia arterieller und venöser Gefäße nachgewiesen werden⁵⁵.

Ein zentraler Bestandteil morphologischer Umbauprozesse bilden inflammatorische Prozesse, welche zu einer vermehrten Zelleinwanderung und Zellproliferation führen^{15,56}. Sie werden im folgenden Gliederungspunkt (Abschnitt 1.2.3.3) detaillierter beschrieben.

1.2.3.2 Vasokonstriktion der pulmonalarteriellen Gefäße

Neben der hypoxischen Vasokonstriktion führt ein chronisch erhöhter pulmonalarterieller Druck aufgrund der veränderten mechanischen Kräfte an der Gefäßwand zu einer progressiven Endotheldysfunktion, die gekennzeichnet ist durch eine verminderte Ausschüttung von Vasodilatoren mit ihren teilweise antiproliferativen Eigenschaften sowie eine vermehrte Freisetzung von Vasokonstriktoren, die eine Thrombozytenaggregation fördern und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen induzieren können^{15,16,57}. Wichtige Vertreter der physiologisch vorhandenen vasokonstriktiven Substanzen sind das Thromboxan A₂ (TXA₂), das Serotonin und das Endothelin-1 (ET1). Dem gegenüber stehen die vasodilatativen Mediatoren NO und

Prostacyclin (PGI_2), die eine thrombozytenaggregationshemmende Wirkung besitzen⁵⁸. Resultierend aus dem Missverhältnis der vasoaktiven Substanzen kommt es zur chronischen Vasokonstriktion und mittelbar zum Gefäßumbau.

Die Gefäßkonstriktoren bewirken über membranständige G-Proteine einen Proteinkinase C und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) vermittelten intrazellulären Kalziumanstieg^{3,18,19}. Die zellulären Kaliumkanäle werden geblockt und bewirken eine Depolarisation der Zellmembran, wodurch extrazelluläres Kalzium (Ca^{2+}) intrazellulär einströmt. Der intrazelluläre Kalziumanstieg und der bereits zuvor aktivierte Botenstoff IP_3 führen zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Daraus resultieren Myosinleichtketten Phosphorylierungen mit folgender Aktin-Myosin Interaktion in den PASMCs. Zusätzlich werden Thrombin und Serotonin, beides plättchenaktivierende Faktoren, ausgeschüttet und begünstigen eine Anlagerung von Thrombozyten⁵⁴.

Dieses Missverhältnis der vasoaktiven Mediatoren wurde in Untersuchungen an Patienten mit chronischer pulmonaler Hypertonie bestätigt^{55,57-59}. Die Messwerte ergaben eine verstärkte Expression von ET-1 und TXA_2 sowie eine Verminderung der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthese und PGI_2 Ausschüttung^{16,59}. Des Weiteren ist bekannt, dass die idiopathische PH, die portale pulmonale Hypertonie sowie die HIV assoziierte PH eine erniedrigte Prostazyklinsynthese aufweisen⁶⁰. Die Vasokonstriktion wird somit durch die reduzierte Freisetzung vasodilatativer Substanzen zusätzlich verstärkt.

1.2.3.3 Inflammation als Bestandteil des Pathomechanismus

Neue Erkenntnisse belegen, dass Entzündungsprozesse der Gefäßwand nicht nur in Folge der Umbauprozesse der PH entstehen, sondern diese Krankheit auch primär hervorrufen^{15,61,62}. Die Einwanderungen von Immunzellen in das umliegende Gewebe und der Nachweis von Autoantikörpern wie dem Zell assoziierten nukleären Faktor von aktivierten T-Lymphozyten (NFAT), der auch von Endothelin-1 getriggert wird, wurde bereits nachgewiesen⁶². Die Produktion von Interleukin 1β im Rahmen inflammatorischer Prozesse stimuliert die Bildung von ET-1 und PDGF, welche zu pulmonalen Remodelling führen⁶³. Auch zeigten Untersuchungen von Becker und Kollegen die Bedeutung von ET-1- und AT-II-Rezeptorantikörpern in der Pathogenese

der Systemischen Sklerose assoziierten PAH⁶⁴. Dabei wurde ein vermehrtes Vorkommen von ET-1- und AT-II- Rezeptorantikörpern bei einer Systemischen Sklerose assoziierten PAH nachgewiesen, welche eine verstärkte pulmonale Vasokonstriktion und pulmonales Remodelling induzieren. Die proliferative Wirkung von Mastzellen auf das pulmonale Gefäßsystem und damit der Einfluss auf die Entstehung von PAH soll an dieser Stelle ebenfalls angemerkt werden¹⁵. Auf detaillierte inflammatorische Prozesse wird in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen.

1.2.3.4 Thromboembolische Pathogenese

Es werden je nach Größe des Embolus unterschiedlich große Lungenareale von der Perfusion abgeschnitten, wonach die klinischen Symptome unterschiedlich stark auftreten. Pathologische Ursache der chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie ist vorwiegend eine Obstruktion oder der vollständige Verschluss größerer Lungengefäße. In einem Großteil der Fälle (circa 75%) tritt die chronisch thromboembolische PH als Langzeitkomplikation einer pulmonalen Embolie auf, jedoch ist bei etwa der Hälfte der Fälle auch eine asymptomatische venöse Thromboembolie nachweisbar⁶⁵.

Der Verschluss verkleinert das Volumen des Gefäßes. Dadurch können zusätzliche Umbau- und inflammatorische Prozesse aktiviert werden⁶⁶. Treten gleichzeitig mehrere Querschnittseinengungen auf oder ist ein großer Lungenast betroffen, kommt es zur Erhöhung des Lungengefäßwiderstandes PVR. Die kleinen Embolien führen über einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren zur Schädigung des Gefäßendothels, wodurch eine Thrombozytenaggregation begünstigt wird⁶⁵. Aktivierte Thrombozyten setzen wiederum pro-inflammatorische, vasokonstringierende und den Gefäßumbau induzierende Faktoren frei. Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen wandern in die geschädigten Gefäße ein, verursachen eine exzentrische Intimafibrosierung und Mediahypertrophie, und verhindern gleichzeitig eine Apoptose der glatten Gefäßmuskelzellen⁶⁵.

Das Ergebnis dieser vier Prozesse (Remodelling, Vasokonstriktion, Inflammation, Thromboembolie) ist eine Reduzierung des Gesamtquerschnittes der arteriellen Lungenstrombahn. Bleibt die Flussgeschwindigkeit und somit die Herzfrequenz unverändert, resultiert eine pulmonalarterielle Druckerhöhung. Der PAP Anstieg führt zu

einer Mehrbelastung des rechten Herzens, die auf Dauer mit einer Dysfunktion des rechten Ventrikels einhergeht²⁰. Die vermehrte Druckbelastung wird zunächst mit einer Hypertrophie des rechten Ventrikels kompensiert. Jedoch können fibrotische Umbauprozesse mit der Zeit zu einer Ventrikeldilatation führen. Aus der verminderten Füllung des linken Ventrikels resultiert eine linksventrikuläre Funktionsstörung, solange eine Linksherzdysfunktion nicht als Auslöser der pulmonalen Hypertonie auszumachen ist. Letztendlich resultieren alle Mechanismen in einem Rechtsherzversagen.

1.2.3.5 Genetische Pathogenese

Die genetischen Ursachen der pulmonalen Hypertonie spielen besonders für idiopathische und hereditäre PAH Formen eine bedeutende, jedoch in den allgemeinen Pathomechanismen der anderen PAH Formen nur eine begrenzte Rolle³¹. Aktuell sind bereits über 100 genetische Defekte, die zu einer PAH führen, beschrieben. Die häufigsten prädisponierenden genetischen Veränderungen, die zur idiopathischen oder hereditären PAH führen, stellen Mutationen des Bone Morphogenetic Protein Rezeptor-2 (BMPR2) dar, welcher ein Rezeptor für Mediatoren der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Familie ist⁴⁸. Infolge einer Mutation des BMPR2 kommt es zur überschießenden Proliferation sowie abnehmenden Differenzierung von pulmonalarteriellen Gefäßmuskelzellen (PASMC)⁶⁷. Gleichzeitig resultiert ein Fehlen des BMPR2 in einer vermehrten Apoptose der pulmonalen Endothelzellen und begünstigt so möglicherweise zu einem frühen Zeitpunkt die PAH Entstehung⁶⁸.

Selten können Transient Receptor Potential (TRP) Kanalveränderungen auftreten. Diese gehen vor allem mit skelettalen Veränderungen einher⁶⁹. Die TRP Familie mit dem Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Kanal ist Bestandteil der Experimente dieser Dissertation und wird im Gliederungspunkt 1.4 beschrieben.

1.2.4 Therapie der pulmonalen Hypertonie

In den letzten Jahren ergaben sich, basierend auf intensiven Forschungen zur pulmonalen Hypertonie, wichtige Neuerungen und Verbesserungen bezüglich des Resultats, der Exazerbation sowie der Symptombehandlung der pulmonalen Hypertonie. Die medikamentöse Therapie hat in den letzten Jahren zu einer Reduktion

der Sterblichkeit um 43% geführt⁷⁰. Neben den medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten spielen besonders zu Beginn der Erkrankung alternative Therapien eine entscheidende Rolle. Zu ihnen gehören leichtes körperliches Training sowie Vermeidung von belastenden Ereignissen. Es ist empfohlen, dass alle PH Patienten eine Immunisierung gegenüber häufigen respiratorischen Keimen wie Influenza oder Streptokokkus pneumoniae erhalten. Eine Reduzierung des Salzkonsums wird in den aktuellen Leitlinien der Europäischen Kardiologischen Gesellschaft nicht empfohlen⁴⁵. Ein großer Risikofaktor der pulmonalen Hypertonie sind Schwangerschaften. In einem Review wurden die publizierten Fälle zusammengefasst und ergaben bei Patienten mit PH Mortalitätsraten von 30 bis 56%, weshalb eine Schwangerschaft bei Patientinnen mit PH relativ kontraindiziert ist⁷¹. Kardiale Arrhythmien der Patienten sollten therapiert werden um eine Progredienz der PH zu verhindern.

Supportive Therapiemaßnahmen der pulmonalen Hypertonie umfassen eine antikoagulative Therapie (Ziel INR 2-3), die Gabe von Diuretika, insbesondere bei PH aufgrund von kardialen Erkrankungen, und O₂ Applikation, vor allem bei COPD Patienten im späten Stadium und einer O₂ Sättigung unter 90%. Zudem sollten alle Patienten eine absolute Nikotinkarenz einhalten und Übergewicht aufgrund der resultierenden verringerten Belastbarkeit vermeiden³³.

Diese symptomatischen Therapieansätze greifen kaum in die pathologischen Prozesse der Erkrankung ein. Häufig wird damit einzig die Exazerbation verzögert. Besonders in den letzten zwei Jahrzehnten ergaben sich aufgrund der intensiven medizinischen Forschung neue Therapiemöglichkeiten, welche die Mortalitätsrate stark reduzierten⁷⁰.

1.2.4.1 Kalziumkanalblocker

Hauptsächlicher Wirkansatz der Kalziumkanalblocker ist die erste Klassifikationsgruppe (Tabelle 2), die pulmonalarterielle Hypertonie. Dabei sprechen häufig nur Patienten mit einem positiven Vasodilatortest, welcher nach Applikation eines Vasodilatators (vor allem NO) einen akuten Abfall des PAP_m bei normalem Herzminutenvolumen bewirkt, auf die Therapie mit Kalziumkanalblockern an⁷². Dies betrifft zumeist nur Patienten mit idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie. Die Langzeitbehandlung ergab eine verlängerte Überlebensrate unter der Nutzung von Nifedipinen, Diltiazem oder

Amlodipin⁷³. Dabei werden Amlodipin und Nifedipin vorzugsweise bei bradykarden und Diltiazem bei tachykarden Patienten angewandt. Ergeben sich bei den Patienten jedoch keine Verbesserungen, sind die Kalziumkanalblocker aufgrund potenzieller schädlicher Nebenwirkungen wie negativer Inotropie und systemischer Vasodilatation rasch abzusetzen. Aufgrund dieser unerwünschten Arzneimittelwirkungen spielen vor allem die Kalziumantagonisten vom Diltiazemtyp sowie jene vom Nifedipintyp eine zunehmend untergeordnete Rolle⁴³.

1.2.4.2 Prostanoid

Ein klassischer Vertreter der Prostanoid ist das Prostacyclin (PGI_2), welches vasodilatative und antiproliferative Eigenschaften besitzt. Diese werden nach Aktivierung der Adenylatzyklase in den glatten Muskelzellen über die Bildung von cAMP erreicht. Zusätzlich bewirkt PGI_2 die stärkste endogene Plättchenaggregationshemmung⁷⁴. Ausgenommen der inhalativen Applikationen sind Prostanoid bei Erkrankungen des linken Herzens relativ kontraindiziert, da eine systemische Vasodilatation den linken Ventrikel noch stärker belasten würde⁷⁵. Eine aktuelle Untersuchung zu PH aufgrund von Linksherzerkrankungen am Tiermodell zeigt eine Reduzierung des PAP_m unter inhalativer Vasodilatatortherapie⁷⁶.

Epoprostenol, ein Vertreter der intravenös (i.v.) applizierten Prostacycline, zeigte in Studien eine gesteigerte Lebenserwartung sowie eine verbesserte Hämodynamik bei Patienten mit PAH Klassen III und IV (nach NYHA)⁷⁷. Jedoch ist der Umgang mit diesem Medikament aufgrund der geringen Halbwertszeit von 8 Minuten und der damit verbundenen Notwendigkeit einer dauerhaften intravenösen Applikation via Verweilkatheter sehr schwierig. Zu Beginn lag Epoprostenol meist nur gefriergetrocknet vor, jedoch erbrachten aktuelle Entwicklungen eine Verbesserung von Epoprostenol und machten es thermostabil³³. In Langzeituntersuchungen ergaben sich zudem erhebliche Nebenwirkungen: Kopfschmerzen, erhöhte Infektionsgefahr aufgrund des Dauerkatheters, Flush sowie plötzlicher Tod bei abruptem Abbruch der Medikamentengabe⁴⁵.

Eine Weiterentwicklung des Epoprostenols aufgrund seiner schwierigen Applikationsform und den zahlreichen Nebenwirkungen stellt das langlebige Prostanoid-Analogon Iloprost dar, welches als erstes PH Therapeutikum inhalativ

appliziert werden konnte⁷⁸. Das weiter verbesserte Treprostinil kann subkutan (s.c.), inhalativ aber auch i.v. appliziert werden. Dieses ist für die PAH der Klassen II bis IV zugelassen, zeigte jedoch häufig an der Applikationsstelle Erytheme und Schmerzen, die zum vorzeitigen Abbruch der Therapie führten⁷⁹.

Treprostinil und Iloprost sind stabile, inhalativ verabreichbare Prostacycline. Aufgrund der inhalativen Applikation können systemische Nebenwirkungen weitgehend vermieden werden. Die Perfusion der gut belüfteten Areale kann aufgrund medikamentöser Vasodilatation und der Verhinderung des Remodellings verbessert werden. Wenig belüftete Lungenareale sind dabei von der Wirkung des Aerosols kaum betroffen. Untersuchungen zeigten Verbesserungen der Belastbarkeit, gemessen mit Hilfe des 6-Minuten-Gehtestes, dem PAP_m sowie des Herzminutenvolumens⁸⁰.

Nach den europäischen Leitlinien der pulmonalen Hypertonie werden noch keine oral wirkenden Prostaglandine oder Prostaglandinanaloga empfohlen, die eine signifikante Verbesserung der Behandlung der PH erreichen (Stand 2013)⁸¹.

1.2.4.3 Endothelin-Rezeptor Antagonisten

Endothelin entfaltet seine Wirkung über den G-Protein gekoppelten Endothelinrezeptor A (ET_A) und den Endothelinrezeptor B (ET_B)⁵³. Der ET_A Rezeptor ist im kardiovaskulären System besonders auf den glatten Muskelzellen sowie den Kardiomyozyten exprimiert. Hingegen ist der ET_B Rezeptor auf PSMCs sowie auf Endothelzellen ausgebildet⁸². Erfolgt eine unspezifische Stimulation beider Rezeptoren der glatten Muskelzellen, kommt es zu einer Vasokonstriktion, zusätzlich wird eine Proliferation und Migration der PSMC initiiert⁵³. Endothelin aktiviert weiterhin die Proteinkinase C sowie bestimmte Wachstumsfaktoren, wodurch eine Proliferation des Endothels angeregt wird. Gleichzeitig werden Mediatoren, welche die Thrombozytenaggregation fördern, ausgeschüttet. Dem gegenüber führt die Aktivierung des ET_B Rezeptors an den Endothelzellen zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Prostacyclin⁸².

Medikamentös kann in diesen Prozess selektiv an einem der beiden Rezeptoren, nicht-selektiv durch Blockade sowohl des ET_A- als auch des ET_B Rezeptors, sowie durch Hemmung des Endothelin-converting Enzyms eingegriffen werden. Bosentan, ein Vertreter der nicht selektiven Blockade von ET_A- und ET_B Rezeptoren, zeigte in Studien

klinische (Abnahme der Belastungsdypnoe, bessere Ergebnisse im 6-Minuten-Gehtest) und physiologische (PAP_m reduziert, Erhöhung Herzminutenvolumen) Verbesserungen sowie eine reduzierte Hospitalisierung und Mortalität⁸³. Das Medikament wird oral eingenommen und findet in der Patientengruppe II-IV (nach NYHA) der PH Anwendung. Allerdings sollte die reduzierte Wirkung von Kontrazeptiva unter Bosentantherapie beachtet werden⁸³. Aufgrund der hepatotoxischen Eigenschaften von Bosentan wurden neue Medikamente entwickelt. Sitaxentan, ein selektiver ET_A Rezeptor Blocker, welcher Bosentan in seiner Wirkung ähnelte, wurde jedoch nach zwei Berichten von fulminantem Leberversagen mit Todesfolge in Deutschland wieder vom Markt genommen⁸⁴. Ein weiterer selektiver ET_A Rezeptor Blocker, das Ambrisentan, erwies in Langzeitstudien signifikante Verbesserungen in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie und wurde für die Funktionsklasse II und III nach NYHA zugelassen⁸⁵. Macitentan, ein neu entwickelter nicht selektiver Endothelinrezeptorantagonist, zeigte in Studien gegenüber Bosentan eine verbesserte Gewebegängigkeit und eine höhere Rezeptoraffinität⁸⁶. Ob die Verbesserungen der Symptome nach medikamentöser Behandlung auf eine verminderte Vasokonstriktion der PSMCs oder reduziertes Remodelling zurückzuführen sind, ist weiterhin unklar³.

1.2.4.4 Phosphodiesteraseinhibitoren

Phosphodiesterase-5 (PDE-5) deaktiviert den intrazellulären Botenstoff cGMP, welcher als second messenger an der Signalkaskade der Stickstoffmonoxid (NO) vermittelten Vasodilatation beteiligt ist. Folglich vermindert eine Inhibierung der Phosphodiesterase-5 den Abbau von cGMP und erhöht dadurch die intrazelluläre cGMP Konzentration, wodurch vasodilatatorische Effekte verstärkt werden⁸⁷. Interessanterweise konnte eine erhöhte Expressierung von PDE-5 in PSMCs unter chronischer Hypoxie nachgewiesen werden⁸⁸.

Sildenafil, welches ebenfalls bei der erektilen Dysfunktion zugelassen ist, stellt einen Vertreter der PDE-5 Inhibitoren dar. Es zeigt signifikante hämodynamische-, symptomatische Verbesserungen sowie eine Steigerung der Belastbarkeit und ist für die Funktionsklasse II und III (nach NYHA) der PH zugelassen⁸⁹. Jedoch sollte die Dosis bei Patienten mit Leber- und Nierenschäden aufgrund des veränderten

Metabolismus von Sildenafil angepasst werden. Ein weiterer PDE-5 Inhibitor ist Tadalafil, welcher eine längere Halbwertszeit besitzt und nur einmal täglich verabreicht werden muss⁹⁰.

Der lösliche Guanylatzyklase Stimulator Riociguat ist eine Neuentwicklung, der direkt am NO Rezeptor ansetzt. Randomisierte kontrollierte Studien zeigten eine Abnahme der Belastungsdyspnoe, Verbesserung der Ergebnisse im 6-Minuten-Gehtest und eine PAP_m Reduzierung⁹¹.

1.2.4.5 Invasive Therapien

Als ultima ratio in der Therapie der PH stehen chirurgische Therapieverfahren zur Verfügung. Meist werden sie im Stadium III und IV (nach NYHA) palliativ oder als Überbrückungszeit bis zur Lungentransplantation eingesetzt, denn die Mortalitätsrate des invasiven Eingriffs ist immer noch sehr hoch.

Die Ballon dilatierende atriale Septostomie, in der ein Rechts-Links-Shunt zwischen den Vorhöfen erzeugt wird, ist die am häufigsten durchgeführte Variante⁹². Dabei wird der Druck im rechten Ventrikel entlastet und es kommt zu einer Senkung des PAP_m. Gleichzeitig unterstützt der Shunt die Füllung des linken Ventrikels und verbessert somit das Herz-Zeit-Volumen. Die Sauerstoffversorgung des Körpers wird trotz des Shunts und der damit verbundenen reduzierten Oxygenierung des Blutes durch die Erhöhung des HZV verbessert⁹³. Jedoch wird die atriale Septostomie für Patienten im Endstadium der PH aufgrund der hohen Sterblichkeit nicht empfohlen⁹⁴.

Die letztmögliche Therapie einer PH stellt die Lungentransplantation dar. Diese sollte erfolgen, bevor es zu einem Rechtsherzversagen kommt⁹⁵. Meist handelt es sich um eine bilaterale sequentielle Lungentransplantation. Dies kann jedoch in unterschiedlichen Therapiezentren und PH Gruppen variieren. Die 5- beziehungsweise 10-Jahres-Überlebenszeit nach einer Herz-Lungen-Transplantation beträgt nach aktueller Studienlage 50- beziehungsweise 39%⁹⁶. Die 5- beziehungsweise 10-Jahres-Überlebenszeit nach einer bilateralen Lungentransplantation wird mit 52- beziehungsweise 43% angegeben⁹⁶.

In einem bestimmten Fall ist eine chirurgische kurative Therapie der PH möglich. Mittels einer pulmonalen Endarteriektomie kann eine chronisch thromboembolische PH behandelt werden³³.

Zusammenfassend sei an dieser Stelle erwähnt, dass sich die meisten dieser Therapien derzeit auf die Anwendung bei der PAH beschränken. In bestimmten Situationen sind verschiedene Medikamente kontraindiziert. So zeigten Untersuchungen eine erhöhte Sterblichkeit bei PH Patienten aufgrund von Linksherzerkrankungen unter der Therapie mit dem Prostanoid Epoprostenol⁴⁵. Dies ist unter anderem auf die gesteigerte Linksherzbelastung zurückzuführen⁹⁷. Ein weiteres Beispiel bildet die Gruppe der COPD Patienten mit PH, denn unter oraler Einnahme von Sildenafil kommt es zu einer Verschlechterung der Sauerstoffsättigung im Blut⁹⁸.

In Abhängigkeit von den Komorbiditäten, vom Schweregrad der Erkrankung und Medikamentennebenwirkungen sollte mit der medikamentösen Behandlung von Phosphodiesterase-5-Inhibitoren oder Endothelin Rezeptor Antagonisten bei PAH Patienten begonnen werden. Empfehlenswert wäre eine Kombinationstherapie, da Nebenwirkungen einzelner Medikamente reduziert und die Ansprechbarkeit der Behandlung erhöht werden kann. Für PH Patienten der Klassifikationsgruppe 2-5 (siehe Tabelle 2) sollten die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Therapeutika evaluiert und für jeden Patienten individuell entschieden werden.

1.3 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

Der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) ist ein Bestandteil der ABC Transmembranproteinfamilie, der aktiv mit Hilfe einer ATP Kaskade spezifische Substanzen über die Zellmembran transportiert. Im Speziellen ist es ein Chloridkanal, der vor allem in Epithelzellen von verschiedenen Organen wie dem Pankreas, der Lunge, der Niere und dem Gastrointestinaltrakt vorkommt^{99,100}. Funktionsstörungen des CFTR Kanals führen zu unregelmäßigem Transport von Chloridionen durch das Epithel, was eine Vielzahl von Organen und Organsystemen beeinflusst und die Produktion von zähflüssigen Sekreten bewirkt¹⁰⁰. Es kommen verschiedene CFTR Genmutationen vor, die zu einer autosomal rezessiven Erkrankung, der Zystischen Fibrose (=Mukoviszidose) führen. Dabei beträgt die homozygote Erkrankungshäufigkeit 1 unter 2.500 Geburten¹⁰¹.

Je nach Art der CFTR-Mutation treten unterschiedlich ausgeprägte Verläufe der Erkrankung auf. Eine schwerwiegende und markante Folge der Erkrankung ist die

voranschreitende Dyspnoe, die besonders von rezidivierenden bis chronischen Lungeninfektionen ausgelöst wird¹⁰⁰. Pathophysiologisch kommt es zu einem Ventilations-Perfusions Missverhältnis sowie zur Ausbildung intrapulmonaler Shunts¹⁰². Diese führen auf vaskulärer Ebene zur hypoxischen Vasokonstriktion nach dem Euler-Liljestrand-Mechanismus. Es existieren viele Untersuchungen zur Pathogenese der Zystischen Fibrose, jedoch sind kaum Studien bekannt, die sich mit dem Einfluss des CFTR Kanals auf chronisch hypoxisches Remodelling und der Vasokonstriktion befassen. Nach bisherigem Kenntnisstand sind CFTR Transmembranproteine in PASMC exprimiert und vermutlich an den Mechanismen der chronischen PH beteiligt¹⁰³.

Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass der ABC Transporter CFTR direkt am Mechanismus der hypoxischen Vasokonstriktion beteiligt ist, denn auf molekularer Ebene wird der Chloridstrom des Kanals durch die Phosphorylierung der regulatorischen R-Domain gesteuert. Die Enzyme Proteinkinase A und Proteinkinase II, reguliert durch cAMP- und cGMP Spiegel, katalysieren die Phosphorylierung der R-Domain^{104,105}. Beide zyklischen Monophosphate sind in der Literatur als Mediatoren der Vasodilatation im Lungengefäßsystem bekannt¹⁰⁶.

1.4 Transient Receptor Potential Vanilloid 4

Die Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle wurden in der *Drosophila melanogaster* (schwarzbäuchige Taufliege) entdeckt und nach der schnellen, impulshaften (transienten) Reaktion auf helles Licht benannt¹⁰⁷. Sie stellen eine Superfamilie von unspezifischen, hexahelikalen Ca^{2+} Kanälen dar. Zwischen dem 5. und 6. Transmembranprotein befindet sich eine Pore, ein COOH und ein NH_2 Terminus ragen ins Zytoplasma des Zellinnenraumes¹⁰⁸. Die verschiedenen TRP Kanäle kommen in einer Vielzahl unterschiedlicher Körperzellen vor. Unter ihnen befinden sich Leber-, Herz-, Lungen-, Milz- und Hodengewebe sowie Makrophagen und Neutrophile Granulozyten¹⁰⁹. In Lungenuntersuchungen erfolgte ein Nachweis insbesondere im Alveolarepithel, in pulmonalarteriellen Gefäßmuskelzellen (PASM) sowie in Gefäßendothelzellen. Auch erfolgte ein Nachweis der Kationenkanäle in Zellen des zentralen Nervensystems, in denen sie an der Signalkaskade der Sinneswahrnehmungen wie dem Sehen, der Temperatur- und Pheromonwahrnehmung

beteiligt sind¹¹⁰. Ursprünglich wurde den TRP Kanälen eine sensible Interaktion auf Temperatur und Schmerzen zugeschrieben. Heute wird davon ausgegangen, dass Drucksensoren im Gefäßendothel die aktuelle mechanische Beanspruchung messen und dadurch Regulationsprozesse initiiert werden¹¹¹. Es wurden bereits eine Vielzahl von TRP Kanälen nachgewiesen, jedoch konzentriert sich diese Dissertation auf die Betrachtung des Vanilloid abhängigen TRP Kanals.

Im Speziellen zeigten Gefäßuntersuchungen im systemischen Kreislauf nach Aktivierung des TRPV4 Kanals einen Ca^{2+} Einstrom in das Endothel, dem eine NO vermittelte Vasodilatation folgt¹¹².

Im pulmonalen Kreislauf wurde ein Zusammenhang zwischen dem TRPV4 Kanal sowie einer gesteigerten Membranpermeabilität des Endothels bewiesen¹¹³. Ein erhöhter Beatmungsdruck bewirkte einen verstärkten Ca^{2+} Einstrom in Endothelzellen der Lungengefäße, woraufhin sich ihre Membrandurchlässigkeit steigert und Lungenödeme entstehen können. Diese Untersuchungen zeigten einen Zusammenhang der Erhöhung des vaskulären mechanischen Stresses und der Aktivierung des TRPV4 Kanals. Dies lässt Rückschlüsse auf die Pathogenese von hydrostatischen Lungenödem sowie Ventilations-induziertem-Lungenödem zu¹¹³.

Weitere Studien bewiesen die ausgeprägte Rolle des Kationenkanals TRPV4 gegenüber anderen mechanosensitiven Kanälen. Bei erhöhtem intravasalem Druck beeinflusst er als Einziger die endotheliale Reaktion der Lungengefäße maßgebend. Dennoch ist unklar, ob der TRP Kanal als direkter Sensor von mechanischen Stimuli reagiert oder nur einen Teil der Signalkaskade darstellt und von einem noch unbekanntem Mechanismus eingeleitet wird¹¹¹.

Inwieweit der TRPV4 Kanal Einfluss auf Regulationsprozesse bei chronischen Druckerhöhungen im pulmonalen Gefäßsystem ausübt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Studien zeigten bisher, dass der TRPV4 Kanal eine Rolle beim chronischen Hypoxie bedingten Remodelling in der pulmonalen Gefäßbahn spielt und an der damit verbundenen Einwanderung und Proliferation von PASMC beteiligt ist⁴⁹. Folgend wird in dieser Dissertation ein grundlegender Einfluss des TRPV4 Kanals auf die Pathogenese der chronischen Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie untersucht.

1.5 Connexin 40

Connexine sind Proteine und Bestandteile der Gap junctions, die Zelladhäsionsmoleküle der interzellulären Signalübermittlung. Ein Gap junction besteht aus zwei Connexonen, die jeweils aus sechs Connexinen gebildet werden. Dabei stellt die Untergruppe Connexin 40 (Cx40) eine Besonderheit dar, sie ist im Gefäßsystem ausschließlich in Endothelzellen exprimiert¹¹⁴. Ein weiterer Nachweis von Cx40 konnte bisher im atrialen Myozyten erfolgen¹¹⁵.

In den Alveolarsepten mit den zugehörigen Alveolarkapillaren, dem Ort des Gasaustausches der Lunge bilden die Endothelzellen der Kapillaren die alleinige Zellschicht des Gefäßes. Somit ist eine Beteiligung des Cx40 Proteins an der Signalübermittlung der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion naheliegend¹¹⁶. Jedoch zeigten bisherige Studien eine Beteiligung von Cx40 an der endothelabhängigen Vasodilatation im gesamten Lungengefäßsystem^{117,118}.

Interessanterweise bewies unsere Arbeitsgruppe bereits eine erhebliche Beteiligung des Cx40 an den Signalkaskaden der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion²⁴.

2 Herleitung der Aufgabenstellung

Seit Mitte des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass die Verringerung des alveolaren Sauerstoffpartialdrucks in einem bestimmten Alveolarabschnitt zu einer Vasokonstriktion der proximalen Lungenarteriolen führt. Dies bewirkt eine effizientere Oxygenierung des Blutes, da mit Hilfe dieses Mechanismus temporären Shunts entgegengewirkt werden kann. Dieser Effekt wird nach dem Namen des Forschers als Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnet, der ihn 1946 publizierte¹¹⁹. Trotz seiner fundamentalen Bedeutung und des Einflusses auf physiologische sowie pathophysiologische Mechanismen bei einer Vielzahl von Erkrankungen und klinischen Symptomen ist dieser Vorgang bis heute nicht vollständig erklärt. Auch ist seine Bedeutung auf chronische Umbauprozesse noch nicht vollständig erforscht.

Veröffentlichte^{24,111,120,121} und noch unveröffentlichte Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass in akuten hypoxischen Situationen das Transmembranprotein Connexin 40 (Cx40) sowie der drucksensible Kationenkanal Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) am Prozess der hypoxischen Vasokonstriktion und somit am

Euler-Liljestrand-Mechanismus beteiligt sind. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der TRPV4 als einziger der TRPV-Rezeptor Familie unter chronisch hypoxischen Bedingungen in der Lunge in den PSMCs der Arteriolen verstärkt exprimiert wird¹²².

Dies lässt die Annahme zu, dass

- 1) das Cx40 Transmembranprotein an der Entwicklung der Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie sowie den pathologischen Umbauprozessen beteiligt ist,
- 2) der TRPV4 Kanal an der Entwicklung der Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie sowie den pathologischen Umbauprozessen beteiligt ist.

Auch in Studien zur Zystischen Fibrose ist ein Missverhältnis des Ventilations-Perfusions-Quotienten sowie das Auftreten von intrapulmonalen Shunts von entscheidender Relevanz¹⁰². Dieses Missverhältnis ist vereinfacht auf eine Steigerung der Viskosität des zähflüssigen Sekretes, welches die Atemwege überzieht, zurückzuführen. Aufgrund des erschwerten Abtransports des Sekretes und der daraus resultierenden rezidivierenden Infekte kommt es zur Verlegung einzelner Lungenabschnitte. In Folge des Euler-Liljestrand-Mechanismus und der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion entwickelt sich im Verlaufe der Erkrankung eine pulmonale Hypertonie, welche besonders häufig im Endstadium der Zystischen Fibrose mit einem Cor pulmonale resultiert. Die genaue Pathogenese dieser Erkrankung und somit deren Therapie wurde dabei in einer Vielzahl von Studien untersucht¹²³. Jedoch ist ein direkter oder indirekter Einfluss des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) auf die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion oder das Remodelling aufgrund langanhaltender Hypoxie kaum beschrieben. Interessanterweise zeigten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe einen Zusammenhang von CFTR Kanälen und der akuten HPV¹²⁴.

Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung und Hypothese, dass

- 3) der CFTR an den chronischen Umbauprozessen sowie an der Entwicklung der Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie beteiligt ist.

In der Fragestellung dieser Dissertation gilt es die oben genannten Hypothesen zu untersuchen, gegebenenfalls zu bestätigen oder auch zu widerlegen. Detaillierte Erkenntnisse zu den pathologischen Prozessen würden neue Möglichkeiten eröffnen der PH oder chronischen Lungenerkrankungen wie der COPD bereits bei ihrer Entstehung therapeutisch entgegenzuwirken und die Exazerbation zu verhindern.

3 Material und Methodik

Die Grunderkenntnisse der Untersuchungen wurden durch Tierexperimente mit C57/Bl6 Wildtyp Mäusen sowie genetisch modifizierten Labormäusen (Knockout Mäuse) gewonnen. Für die Untersuchung standen drei speziell gezüchtete Knockout Mausgruppen zur Verfügung. Die Tiere jeder Gruppe waren genetisch identisch und wiesen keine TRPV4-, CFTR- oder Cx40 Transmembranproteine auf. Diese Experimente wurden nach Genehmigung des Canadian Council on Animal Care durchgeführt, wodurch im Rahmen der Versuche eine artgerechte Haltung, standardisierte und pathogenfreie Bedingungen sowie eine optimale Betreuung durch speziell ausgebildetes Personal gewährleistet werden konnte. Alle Tiere wurden im Animal Vivarium des St. Michael's Hospital Li Ka Shing Knowledge Institute, Toronto, Ontario, Kanada untergebracht. Der Antrag auf Tierexperimente hat folgende Protokollnummer: ACC 992 (18.10.2010).

3.1 Verwendete Materialien und Geräte

In den folgenden drei Tabellen findet sich eine Auflistung der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software mit Herstellerangaben. Die Geräte wurden von der Arbeitsgruppe Professor Doktor Kübler im Li Ka Shing Knowledge Institut des St. Michael's Krankenhaus in Toronto sowie im Physiologischen Institut der Charité zu Berlin zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Instrumente

Geräte und Instrumente	Hersteller
Isolated perfused lung	Größe I; Hogo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Karotiskatheter	Portex FineBore Polythene Tubing, 0.28mm inner diameter/ 0.61mm outer diameter, Smiths Medical International, Keene, NH, USA
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskopkamera	DCE-2: Digital Camera Eyepiece 2, Gentaur, Kobe, Japan
Millar Katheter SPR-1000	Micro-Tip®, Millar Instruments, Houston, Texas, USA
Mini Vent 845	Hugo-Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Präzisionswaage	Scaltec SBC22, Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Saline-filled membrane pressure transducer	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Wärmepad	TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Bovine serum albumin	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dextran	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA
Fentanyl	0,05mg/kg; Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Gasflaschen	Praxair, Hamilton, Kanada
Haematoxylin-Eosin	BioShop Canada Inc., Burlington, Kanada
Hank's Balanced Salt Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Heparin Sodium Injection	Pharmaceutical Partners of Canada, Richmond Hill, Kanada
Medetomidin	0,5mg/kg; Domitor®, Dr. E. Graeub AG, Basel, Schweiz
Midazolam	5mg/kg; Dormicum®, Roche, Basel, Schweiz
Paraformaldehydlösung	BioShop Canada Inc., Burlington, Kanada

Tabelle 5: Verwendete Software

Software	Hersteller
DasyLab 32	DasyLab, Mönchengladbach, Deutschland
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
LabChart	IDInstruments, Colorado Springs, CO, USA
Pulmodyn®	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
SigmaStat 9.0	JandelScientific, San Rafael, CA, USA

3.2 Hypoxie Exposition

Für die Tierexperimente wurden 8 Wochen alte, 20 bis 25 Gramm schwere, männliche Mäuse verwendet. Die Tiere wurden zu gleichen Teilen in eine normoxische und eine hypoxische Gruppe eingeteilt. Mäuse der Normoxie Gruppe wurden für fünf Wochen normoxischen Verhältnissen ausgesetzt, wobei die Luftzusammensetzung und somit die Sauerstoffkonzentration von 21% der normalen Raumluft gleich. Die hypoxischen Gruppen wurden fünf Wochen in einer 10%igen Sauerstoffkonzentration aufgezogen. Die verbliebene Luftzusammensetzung bestand zu größten Teilen aus Stickstoff (Hypoxie circa 90%, Normoxie circa 80%). Zum Ende der fünf Wochen chronischen Sauerstoffdefizits konnte auf Grundlage bereits durchgeführter Experimente davon ausgegangen werden, dass strukturelle Umbauprozesse, sogenanntes Remodelling, vor allem im Lungengewebe der Mäuse nachgewiesen werden können¹⁵.

Die dichotome Einteilung erfolgte jeweils mit allen drei Knockout Versuchsgruppen sowie der Standard Wildtyp Maus C57/Bl6 als Kontrollgruppe. Dabei setzten sich die Knockout Mäuse wie folgt zusammen: die Connexin 40 Knockout Gengruppe (*Cx40^{-/-}*), die Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Knockout Gengruppe (*Trpv4^{-/-}*) und die spezifische, nur im Lungengewebe vorkommenden Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Knockout Gengruppe (*Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}*).

Insgesamt wurden 8 Untersuchungsgruppen unterschieden. Davon befanden sich vier unter hypoxischen ($O_2=10\%$) und vier unter normoxischen Aufwuchsbedingungen ($O_2=21\%$). Die Anzahl der Versuchstiere in jeder der 8 Gruppen betrug zwischen 8 und 20 Mäusen. Die Werte waren somit vergleichbar und es zeigten sich signifikante

Unterschiede. Die Einteilung der Versuchstiere wird in Tabelle 6 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 6: Einteilung der Versuchsgruppen

Normoxie (O ₂ =21%)	Hypoxie (O ₂ =10%)
C57/Bl6 Wildtyp	C57/Bl6 Wildtyp
<i>Cftr</i> ^{tm1Unc} -Tg(FABPCFTR) ^{-/-}	<i>Cftr</i> ^{tm1Unc} -Tg(FABPCFTR) ^{-/-}
<i>Trpv4</i> ^{-/-}	<i>Trpv4</i> ^{-/-}
<i>Cx40</i> ^{-/-}	<i>Cx40</i> ^{-/-}

Die benötigten Käfige wurden vom Animal Vivarium des St. Michael's Hospital Toronto zur Verfügung gestellt. Es wurden jeweils 5 Versuchstiere in einem Käfig gehalten und täglich mit frischer Nahrung sowie Wasser versorgt. Die Käfige waren luftdicht verschlossen. Sie hatten einen permanenten Sauerstoffzufluss von 10% (Hypoxie) beziehungsweise 21% (Normoxie), sowie ein Ausführventil. Der Sauerstoff- sowie der Kohlenstoffdioxidgehalt wurde mehrmals täglich bestimmt und kontrolliert¹²⁵.

3.3 Invasive *in vivo* Phase

Nach 35 Tagen Exposition mit Hypoxie oder Normoxie wurde jede Maus nach gleichem Protokoll untersucht und Messungen unterzogen. Die ermittelten Datenmengen können somit miteinander verglichen werden.

Die Tiere wurden mit einem Gemisch aus Fentanyl (0,12mg/kg), Medetomidin (1,2mg/kg) und Midazolam (12mg/kg) per intraabdomineller Injektion anästhesiert¹²⁶. Die Narkosetiefe wurde mittels Schmerz assoziierter, interdigitaler Druck-Reflex Reaktion beurteilt. Mit Beginn der anästhesierenden Wirkung wurden die Versuchstiere gewogen und im Brustbereich rasiert. Anschließend wurden sie auf einem Wärmepad fixiert, wodurch die Körpertemperatur der Versuchstiere aufgrund einer permanenten Wärmezufuhr konstant gehalten werden konnte. Die weitere Präparation erfolgte unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops (Vergrößerung 10- bis 20fach). Zuerst wurde die Haut mit einem Skalpell durch einen medianen, vertikal vom Kinn bis zur Oberkante des Sternums verlaufenden Schnitt getrennt und von der darunter liegenden Körperschicht

frei präpariert. Anschließend wurden die Speicheldrüsen (*Glandula salivaria*) sorgfältig frei gelegt und bis zur Trachea frei präpariert. Für spätere hämodynamische und weitere experimentelle Messungen wurde das Versuchstier intratracheal intubiert (Harvard Industries) und mit einem positiven endexpiratorischen Druck von 2cm H₂O mittels eines Mini Ventilators (Mini Vent 845) beatmet. Dabei wurde bei einer Frequenz von 90 Beatmungen pro Minute ein Tidalvolumen von 10 μ l pro Gramm Körpergewicht gegeben. In der Abbildung 2 sind die Kennmarken des Operationsgebietes der ersten Schritte der Präparation ersichtlich.

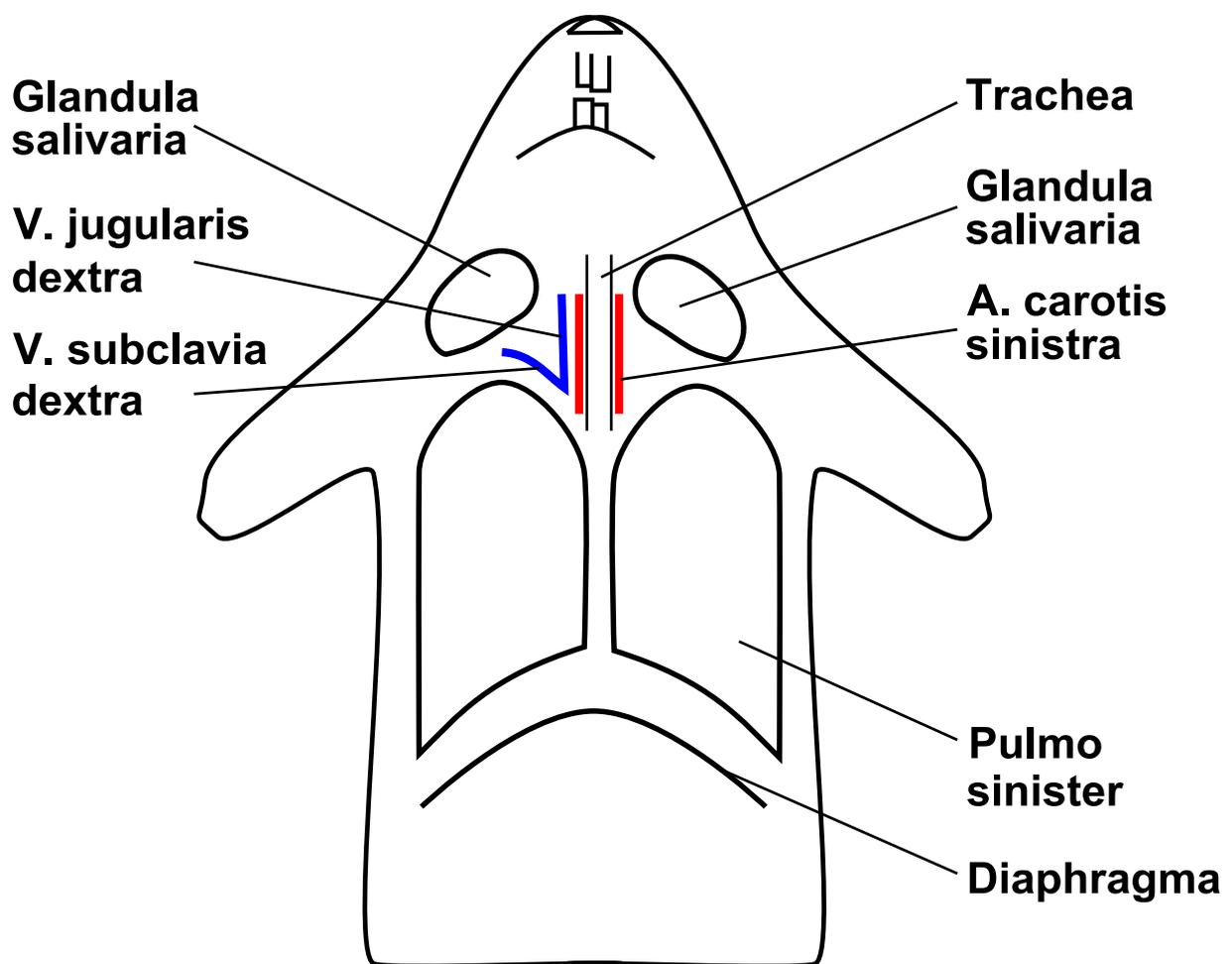


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kennpunkte der invasiven *in vivo* Präparation.

Die linke Arteria carotis (*A. carotis sinistra*) wurde frei präpariert und mit zwei Ligaturen, vorbereitend für die Implantation eines Katheters, umschlungen. Anschließend wurde die Arterie unter dem Mikroskop temporär proximal und distal abgeklemmt und mittig

angeschnitten. Mit Hilfe von Pinzetten konnte ein Katheter (0,28mm (Innendurchmesser) / 0,61mm (Außendurchmesser)) platziert werden. Der temporäre Verschluss der A. carotis wurde wieder gelöst und der arterielle Blutdruck wurde während des invasiven Eingriffs mit Hilfe des Computerprogramms DasyLab 32 permanent gemessen. Aus dem gleichen Zugang erfolgte die arterielle Blutgasbestimmung und somit Kontrolle der Sauerstoffversorgung.

Nachfolgend wurde die rechte Jugularvene (V. jugularis dextra) präpariert und ebenfalls unter dem Mikroskop angeschnitten. Anschließend wurde ein Mikro-Tip Millar Katheter (SPR-1000) zur Bestimmung des rechtsventrikulären endsystolischen Drucks (RVSP) über die rechte Jugularvene bis in den rechten Ventrikel eingeführt. Es konnten somit in Echtzeit kontinuierlich der systolische und diastolische rechtsventrikuläre Druck gemessen und mit Hilfe des Programms LabChart aufgezeichnet werden.

Alle Messgeräte wurden vor jedem Experiment kalibriert und auf ihre Funktionsweise getestet.

3.4 Invasive ex vivo Phase

Anschließend an die RVSP Messung wurden die Versuchstiere mit 500 Internationalen Einheiten pro 100g Körpergewicht heparinisiert und nach Herzpunktion exsanguiniert. Anschließend wurde das Diaphragma eröffnet und die subdiaphragmale Körperhälfte entfernt. Das Sternum wurde medial halbiert, wodurch der rechte und linke knöcherne Thorax jeweils nach lateral geklappt und fixiert werden konnte. Dadurch wurde ein offener Zugang zum Herz-Lungen-Kreislauf geschaffen. Diese Präparationsschritte wurden ebenfalls unter einem Operationsmikroskop durchgeführt.

Um Aussagen über die Umbauprozesse des Gewebes und im Speziellen über Hypoxie induzierte Gefäßveränderungen treffen zu können, wurden Untersuchungen der Pulmonalarterie bezüglich ihrer Dehnbarkeit und des Strömungswiderstandes durchgeführt.

Neueste Forschungsergebnisse betrachten das Gefäß nicht mehr, wie im Ohm'schen Modell als starres Rohr, sondern als dehnbaren Zylinder, denn bei einer Flussteigerung kommt es zu einer allmählichen Zunahme des Gefäßdrucks, da die Gefäßdehnung dem Prozess entgegen druckausgleichend wirkt. Der gefäßspezifische Widerstand R nimmt mit steigender Gefäßdehnung ab¹²⁷.

Bevor eine stählerne Kanüle mit einem Innendurchmesser (ID) von 1mm in die Pulmonalarterie gelegt werden konnte, wurde eine Ligatur um diese Arterie geführt. Somit konnte eine Fixierung der Kanüle sichergestellt werden. Nach Implantation der Kanüle durch den rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie erfolgte die Fixierung der zuvor platzierten Ligatur. Eine weitere stählerne Kanüle wurde durch die Herzspitze und den linken Ventrikel über die Mitralklappe in den linken Vorhof geführt, wodurch der Perfusatabfluss von der Pulmonalvene aufgenommen werden konnte (schematische Darstellung in Abbildung 3).

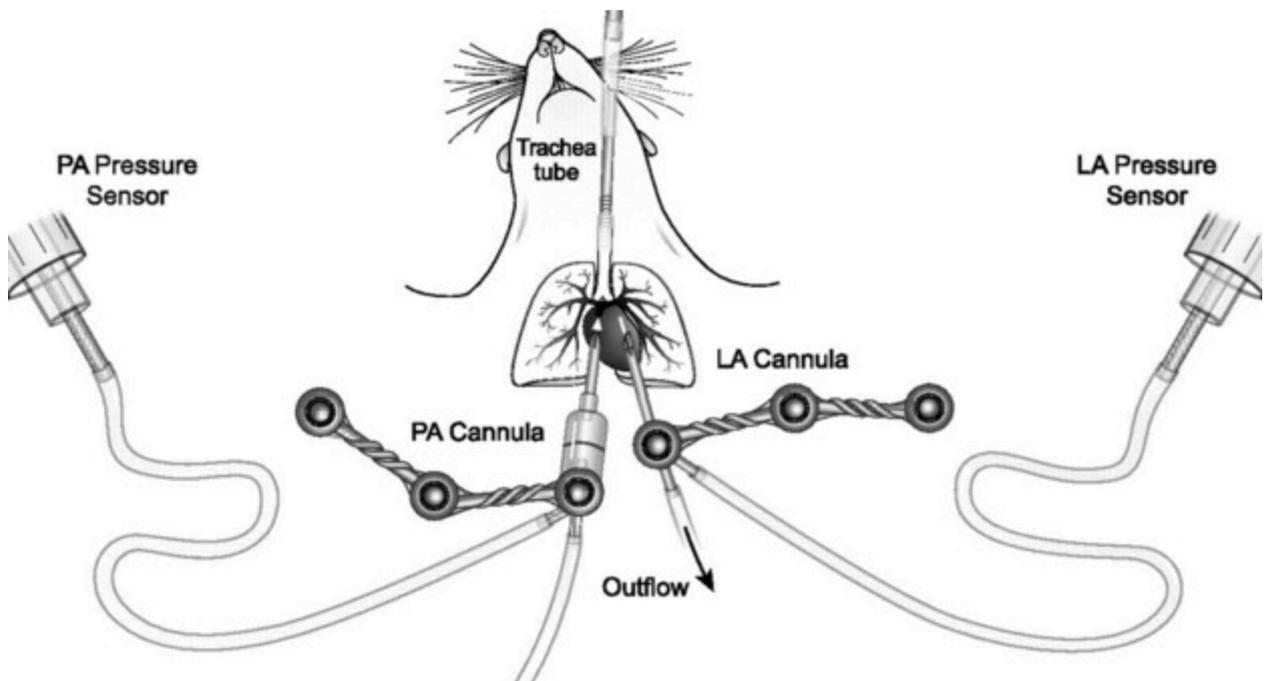


Abbildung 3: Schematische Darstellung der invasiven ex vivo Präparation nach Vanderpool und Mitarbeitern². PA Cannula: pulmonalarterielle Kanüle. LA Cannula: Kanüle im linken Vorhof. Perfusatabfluss via pulmonalarterieller Kanüle durch die Lunge bis in den linken Ventrikel. PA Pressure Sensor: pulmonalarterieller Druckmesser. LA Pressure Sensor: Druckmesser des linken Atriums.

Die Lunge wurde dadurch an einen geschlossenen Kreislauf angeschlossen und kontinuierlich mit Hanks' balanced salt solution perfundiert. Dem Perfusat wurden 5% Dextran und 5% Albumin hinzugefügt um der Entstehung eines Lungenödems entgegen zu wirken¹²⁸. Es wurde darauf geachtet, dass sich kein Lufteinschluss im Kreislaufsystem befand, da dies die Messung negativ beeinflussen würde. Zunächst wurde die Lunge mit einem konstanten Fluss von 50ml/kg Körpergewicht perfundiert und der Druck im linken Atrium mit Hilfe der Orthostatik auf einen Druck von 2mmHg

kalibriert. Das Perfusat wurde dabei permanent auf eine Temperatur von 37°C erwärmt. Zur besseren Simulation der physiologischen Bedingungen intrapulmonal wurden dem Experiment zusätzlich 21% Sauerstoff (Sauerstoffkonzentration während der Inspiration), 5% Kohlenstoffdioxid (Kohlendioxidkonzentration im Alveolarraum) und 74% Stickstoff zugegeben²⁴. Die konstante Zufuhr von Sauerstoff wirkt einer hypoxischen Vasokonstriktion, die bei einem Sauerstoffpartialdruck von unter 100mmHg (<13,3 kPa) ausgelöst wird, entgegen¹²⁹.

Die Pulmonalarteriendrucke, sowie die Drücke im linken Herzatrium wurden mit Hilfe von mit Flüssigkeit gefüllten Membran Drucksensoren, die mit der zu- und abführenden Kanüle verbunden waren, gemessen und aufgezeichnet.

Die Lunge wurde bei einem konstanten linksatrialen Druck von 2mmHg nacheinander mit Flussraten von 25, 50, 75 und 100ml pro Kilogramm Körpergewicht pro Minute perfundiert (Abbildung 8). Für jede Flussrate wurde der pulmonalarterielle Druck über mindestens zwei Minuten erfasst, wobei alle drei Sekunden eine Messung stattfand (Abbildung 9). Aus diesen Werten wurde für jede der vier Flussraten ein Mittelwert gebildet. Man erhielt ein Vierpunkte Druck-Fluss (P-Q) Diagramm (Abbildung 10), wodurch ein Rückschluss über den pulmonalen Gefäßwiderstand (PVR) im direkten Vergleich innerhalb der untersuchten Mausgruppen getroffen werden kann. Die Graphen werden im Abschnitt Ergebnisse detaillierter beschrieben.

3.5 Post mortem Untersuchung

Zur Klassifizierung einer erhöhten Belastung des rechten Ventrikels und der damit verbundenen RVSP Steigerung wurde die Rechtsherzhypertrophie bestimmt und mit Hilfe des Fulton Index ins Verhältnis gesetzt. Dafür wurde das Herz in einen rechtsventrikulären- und einen linksventrikulären Teil mit Septum chirurgisch zertrennt und gewogen. Der Index ermittelt sich aus dem Verhältnis des Gewichts des rechten Herzens zum linken Herz mit Septum. Je größer das Verhältnis, desto wahrscheinlicher besteht eine Rechtsherzhypertrophie.

Die Lungen wurden bei geringer Flussgeschwindigkeit über mindestens 30min in 10%iger, neutral gepufferter Paraformaldehydlösung über die pulmonalarterielle Kanüle perfundiert und fixiert. Anschließend wurde die Lunge chirurgisch aus dem Torso entnommen und für weitere 16 Stunden in der Lösung fixiert. Das dehydrierte

Lungengewebe wurde in Paraffin gebettet und in 5µm dicke Scheiben geschnitten um es auf einem mit 10% Poly-L-Lysin Lösung vorbehandelten Objektträger zu fixieren. Mittels Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung wurde das Gewebe anschließend dargestellt. Die Lungenarteriolen wurden nach ihrem äußeren Durchmesser in drei Gruppen kategorisiert: 20-50µm, 51-100µm und 101-150µm¹²⁵. Jede der drei Kategorien beinhaltete mindestens 15 Gefäßmessungen pro Lungenanschnitt. In jeder Versuchsgruppe wurden mindestens acht Lungen untersucht. Insgesamt wurden mehr als 3000 Gefäße analysiert. Zur genauen Bestimmung der Wanddicke jedes der untersuchten Gefäße wurden mit einer Kamera (DCE-2) mikroskopische Bilder erstellt. Dies geschah mit dem computergestützten morphometrischen System ImageJ. Die Auswertung erfolgte verblindet, ohne die Kenntnis des Untersuchers, welcher Untersuchungsgruppe die Lungengefäße angehörten. Zur Begutachtung der pathologischen Veränderungen der Lungenarteriolen wurden vor allem Werte der ersten Gefäßkategorie von 25 bis 50µm verglichen.

3.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wurde die Software SigmaStat (SigmaStat 9.0) verwendet. Die Messwerte werden als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dabei stellt N die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente dar. Als statistisch signifikant werden alle p Werte mit Hilfe des Student's t-test, Mann Whitney Rank Sum Test oder one-way ANOVA definiert, die kleiner als 0,05 sind (*, #). Für Vergleiche zwischen Mittelwerten nach normoxischer versus hypoxischer Exposition einer Gengruppe wurde zur Angabe der statistischen Signifikanz das (*) gewählt. Die Mittelwerte der unterschiedlichen Genotypen nach hypoxischer Exposition im Vergleich zueinander wurden bei vorliegender statistischer Signifikanz mit (#) angegeben.

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Untersuchungsergebnisse der Dissertation detailliert beschrieben. Zunächst werden die ermittelten Wachstumsunterschiede, die nach fünfwöchiger Exposition unter Hypoxie ($O_2=10\%$) auftraten, graphisch veranschaulicht. Nachfolgend werden die Messungen und Ergebnisse zur Ausprägung der pulmonalen Hypertonie dargestellt: RVSP, Fulton Index, PAP. Dabei werden die Mittelwerte der jeweiligen Untersuchung der C57/Bl6 Wildtyp Maus als Vergleichsmessungen verwendet und zusammen mit den Ergebnissen der Knockouttiere dargestellt. Somit resultiert aus der Erhöhung des RVSP, des Fulton Indexes und des PAP unter Hypoxie relativ zu den Ergebnissen der C57/Bl6 Wildtyp Maus unter Normoxie, ein Hinweis auf eine pulmonale Hypertonie. Der Fulton Index gilt dabei als Marker einer chronischen Rechtsherzbelastung mit einer daraus resultierenden Rechtsherzhypertrophie. Am Ende dieses Kapitels werden die Ergebnisse der histopathologischen Gefäßuntersuchungen zusammengefasst. Analog der Messungen der C57/Bl6 Wildtyp Maus und den Patienten mit PH kommt es durch chronische Hypoxie zu einer Verdickung der Gefäßwand vor allem der kleineren pulmonalarteriellen Gefäße.

4.1 Entwicklung der Versuchstiere

Die fünfwöchige Phase der normoxischen beziehungsweise hypoxischen Exposition wurde von allen Tieren überlebt. Dennoch konnte noch vor der experimentellen Datenerhebung ein signifikanter Unterschied in der physischen Entwicklung der Wildtyp- und der *Trpv4*^{-/-} Mäuse festgestellt werden. Die entsprechenden Gruppen mit verminderter Sauerstoffexposition über 35 Tage wiesen ein geringeres Endgewicht im Vergleich zu ihren Artgenossen unter normoxischen Sauerstoffverhältnissen auf. Das Gewicht der Versuchstiere ist in Abbildung 4 zusammengefasst. Dabei zeigte sich die Gewichtsentwicklung von C57/Bl6 Wildtyp- (Normoxie vs. Hypoxie) sowie *Trpv4*^{-/-} Mäusen (Normoxie vs. Hypoxie) jeweils signifikant erniedrigt.

Zwischen der normoxischen und der hypoxischen *Cx40*^{-/-} Untersuchungsgruppe konnte nach statistischer Untersuchung mittels Student's t-Test kein signifikanter Unterschied

($p=0,059$) im Gewicht nachgewiesen werden. Bei den $Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}$ Mäusen bestand ebenfalls kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen beiden Gruppen (Students t-Test, $p=0,1$). Interessanterweise war unter den $Cx40^{-/-}$ - und $Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}$ Mäusen das Gewicht bei den normoxischen Tieren tendenziell niedriger als in der normoxischen C57/Bl6 Wildtyp Kontrollgruppe. Alle Versuchstiere waren zu diesem Zeitpunkt im Durchschnitt 14 Wochen alt.

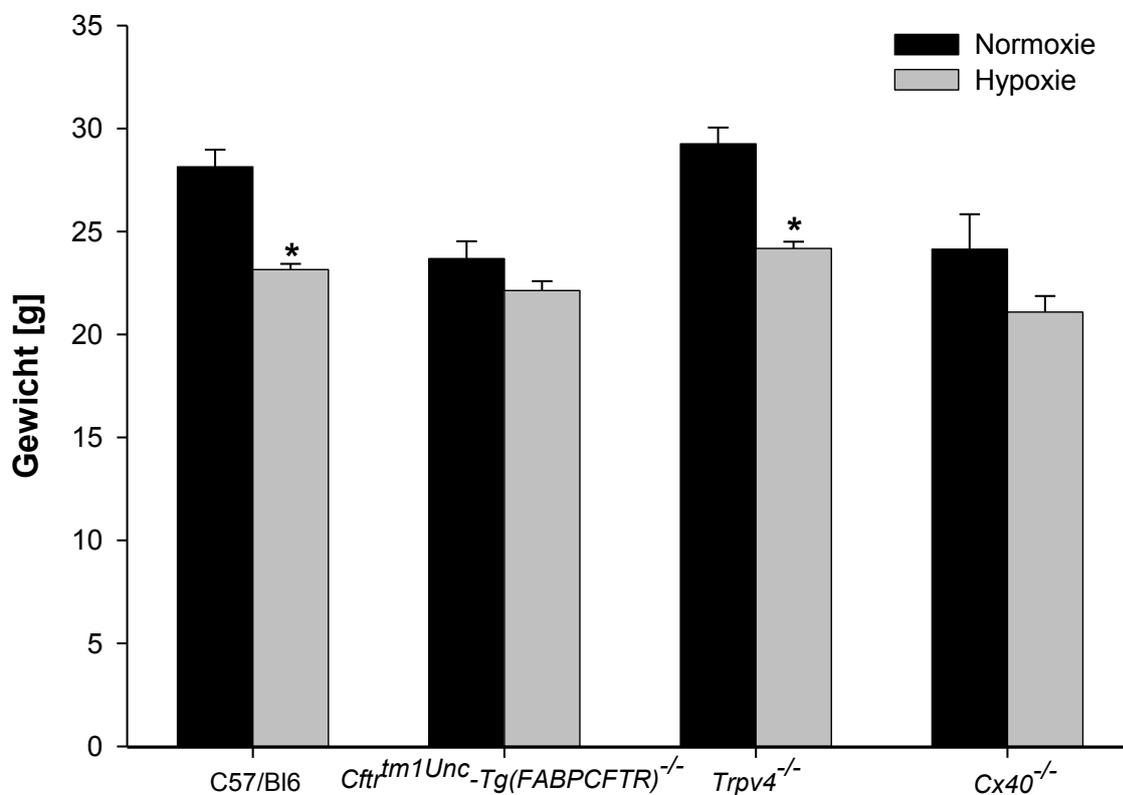


Abbildung 4: Gewichtsentwicklung der Versuchsguppen nach hypoxischer ($O_2=10\%$) und normoxischer ($O_2=21\%$) Exposition in $MW \pm SEM$. * $p < 0,05$, t-Test, je Genotyp im Vergleich Hypoxie vs. Normoxie. Anzahl der Versuchstiere (N) betrug für C57/Bl6 Wildtyp Mäuse jeweils 20 Tiere in hypoxischer und normoxischer Expositionsgruppe. N der $Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}$ Mäuse betrug 13 Tiere in hypoxischer- und 12 Tiere in normoxischer Expositionsgruppe. N der $Trpv4^{-/-}$ Mäuse betrug 15 Tiere in hypoxischer- und 16 Tiere in normoxischer Expositionsgruppe. N der $Cx40^{-/-}$ Mäuse betrug jeweils 8 Tiere in hypoxischer- und normoxischer Expositionsgruppe.

4.2 Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck (RVSP)

Hypoxie bewirkt in der Lunge eine vermehrte Vasokonstriktion (Euler-Liljestrand-Mechanismus)¹⁰. Auf Dauer kommt es zu chronischen Umbauprozessen des Lungengewebes, sowie einer Verdickung der Muskularis der Lungengefäße^{2,3}. Unter chronischer Hypoxie resultiert eine Erhöhung des Druckes im arteriellen Lungenkreislauf und eine Rechtsherzbelastung. Diese Rechtsherzbelastung wurde in Versuchen *in vivo* durch die Messung des RVSP objektiviert und nachgewiesen. Nachfolgend sind die ermittelten Werte des RVSP im Vergleich Hypoxie ($O_2=10\%$) vs. Normoxie ($O_2=21\%$) für jede Versuchsgruppe exemplarisch dargestellt (Abbildung 5).

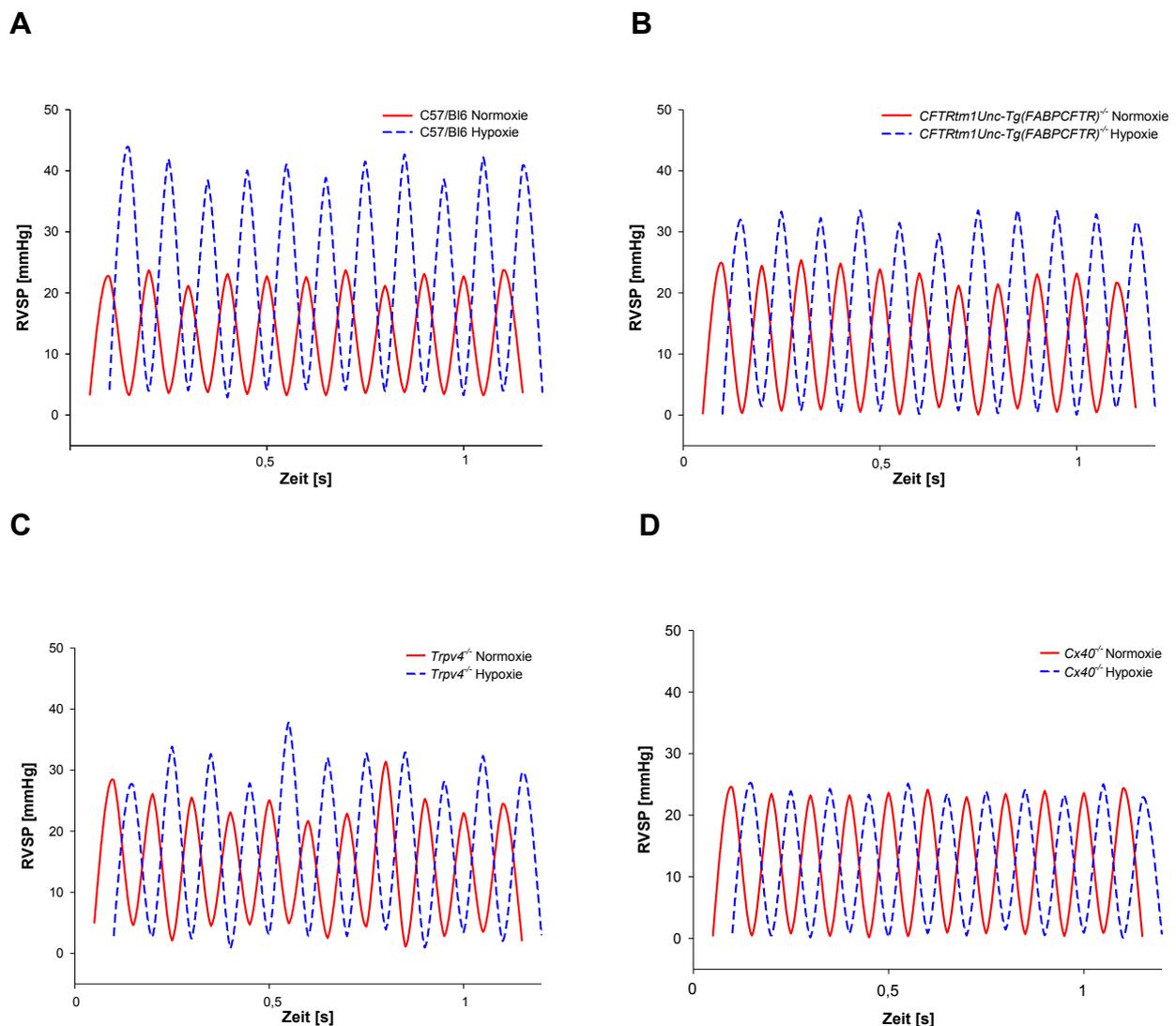


Abbildung 5: Exemplarische *in vivo* Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Blutdrucks (RVSP). Im Vergleich stehen normoxische- vs. hypoxische Versuchsgruppe eines Genotyps. **A** C57/Bl6 Wildtyp Mäuse **B** *Cftr*^{tm1Unc-Tg(FABPCFTR)}^{-/-} Mäuse **C** *Trpv4*^{-/-} Mäuse **D** *Cx40*^{-/-} Mäuse

In Abbildung 6 sind die entsprechenden Mittelwerte (MW) mit den jeweiligen SEMs der RVSP jeder Untersuchungsgruppe dargestellt.

Es zeigte sich in den jeweiligen Versuchsgruppen der Wildtyp-, der *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* und der *Trpv4^{-/-}* Mäusen eine signifikante Erhöhung des RVSP nach hypoxischer Exposition ($O_2=10\%$) im Vergleich zu normoxischer Exposition ($O_2=21\%$). Im Gegensatz dazu konnte bei den *Cx40^{-/-}* Mäusen auch nach fünfwöchiger Hypoxie kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gemessen werden. Dies wird in Abbildung 6 durch * dargestellt.

Werden die Messwerte für Hypoxie und die für Normoxie in den unterschiedlichen Versuchsgruppen miteinander verglichen, ergeben sich beachtliche Erkenntnisse. Alle Versuchstiere weisen unter Normoxie (21% O_2) nahezu ähnliche RVSP-Werte zwischen 23 und 24mmHg auf. Hingegen weisen unter hypoxischen Bedingungen die *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* ($p=0,048$), die *Trpv4^{-/-}* ($p=0,031$) sowie die *Cx40^{-/-}* Mäuse ($p<0,001$) einen signifikant niedrigeren Wert gegenüber den C57/Bl6 Wildtyp Mäusen auf (Mann Whitney Rank Sum Test). Diese signifikanten Unterschiede sind in Abbildung 6 durch # dargestellt.

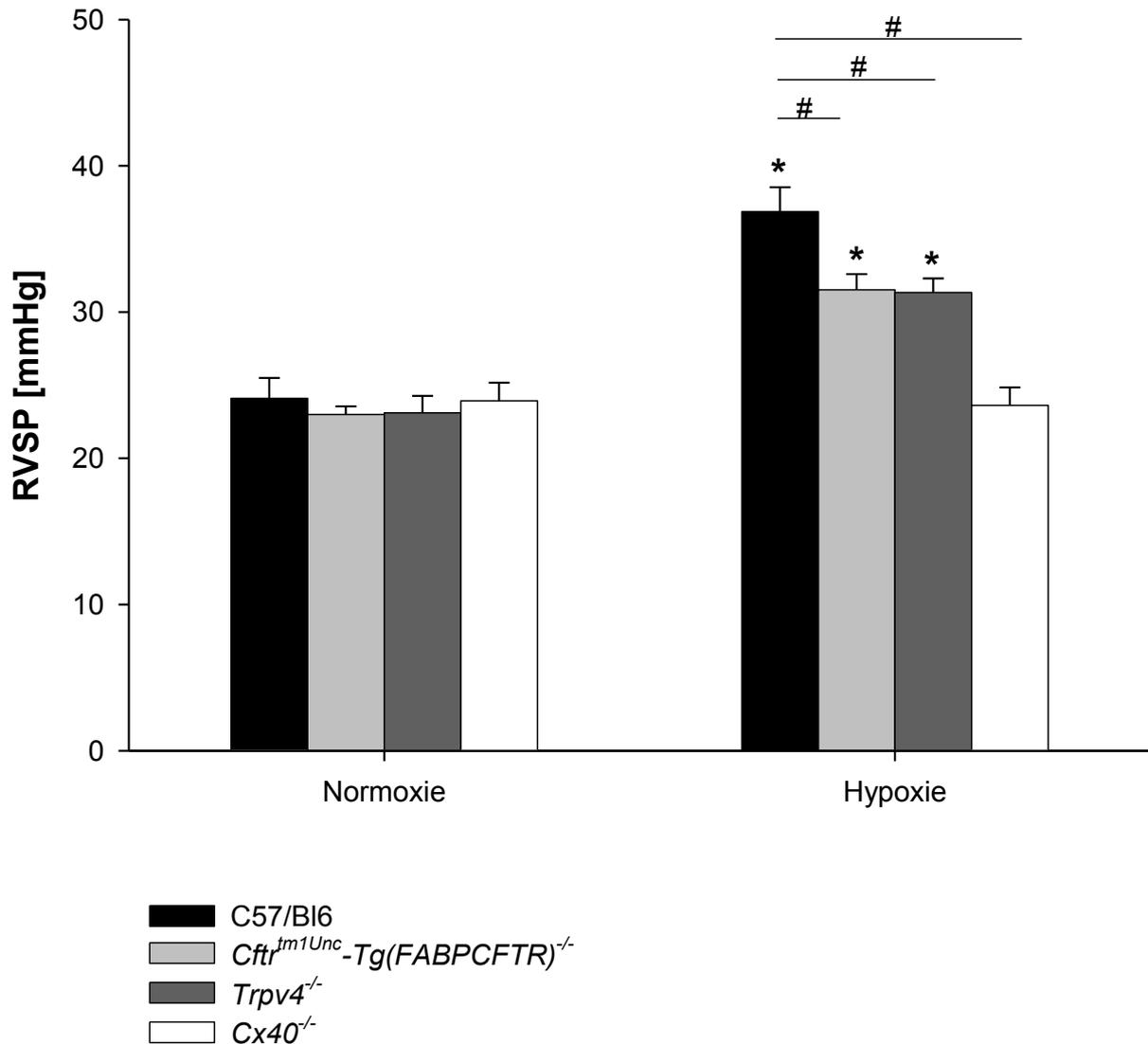


Abbildung 6: RVSP-Mittelwerte \pm SEM der jeweiligen Versuchsgruppe nach 35 tägiger Exposition von Hypoxie ($O_2=10\%$) oder äquivalenter Raumluft ($O_2=21\%$). * $p<0,05$, Mann Whitney Rank Sum Test, je Genotyp im Vergleich Hypoxie vs. Normoxie eines Genotyps. # $p<0,05$, Mann Whitney Rank Sum Test, jeweils im Vergleich C57/Bl6 zu *Cftm1Unc-Tg(FABPCFTR)*^{-/-}, *Trpv4*^{-/-} und *Cx40*^{-/-} nach Hypoxieexposition. Anzahl der Versuchstiere (N) betrug für C57/Bl6 Wildtyp Mäuse 18 Tiere in hypoxischer- und 15 Tiere in normoxischer Expositionsgruppe. N der *Cftm1Unc-Tg(FABPCFTR)*^{-/-} Mäuse betrug jeweils 13 Tiere in hypoxischer- und normoxischer Expositionsgruppe. N der *Trpv4*^{-/-} Mäuse betrug 16 Tiere in hypoxischer- und 15 Tiere in normoxischer Expositionsgruppe. N der *Cx40*^{-/-} Mäuse betrug jeweils 8 Tiere in hypoxischer und normoxischer Expositionsgruppe.

4.3 Fulton Index

Zur weiteren Quantifizierung des Schweregrades der pulmonalen Hypertonie in den vier unterschiedlichen Gengruppen wurde die Rechtsherzhypertrophie anhand des Fulton Indexes bestimmt. Er setzt sich aus dem Verhältnis des Gewichtes des rechten Ventrikels zum Gewicht des linken Ventrikels mit Septum zusammen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 graphisch dargestellt. Interessanterweise zeigte sich in der C57/Bl6 Wildtyp-, der *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* und der *Trpv4^{-/-}* Versuchsgruppe jeweils ein signifikant höherer ($p < 0,001$, Mann Whitney Rank Sum Test) Fulton Index nach hypoxischer Exposition ($O_2 = 10\%$) im Vergleich zu normoxischer Exposition ($O_2 = 21\%$). Untersuchungen an *Cx40^{-/-}* Mäusen zeigten hingegen keinen statistischen Unterschied bezüglich der beiden Versuchsgruppen.

Eine Hypoxie induzierte Rechtsherzhypertrophie konnte in den *Cx40^{-/-}* Mäusen nicht nachgewiesen werden.

Vergleiche des Fulton Index der drei Knockout- zur C57/Bl6 Wildtypgruppe unter hypoxischen Aufwuchsbedingungen ergab einen signifikant niedrigeren Wert der *Cx40^{-/-}* Mäuse ($p < 0,001$, Mann Whitney Rank Sum Test). Der Fulton Index der *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* und der *Trpv4^{-/-}* Versuchsgruppe im Vergleich zur C57/Bl6 Wildtyp Vergleichsgruppe ergab keine signifikanten Unterschiede.

Die gesamten Ergebnisse zum Fulton Index deuten, zusätzlich zu den vorangegangenen Untersuchungen zu RVSP, auf eine entscheidende Rolle des Cx40 Proteins bei der Entstehung der Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie hin.

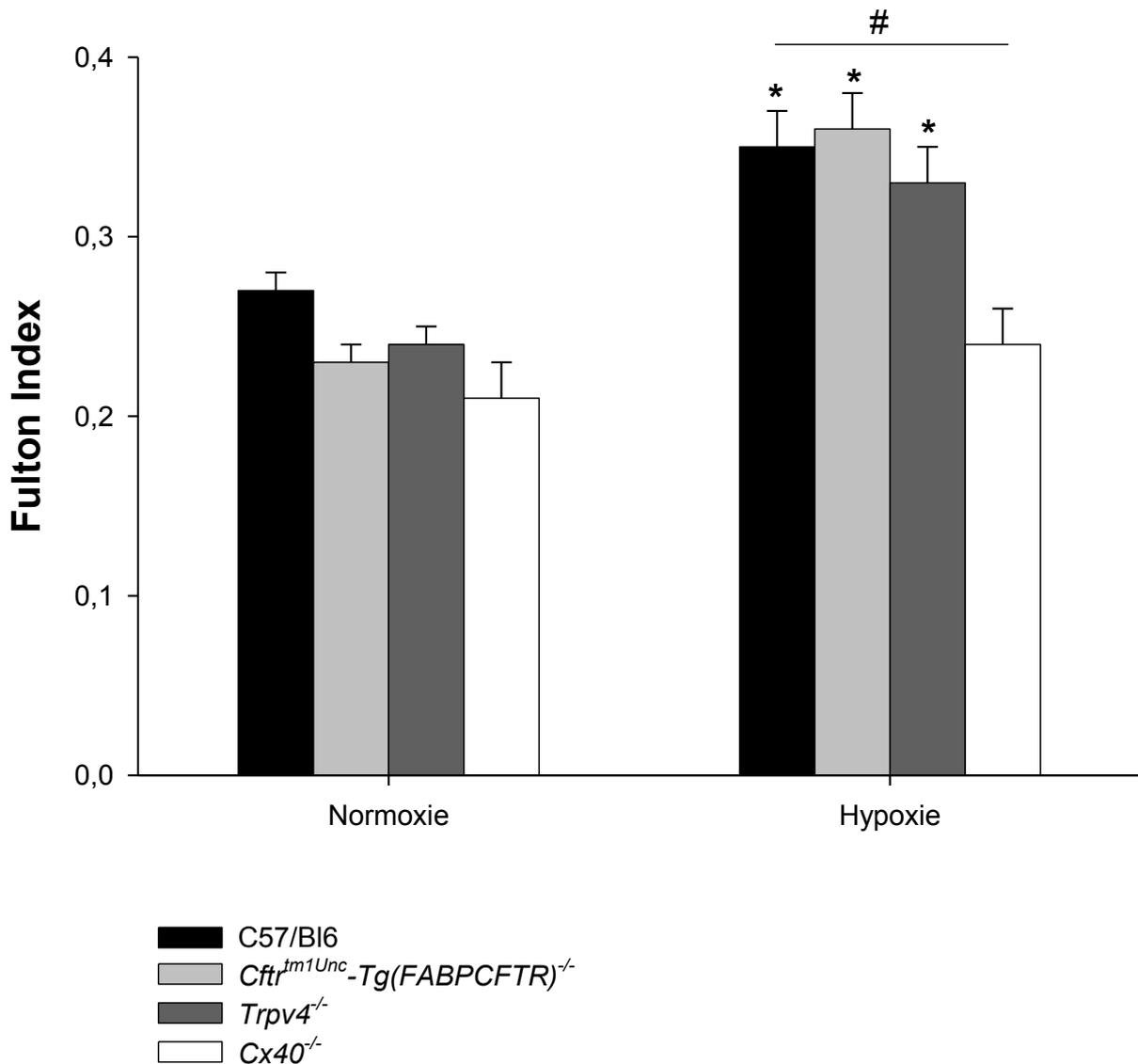


Abbildung 7: Gewicht des rechten Ventrikels im Verhältnis zum Gewicht des linken Ventrikels mit Septum (Fulton Index) im Vergleich Hypoxie- vs. Normoxie Versuchsgruppe. * $p < 0,05$, Mann Whitney Rank Sum Test, je Genotyp im Vergleich Hypoxie vs. Normoxie. # $p < 0,05$, Mann Whitney Rank Sum Test, direkter Vergleich C57/Bl6- und *Cx40^{-/-}* Hypoxiegruppe. Anzahl der Versuchstiere (N) betrug für C57/Bl6 Wildtyp jeweils 20 Tiere in hypoxischer- und normoxischer Expositionsgruppe. N der *Cfr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäuse betrug jeweils 14 Tiere in hypoxischer- und normoxischer Expositionsgruppe. N der *Trpv4^{-/-}* Mäuse betrug jeweils 16 Tiere in hypoxischer- und normoxischer Expositionsgruppe. N der *Cx40^{-/-}* Mäuse betrug jeweils 8 Tiere in hypoxischer und normoxischer Expositionsgruppe.

4.4 Pulmonaler Strömungswiderstand

Im Folgenden wurden nun zusätzlich zu den Messungen des RVSP *in vivo* Untersuchungen des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) am Modell der isoliert-perfundierten Mauslunge nach Normoxie beziehungsweise chronischer Hypoxie durchgeführt. Auf Basis dieser Ergebnisse kann ein Rückschluss auf den pulmonalen Gefäßwiderstand (PVR) erfolgen. Jedoch ist der PVR vom intravasalen Druck abhängig. Steigt der intravasale Druck (die Perfusionsrate), werden Gefäße dilatiert und Kapillaren rekrutiert, wodurch der PVR absinkt. Somit stellt sich die Druck-Flusskurve (P/Q) in Form eines nicht linearen Graphen dar.

Anhand der schematischen Darstellung in Abbildung 8 wird das Prinzip der Datenerfassung, die in Gliederungspunkt 3.4 (invasive *ex vivo* Phase) beschrieben wird, noch einmal verdeutlicht.

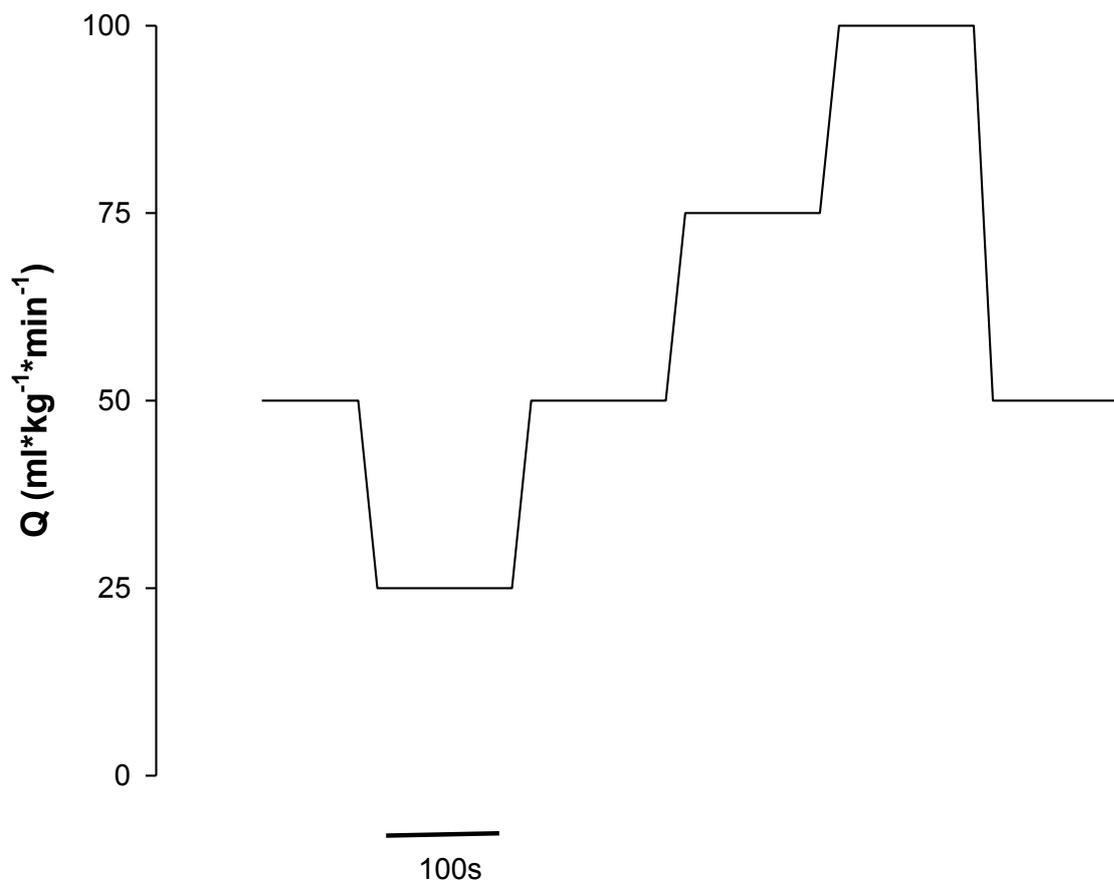


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Veränderung des Perfusat-Flusses (Q) zur Erstellung der 4-Punkte Druck-Fluss-Kurven im isoliert-perfundierten Lungen Modell

Der Perfusat-Fluss Q wurde zur Datenaquirierung von $25 \frac{ml}{kg \cdot min}$ jeweils um $25 \frac{ml}{kg \cdot min}$ bis zum Wert von $100 \frac{ml}{kg \cdot min}$ erhöht. Dabei wurden jeweils bei vier unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten PAP Messwerte erhoben. Abbildung 9 stellt repräsentative Messungen aus Einzelversuchen für jeden Genotyp unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen dar.

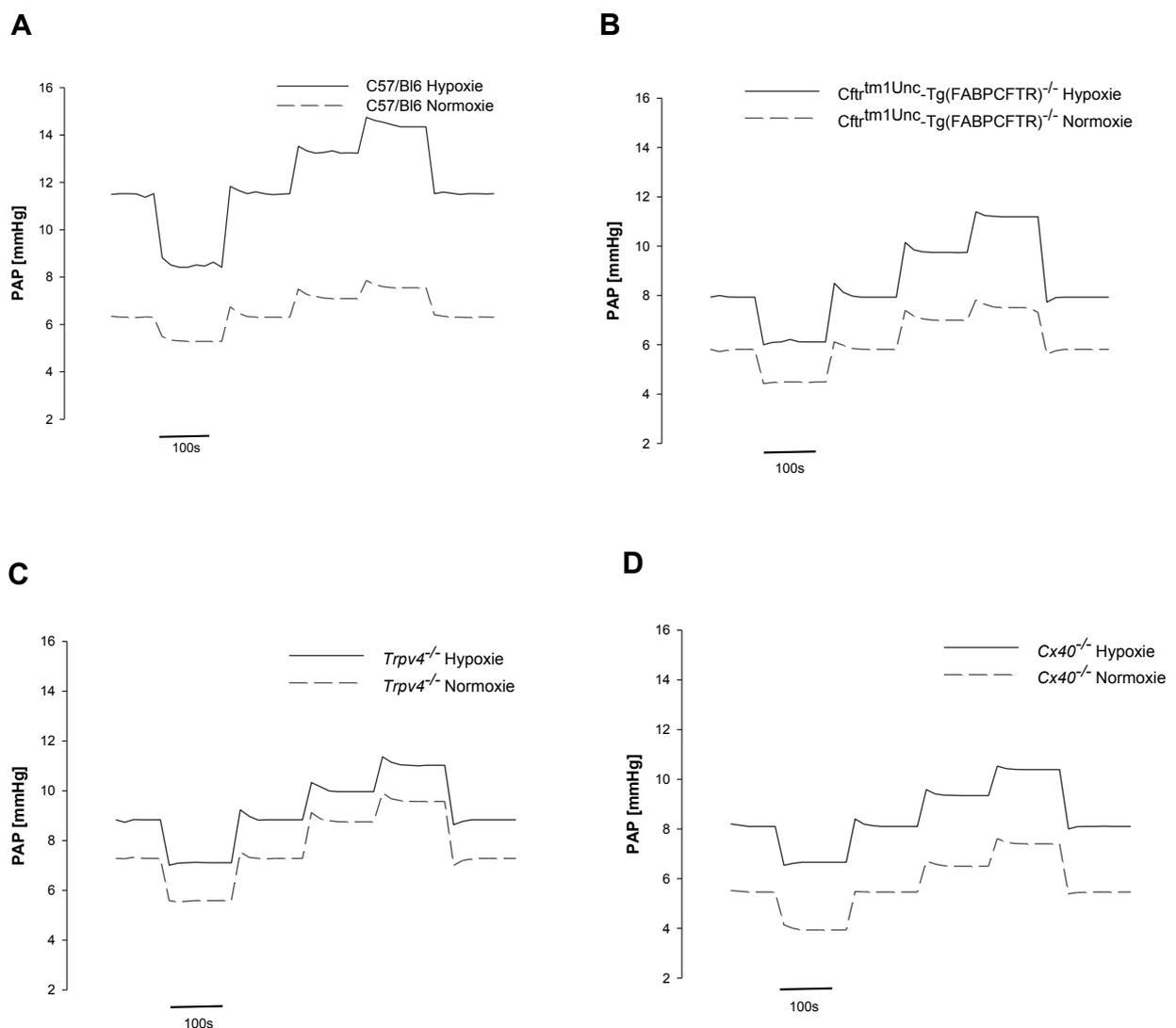


Abbildung 9: Repräsentative Aufzeichnungen des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (PAP_m) unter Änderung des jeweiligen Perfusat-Flusses gemäß Abbildung 8 in hypoxischen und normoxischen Versuchsgruppen für. **A** C57/Bl6 Wildtyp Mäuse **B** $Cftr^{tm1Unc-Tg(FABPCFTR)^{-/-}}$ Mäuse **C** $Trpv4^{-/-}$ Mäuse **D** $Cx40^{-/-}$ Mäuse

Versuchstiere eines Genotyps, die 35 Tage unter Hypoxie ($O_2=10\%$) aufwuchsen, zeigten höhere PAP Werte als die jeweilige normoxische Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind anhand repräsentativer Daten in der nachfolgenden Abbildung 10 graphisch dargestellt, in denen die PAP Werte jeweils als Funktion der Lungenperfusionrate für die normoxische- ($O_2=21\%$) und hypoxische ($O_2=10\%$) Knockout Versuchsgruppe sowie im Vergleich zur C57/Bl6 Wildtyp Gruppe gegenüber gestellt wurden. Es ist dabei deutlich zu erkennen, dass sich der Kurvenanstieg, der C57/Bl6 Wildtyp Versuchstiere nach hypoxischer Exposition deutlich steiler darstellt im Vergleich zur C57/Bl6 Normoxiegruppe. Dies bedeutet eine Hypoxie induzierte Zunahme des PVR. Demgegenüber werden die PAP Messungen der Knockouttiere nach hypoxischen- im Vergleich zu normoxischen Aufwuchsbedingungen nur geringfügig steiler.

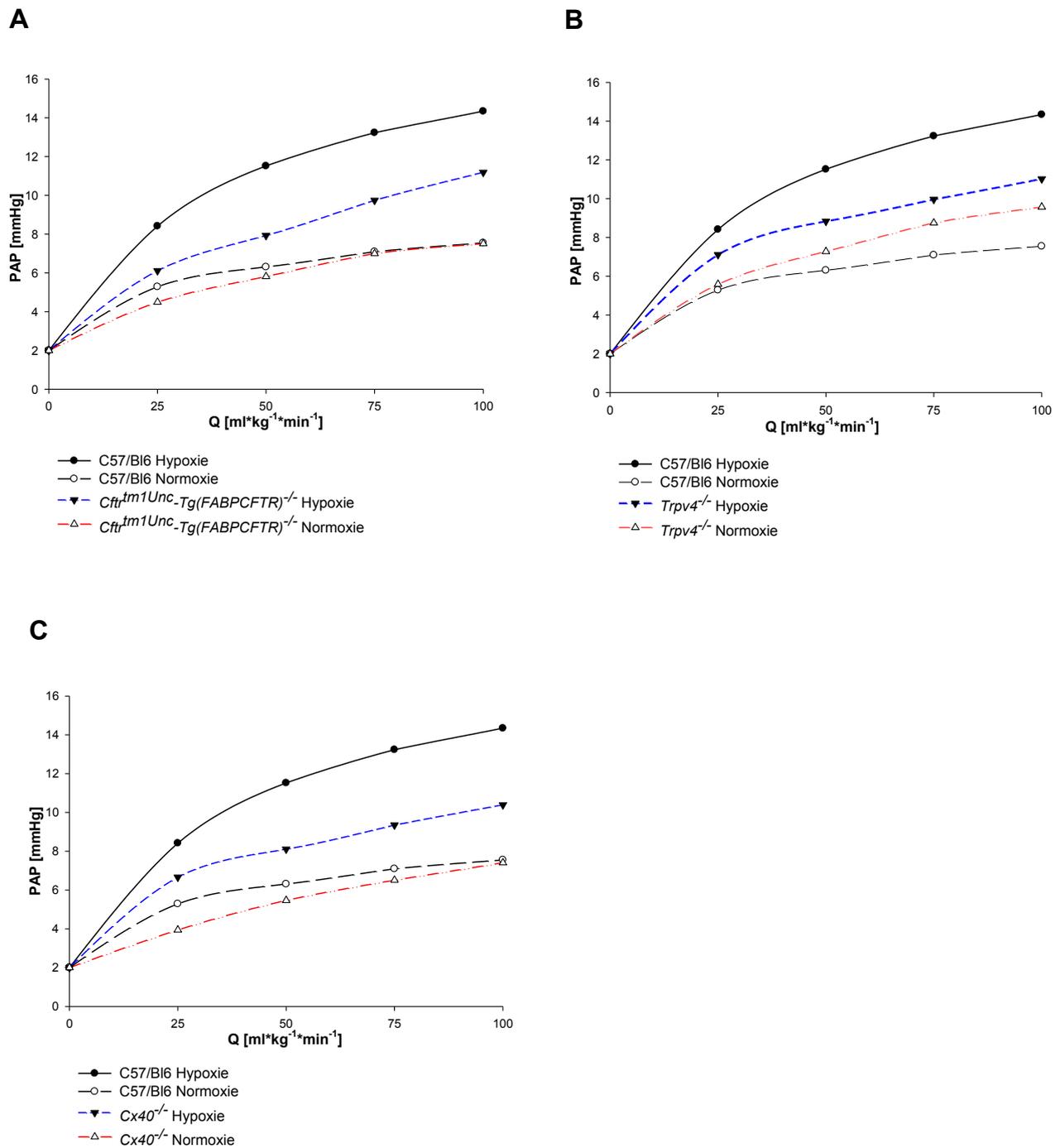


Abbildung 10: Nicht-lineare Regressionsanalyse des Gefäßmodells. Repräsentative Aufzeichnungen jeweils C57/Bl6 Wildtyp im Vergleich zu einer Knockout Gruppe nach 35 Tage normoxischer- ($O_2=21\%$) und hypoxischer Exposition ($O_2=10\%$). **A** C57/Bl6 Wildtyp- im Vergleich zu *Cft^{m1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäusen **B** C57/Bl6 Wildtyp- im Vergleich zu *Trpv4^{-/-}* Mäusen **C** C57/Bl6 Wildtyp- im Vergleich zu *Cx40^{-/-}* Mäusen

Bestimmt man zusammenfassend die Druckdifferenz zwischen den ermittelten Mittelwerten von PAP_{Hypoxie} und den Mittelwerten für PAP_{Normoxie} unter jeweils gleicher Flussrate (Q) von 50ml/min, erhält man ΔPAP , der in Abbildung 11 dargestellt ist.

Die signifikant geringeren ΔPAP Ergebnisse der Knockout- im Vergleich zu den C57/Bl6 Wildtyp Mäusen nach 35 Tagen hypoxischen Sauerstoffverhältnissen ($O_2=10\%$) zeigen eine geringere PVR ($=\Delta PAP/Q$) bei gleicher Flussrate.

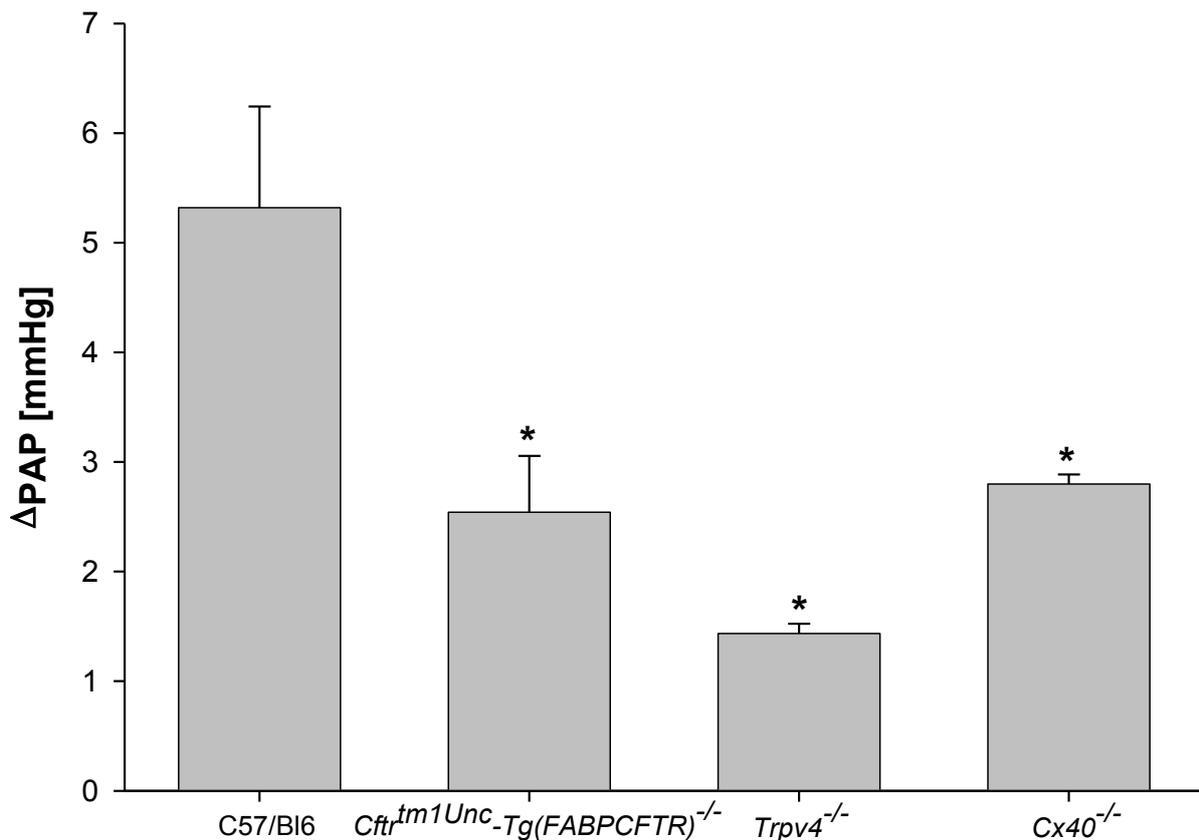


Abbildung 11: Mittlere Druckdifferenz (ΔPAP) zwischen den pulmonalarteriellen Drücken der Hypoxie- und Normoxie Versuchsgruppe bei vergleichbarer Perfusionsrate von 50 ml/min in der isoliert-perfundierten Mauslunge. * $p < 0,05$, im Vergleich der jeweiligen Knockout Untersuchungsgruppe im Vergleich zu C57/Bl6 Wildtyp Mäusen nach 35 Tagen hypoxischer Exposition ($O_2=10\%$). Anzahl der Versuchstiere (N) betrug für C57/Bl6 Wildtyp Mäuse 18 Tiere in hypoxischer- und 15 Tiere in normoxischer Expositionsgruppe. N der *Cfr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäuse betrug jeweils 13 Tiere in hypoxischer- und normoxischer Expositionsgruppe. N der *Trpv4^{-/-}* Mäuse betrug jeweils 15 Tiere in normoxischer- und hypoxischer Expositionsgruppe. N der *Cx40^{-/-}* Mäuse betrug jeweils 8 Tiere in hypoxischer- und normoxischer Expositionsgruppe.

4.5 Vaskuläres Remodelling

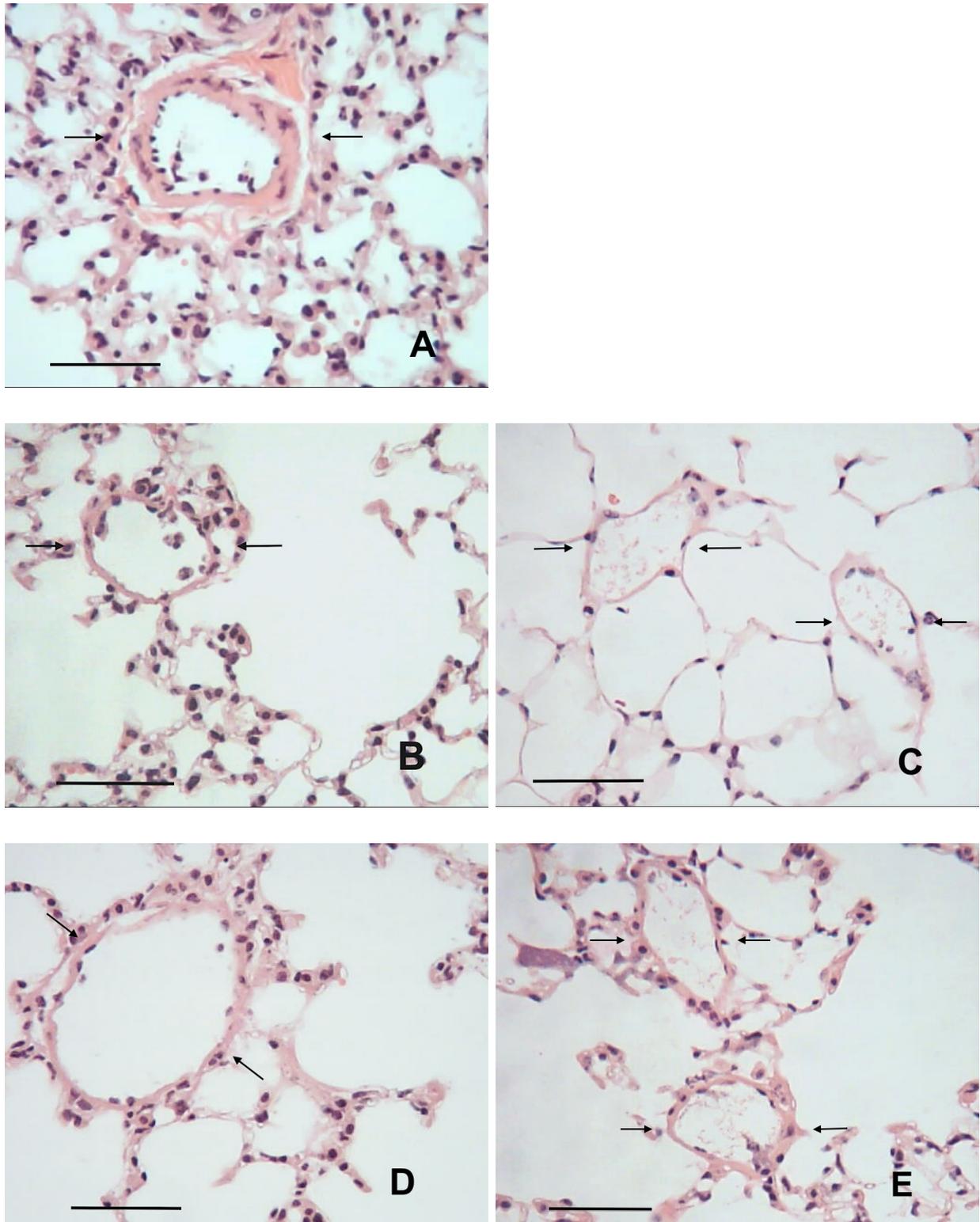


Abbildung 12: Repräsentative histologische Bilder der Pulmonalgefäße in H.E. Färbung. Balken in der linken unteren Bildhälfte entspricht jeweils 50µm. Die Pfeile in jeder Abbildung zeigen jeweils auf eine Pulmonalarteriole. **A** C57/Bl6 Hypoxie **B** C57/Bl6 Normoxie **C** *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Hypoxie **D** *Trpv4^{-/-}* Hypoxie **E** *Cx40^{-/-}* Hypoxie

Im Anschluss an die zuvor durchgeführten Experimente wurden die Lungen in Formalin konserviert, in Paraffin eingebettet und geschnitten, und die Schnitte mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Abbildung 12 zeigt anschaulich die unterschiedlichen Gefäßwanddicken in den jeweiligen Versuchsgruppen. Die Pulmonalarteriolen wurden in der Abbildung jeweils mit Pfeilen markiert. Für die histologische Auswertung von mindestens N=8 Lungen (mit jeweils circa 375 Gefäßmessungen) pro Versuchsgruppe wurde jeweils die pulmonale Gefäßwanddicke für drei Klassen von pulmonalen Arteriolen entsprechend ihres jeweiligen äußeren Durchmessers bestimmt: kleine Arteriolen: 20-50µm, mittelgroße Arteriolen: 51-100µm und große Arteriolen: 101-150µm. Die Ergebnisse wurden für jede der drei Arteriolenkategorien graphisch im direkten Vergleich der jeweiligen Gengruppe in Hypoxie vs. Normoxie Gruppe (*) dargestellt. Im gleichen Diagramm erfolgte ebenfalls ein direkter graphischer Vergleich der C57/Bl6 Wildtyp Hypoxiegruppe zur jeweiligen hypoxischen Gengruppe (#).

Die Hypoxie induzierte Verdickung der Gefäßwand (verstärktes Remodelling) der C57/Bl6 Wildtyp Vergleichsgruppe, dargestellt in Abbildung 12A und 12B, ist anhand der Abbildungen bereits erkennbar. Hingegen unterscheiden sich die Gefäßwanddicken bei den *Cx40*^{-/-} Mäusen im Vergleich zwischen Hypoxie- vs. Normoxiegruppe in allen drei Arteriolenkategorien nicht.

In der Abbildung 13 sind die Wanddicken der kleinen Arteriolen (20-50µm) der drei Knockoutgruppen sowie der C57/Bl6 Wildtyp Vergleichsgruppe jeweils nach 35 Tagen Normoxie- (O₂=21%) und Hypoxieexposition (O₂=10%) dargestellt. Dabei sind die Mittelwerte der Gefäßwanddicken jeder untersuchten Versuchsgruppe nach 35 Tagen Normoxie nahezu gleich. Im direkten Vergleich innerhalb einer Genotyp Versuchsgruppe nach Hypoxie- beziehungsweise Normoxieexposition ergeben sich signifikant höhere Gefäßdicken bei der C57/Bl6-, der *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-}- und der *Trpv4*^{-/-} Versuchsgruppe nach 35 Tagen hypoxischer Exposition (O₂=10%). Dies wurde in Abbildung 13 durch * markiert. In der Gruppe der *Cx40*^{-/-} Mäuse kommt es zu keiner mittleren Gefäßdickenveränderung nach normoxischer- vs. hypoxischer Exposition.

Betrachtet man die mittleren Gefäßdicken nach 35 Tagen Hypoxie der einzelnen Knockout Gruppen im Vergleich zur C57/Bl6 Wildtyp Gruppe ergeben sich jeweils

signifikant niedrigere Werte in den Knockout Gruppen. Dieser Sachverhalt ist in der Abbildung 13 mittels # veranschaulicht.

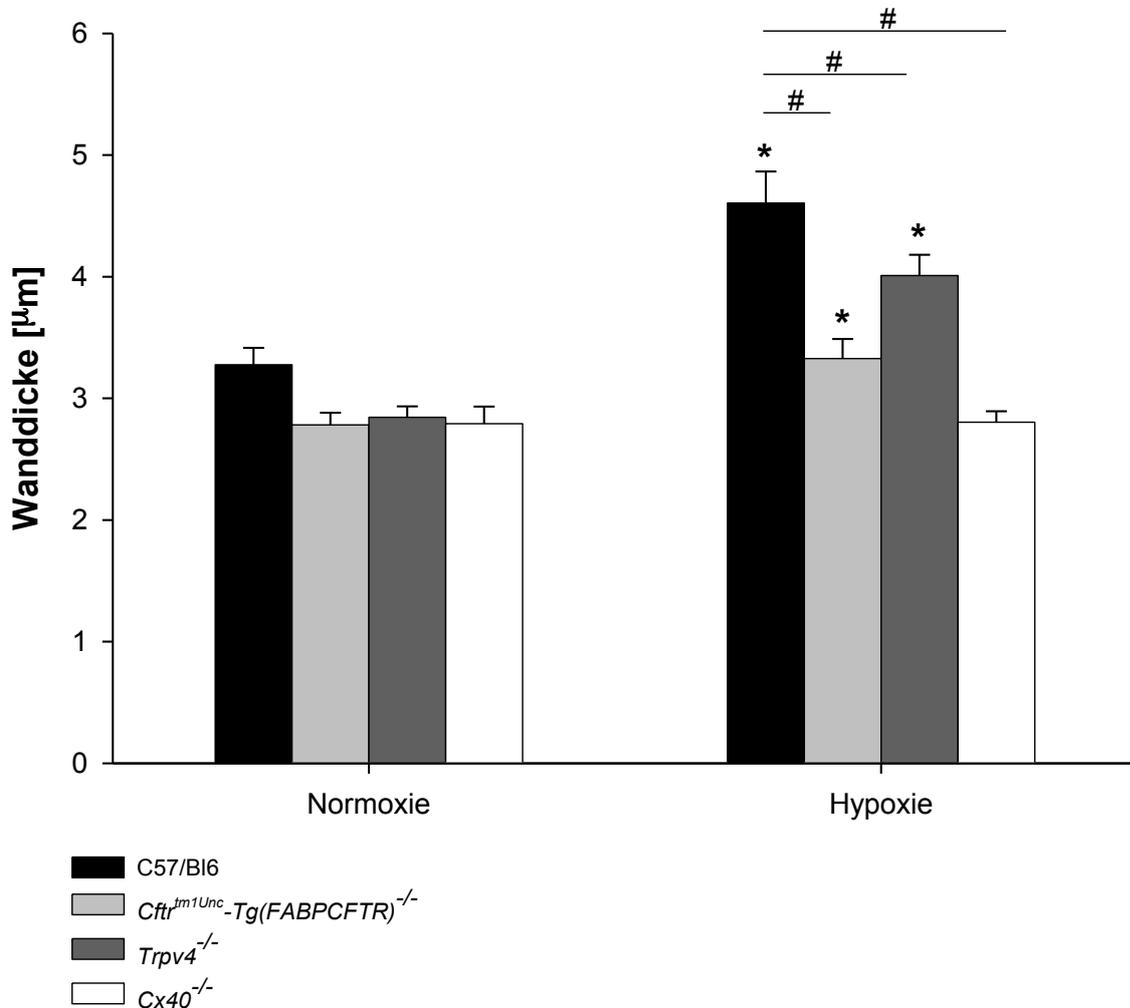


Abbildung 13: Darstellung der mittleren Gefäßwanddicke (\pm SEM) der kleinen Arteriolen (20-50 μ m) aller Untersuchungsgruppen. * $p < 0,05$, im Vergleich der jeweiligen Untersuchungsgruppe normoxische- vs. hypoxische Exposition. # $p < 0,05$ im Vergleich Knockout vs. C57/Bl6 Wildtyp für jeden Genotyp nach 35 Tagen hypoxischer Exposition. Anzahl der Gefäße (N) betrug für C57/Bl6 Wildtyp Mäuse 90 (8 Tiere) in der hypoxischen- und 172 (10 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe. N der *Cftt^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäuse betrug 197 (9 Tiere) in der hypoxischen- und 175 (8 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe. N der *Trpv4^{-/-}* Mäuse betrug 127 (8 Tiere) in der hypoxischen- und 137 (8 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe. N der *Cx40^{-/-}* Mäuse betrug 153 (8 Tiere) in der hypoxischen- und 145 (8 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe.

Betrachtet man die mittleren Gefäßwanddicken der mittelgroßen Arteriolen (51-100µm) ergeben sich ähnliche Werte, diese sind in Abbildung 14 dargestellt.

Interessanterweise zeigen sich erneut kein signifikanten Unterschied in der Gefäßwanddicke nach normoxischer- sowie hypoxischer Exposition bei den *Cx40*^{-/-} Mäusen. Im Korrelat dazu ergeben sich nach hypoxischer- beziehungsweise normoxischer Exposition signifikant höhere Gefäßdicken in der C57/Bl6-, der *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-} und der *Trpv4*^{-/-} Versuchsgruppe nach 35 Tagen hypoxischer Exposition (O₂=10%). Dies wird in Abbildung 14 durch * markiert.

Betrachtet man die mittleren Gefäßdicken nach 35 Tagen Hypoxie der einzelnen Knockout Gruppen im Vergleich zur C57/Bl6 Wildtyp Gruppe ergeben sich jeweils signifikant niedrigere Werte in den Knockout Versuchsgruppen. Dieser Sachverhalt ist in der Abbildung 14 mittels # veranschaulicht.

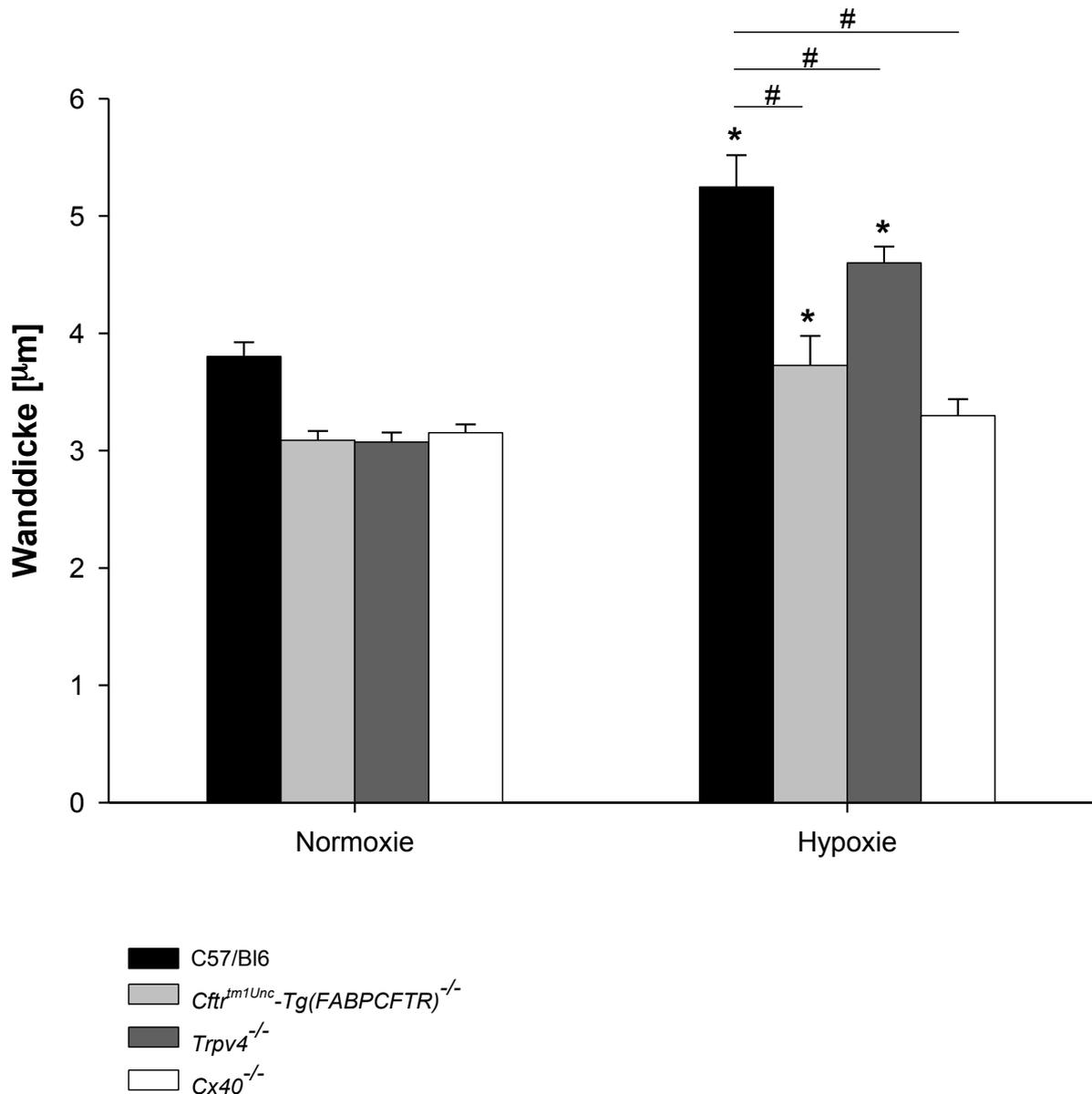


Abbildung 14: Darstellung der mittleren Gefäßwanddicke (\pm SEM) der mittelgroßen Arteriolen (51-100 μ m) aller Untersuchungsgruppen. * $p < 0,05$, im Vergleich der jeweiligen Untersuchungsgruppe normoxische- vs. hypoxische Exposition. # $p < 0,05$ im Vergleich Knockout vs. C57/Bl6 Wildtyp für jeden Genotyp nach 35 Tagen hypoxischer Exposition. Anzahl der Gefäße (N) betrug für C57/Bl6 Wildtyp Mäuse 168 (8 Tiere) in der hypoxischen- und 194 (10 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe. N der *Cflr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäuse betrug 208 (9 Tiere) in der hypoxischen- und 162 (8 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe. N der *Trpv4^{-/-}* Mäuse betrug 138 (8 Tiere) in der hypoxischen- und 195 (8 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe. N der *Cx40^{-/-}* Mäuse betrug 163 (8 Tiere) in der hypoxischen- und 157 (8 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe.

Die unterschiedliche Entwicklung der Wanddicken der großen Arteriolen (101-150µm) ist in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Im direkten Vergleich innerhalb einer Genotyp Gruppe nach Hypoxie- beziehungsweise Normoxieexposition ergeben sich signifikant höhere Gefäßdicken in der C57/Bl6- und der *Trpv4*^{-/-} Versuchsgruppe nach 35 Tagen hypoxischer Exposition, gekennzeichnet mittels *. Bei den *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-}- und den *Cx40*^{-/-} Mäusen konnte keine signifikante mittlere Gefäßdickenveränderung nach normoxischer- vs. hypoxischer Exposition ermittelt werden.

Betrachtet man die drei Knockout Gruppen im Vergleich zur C57/Bl6 Gruppe nach 35 Tagen hypoxischer Exposition unterscheiden sich die Gefäßwandentwicklungen in der Kategorie der großen- gering von denen der kleinen- und mittelgroßen Arteriolen. Im Vergleich zur C57/Bl6 Wildtyp Gruppe ergeben sich nur signifikant niedrigere Werte in den *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-}- und *Cx40*^{-/-} Versuchstieren, jedoch nicht in den *Trpv4*^{-/-} Mäusen. Dieser Unterschied ist in der Abbildung 15 mittels # veranschaulicht.

Zusammenfassend wird eine signifikante Hypertrophie der Lungengefäßwand in allen drei Arteriolengruppen der C57/Bl6 Wildtyp Gruppe nach hypoxischer- im Vergleich nach normoxischer Exposition nachgewiesen. Die Hypoxie induzierte Hypertrophie wird in den *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-}- und den *Trpv4*^{-/-} Knockout Tieren ebenfalls belegt. Interessanterweise kommt es in den *Cx40*^{-/-} Tieren zu keiner wesentlichen Hypoxie induzierten Zunahme der Gefäßdicke.

Im Vergleich der drei Knockout Gruppen zu den C57/Bl6 Wildtyp Tieren nach hypoxischer Exposition repräsentieren die Ergebnisse eine signifikant geringe Wanddicke der Knockouttiere in der Gruppe der kleinen- und mittelgroßen Arteriolen. In der Gruppe der großen Arteriolen konnte nur eine signifikant niedrigere Gefäßdicke in den *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-}- und den *Cx40*^{-/-} Mäusen im Vergleich zur C57/Bl6 Versuchsgruppe nach 35 Tagen Hypoxie ermittelt werden.

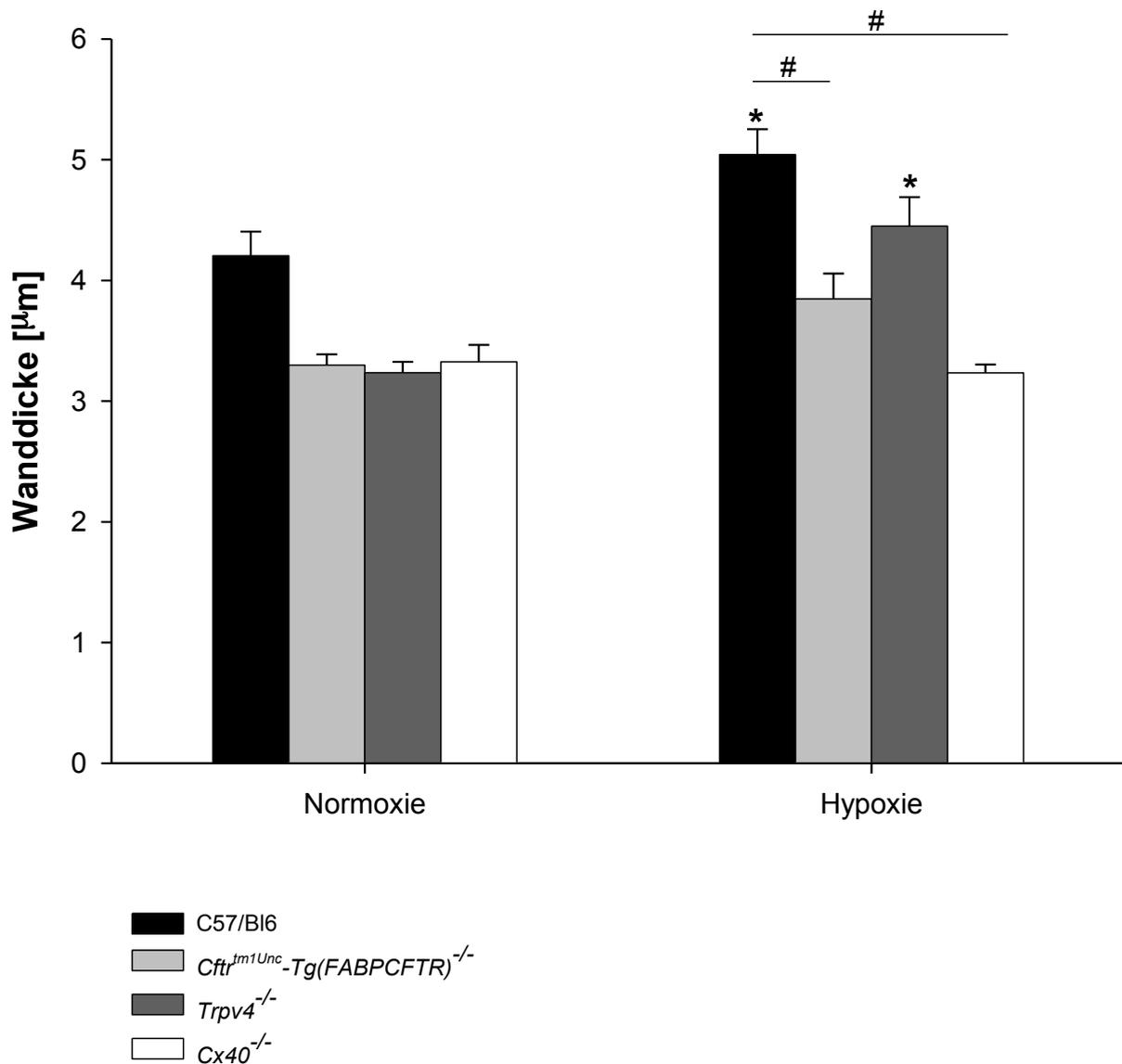


Abbildung 15: Darstellung der mittleren Gefäßwanddicke (\pm SEM) der großen Arteriolen (101-150 μ m) aller Untersuchungsgruppen. * $p < 0,05$, im Vergleich der jeweiligen Untersuchungsgruppe normoxische- vs. hypoxische Exposition. # $p < 0,05$ im Vergleich Knockout vs. C57/Bl6 Wildtyp für jeden Genotyp nach 35 Tagen hypoxischer Exposition. Anzahl der Gefäße (N) betrug für C57/Bl6 Wildtyp Mäuse 131 (8 Tiere) in der hypoxischen- und 112 (10 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe. N der *Cfr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäuse betrug 133 (9 Tiere) in der hypoxischen- und 97 (8 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe. N der *Trpv4^{-/-}* Mäuse betrug 98 (8 Tiere) in der hypoxischen- und 79 (8 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe. N der *Cx40^{-/-}* Mäuse betrug 136 (8 Tiere) in der hypoxischen- und 133 (8 Tiere) in der normoxischen Expositionsgruppe.

5 Diskussion

Weltweit leiden zahlreiche Patienten unter pulmonaler Hypertonie, einer die Lebenszeit- und -qualität stark einschränkenden Erkrankung. Im Verlauf der Erkrankung bewirkt der chronisch erhöhte Druck im pulmonalen Gefäßsystem ein zusätzliches Voranschreiten der Erkrankung, Symptome wie zum Beispiel Belastungsdyspnoe werden weiter verstärkt. Weiterentwicklungen und Verbesserungen bei der PH Therapie sind notwendig. Die Grundlagenforschung leistet dazu eine wichtige Voraussetzung.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Beteiligung der Membranproteine Cx40, TRPV4 und CFTR an der Entstehung der PH am Mausmodell nachgewiesen. Bei allen drei untersuchten Targetproteinen ergaben die Ergebnisse der Untersuchungen eine zentrale Beteiligung des Gap junctions Proteins Connexin 40 an den pulmonalen Umbauprozessen und Veränderungen unter Einfluss von chronischer Hypoxie. Umbauprozesse, die nach dem etablierten Mausmodell der chronischen Hypoxie normalerweise vorliegen, konnten in den *Cx40*^{-/-} Mäusen nicht nachgewiesen werden. So blieben der Fulton Index sowie die Dicke der pulmonalarteriellen Gefäße unter chronischer Exposition von 10%igem Sauerstoff nach 35 Tagen im Vergleich zur Normoxiegruppe unverändert. Auch erhöhte sich der pulmonalarterielle Druck in *ex vivo* Experimenten nur geringfügig und der RVSP blieb *in vivo* nach 35 Tagen im Vergleich zwischen der Normoxie- und der Hypoxiegruppe unverändert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum CFTR Transmembrankanal sowie zum TRPV4 Kationenkanal wiesen ebenfalls auf deren Beteiligung am Ablauf der chronischen Anpassungsmechanismen hin. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Hypoxie induzierten Rechtsherzhypertrophie gegenüber der C57/Bl6 Vergleichsgruppe festgestellt werden. Dem gegenüber ergaben die Messungen zum rechtsventrikulären systolischen Blutdruck und zum Remodelling nach 35 Tagen unter 10%igem Sauerstoffgehalt signifikant niedrigere Werte gegenüber den Ergebnissen der C57/Bl6 Vergleichsgruppe. Im direkten Vergleich der Ergebnisse innerhalb der *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-} oder *Trpv4*^{-/-} Versuchstiere (Hypoxie- vs. Normoxiegruppe) unterscheiden sich die Werte im Gegensatz zu den *Cx40*^{-/-} Tieren ebenfalls deutlich. Der Vergleich von PAP_m-Messungen zwischen Normoxie und

Hypoxie ergab eine geringe aber noch vorhandene Hypoxieabhängigkeit und somit auch eine Beteiligung der CFTR- und der TRPV4 Kanäle an der Ausbildung der PH. Die Unterschiede der *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* oder *Trpv4^{-/-}* sind gegenüber den Ergebnissen der *Cx40^{-/-}* Mäuse nicht so ausgeprägt. Es ist daher zu vermuten, dass TRPV4 und CFTR nur an Abschnitten der Signalkaskade beteiligt sind und ihre Funktion zumindest zum Teil durch andere Prozesse kompensiert werden kann.

5.1 Methodendiskussion: Tiermodell

Im Fokus dieser Dissertation steht die Entwicklung und Progredienz der pulmonalen Hypertonie in Folge chronischer Hypoxie. Aufgrund der Komplexität der durch Hypoxie induzierten Vasokonstriktion, dem Remodelling und dem Zusammenwirken verschiedener Zellen, wie den kapillären Endothelzellen und den PSMCs, wurde ein Tiermodell als Grundlage der Untersuchungen etabliert. Somit können parallelen zur humanen Pathogenese aufgezeigt werden. Experimente an einzelnen Zellen würden diese komplexen Mechanismen, die aktuell nicht bis ins Detail bekannt sind, nicht darstellen können.

Zur Nachbildung komplexer physiologischer Regulationen und Krankheitsprozesse der PH bevorzugen Wissenschaftler aufgrund biologischer und technischer Begebenheiten im Allgemeinen das Tiermodell der Ratte. Klassische PH Modelle wie das Monocrotalin- und das Sugen5416-Modell (SU5416) in Verbindung mit Hypoxie werden vor allem an Ratten durchgeführt¹³⁰. Später im Text wird auf die unterschiedlichen Modelle noch einmal eingegangen.

Man geht davon aus, dass Ratten wohl eine genauere Abbildung der humanen PH als Mäuse aufweisen. Gleichzeitig erleichtert die Größe der Ratte, im Vergleich zur Maus, die Erhebung physiologischer und pathophysiologischer Daten verschiedenster Organe. Jedoch basieren die Experimente dieser Dissertation auf einem Knockout Modell, denn im Mittelpunkt der Fragestellung steht die Hypothese, dass die TRPV4-, CFTR- und Cx40 Membranproteine der Lunge eine zentrale Bedeutung für die Entwicklung einer Hypoxie induzierten PH haben. Knockout Versuchstiere bilden dabei die beste Möglichkeit die Beteiligung der jeweiligen Transmembranproteine nachzuweisen. Hierdurch wird die Auswahl der Tiermodelle häufig auf die Wirbeltiere Ratte oder Maus beschränkt. Auch wenn zunehmend mehr genetisch modifizierte Versuchstierarten der

Wissenschaft zur Verfügung stehen, im Detail sind bereits CFTR Knockout Schweine und –Frettchen Bestandteil der aktuellen Forschung. Speziell gezüchtete Knockout Mäuse wurden 1989 das erste Mal verwendet und bilden heute die Grundlage etablierter wissenschaftlicher Modelle¹³¹. Erst im Jahr 2003 gelang es zum ersten Mal einer Forschungsgruppe Knockout Ratten im Labor zu züchten¹³². Aktuell bietet das Knockout Rattenmodell noch keine Genmodifizierung zur Unterdrückung der Expression aller Membranproteine, die in dieser Dissertation untersucht werden. Aus diesen Gründen bilden Labormäuse die Grundlage der Experimente dieser Dissertation.

In der Literatur werden verschiedene PH Modelle beschrieben¹³⁰. Unterschiedliche Tiermodelle weisen variable Gefäßveränderungen und damit eine unterschiedliche Nähe zur Humanpathologie auf. Häufig in der Literatur verwendete PH Tiermodelle sind das Monocrotalin- (MCT), das Hypoxie- und das Sugen5416-Modell. Zum Teil werden diese Modelle auch miteinander kombiniert.

Die Charakteristika der PH mit Mediahypertrophie und Proliferation der PASMCs der pulmonalen Arteriolen werden durch das Hypoxie- sowie das MCT induzierte Tiermodell verdeutlicht¹³³. Infolge der subkutanen MCT Injektion resultiert eine pulmonalen Gefäßverletzung und innerhalb von drei bis fünf Wochen entwickelt sich eine PH, welche mit einer massiven Entzündungsreaktion einhergeht¹²⁵. Jedoch wird die Untersuchungsform des MCT Modells fast ausschließlich bei Ratten verwendet, denn Mäuse sind nicht in der Lage MCT in den aktiven Metaboliten Dehydromonocrotalin umzuwandeln und somit kommt es zu keinem pulmonalen Remodelling¹³³.

Weitere Modelle, die verstärkt humanähnliche pathophysiologische Umbauprozesse ausbilden, zusätzlich eine Obliteration der pulmonalen Gefäße bewirken und plexiforme Läsionen, Intimaproliferationen sowie Neovaskularisationen auslösen können, sind komplexer und werden meist durch die Kombination aus Hypoxie und zusätzlichen Reizen hervorgerufen. Eine Möglichkeit besteht darin mit Hilfe von Shuntsystemen eine erhöhte Perfusion der Lunge (zum Beispiel aortocavale Fisteln zwischen V. cava inferior und Aorta abdominalis) oder eines Lungenabschnittes (zum Beispiel Lobektomie) zu erwirken^{134,135}. Jedoch weisen die Modelle eine hohe Komplikationsrate sowie eine starke Variabilität bezüglich des Schädigungsgrades auf.

Ein weiteres Modell, welches vor allem bei PH aufgrund von Linksherzerkrankungen eingesetzt wird, stellt die Ligatur der Aorta ascendens dar¹³⁴. Dabei wird aufgrund der

erzeugten Stenose eine Linksherzbelastung hervorgerufen. Diese Technik wird aufgrund der hohen Komplikationsrate sowie den hohen chirurgischen Anforderungen bevorzugt an Ratten durchgeführt.

Das aktuell häufig verwendete PH Rattenmodell mit SU5416, einem subkutan injizierten VEGF Rezeptor Blocker, in Verbindung mit zusätzlicher Hypoxie ($O_2=10\%$) erzeugt auch in Labormäusen nach 21 Tagen eine schwerwiegende PH mit plexiformen Läsionen des Gefäßbettes^{136,137}. Im Vergleich zur alleinigen Reduzierung von Sauerstoff wurde die Muskularisierung der pulmonalen Arteriolen sowie die Verdickung der Intima des Gefäßendothels mittels SU5416 verstärkt und beschleunigt. Die Arbeitsgruppe Viali und Mitarbeiter veröffentlichte 2014 ein SU5416 Mausmodell, in dem den Versuchstieren über einen Zeitraum von drei Wochen einmal pro Woche SU5416 injiziert wurde und sie gleichzeitig hypoxischen Sauerstoffverhältnissen ($O_2=10\%$) ausgesetzt waren¹³⁶. Jedoch erwiesen sich bei Untersuchungen an Mäusen im Gegensatz zur SU5416 Applikation am hypoxischen Rattenmodell die vaskulären Umbauprozesse als reversibel. 10 Wochen nach SU5416 Injektion an Mäusen unter hypoxischen Bedingungen ($O_2=10\%$) erreichte der PAP_m fast Normwerte, der Remodellingprozess sowie die Hypertrophie des rechten Ventrikels bildeten sich zurück¹³⁶.

Eine andere Möglichkeit die PH durch mehrere Reize hervorzurufen, bieten genetisch modifizierte Mausmodelle in Kombination mit Hypoxie. An dieser Stelle sind zum Beispiel das Bone Morphogenic Protein Receptor-2 (BMPR2) Knockout Modell und das Endothelin Rezeptor B Knockout Modell zu nennen^{130,135}.

BMPR2 ist ein Rezeptor für Mediatoren der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Familie. Mutationen wurden in einem Großteil der hereditären PAH sowie in circa 25% der idiopathischen PAH nachgewiesen³. Jedoch entwickeln nur circa 20% der Patienten mit einem heterozygoten BMPR2 Defekt eine PAH, worin ein weiterer Stimulus, der zu einer PAH führt, vermutet wird¹³⁸. Experimente mit heterozygoten BMPR2 Knockout Mäusen konnten bis heute nur eine milde Form der PH nachweisen, die PH nahm nach fünf Wochen unter Hypoxie nur geringfügig zu³. Für eine genaue Abbildung der humanen PH müssen wahrscheinlich noch weitere genetische oder umweltbedingte Einflüsse ergänzt werden.

Im zweiten Knockout Modell kommt es aufgrund des fehlenden Endothelin Rezeptors B zum Anstieg des intravasalen Endothelin, wodurch eine PASMC Proliferation und eine

Vasokonstriktion mit den resultierenden morphologischen Umbauprozessen, sowie für die Entwicklung einer PH charakteristischen hämodynamischen Veränderungen induziert werden^{3,130}. In BMPR2 Knockout Tieren konnte ebenfalls eine Erhöhung des Endothelinspiegels nachgewiesen werden¹³⁰.

In dieser Dissertation wurde jedoch versucht zusätzliche pharmakologische Einflüsse wie den von SU5416 oder MCT mit unklarem Korrelat für die humane PH Erkrankung und -Entwicklung auszuschließen. Zudem ist die chronische Hypoxie ein typischer und klinisch relevanter Stimulus der PH, insbesondere der Typ 3 PH (nach WHO, Tabelle 2), die im Rahmen einer alveolären Hypoxie oder chronischer Lungenerkrankungen entsteht. Ohne die verstärkende Wirkung von SU5416 wurde die hypoxische Exposition ($O_2=10\%$) der Versuchstiere auf 35 Tage verlängert^{133,137}. Neuere Versuchsanordnungen, wie das BMPR2 Knockout Modell, basierend auf genetisch modifizierten Tieren, weisen noch eine große Variabilität in der PH Ausbildung auf und fanden ebenfalls keine Anwendung in dieser Dissertation.

Somit wurde das einfache Modell der Hypoxie ohne zusätzliche Trigger verwendet. Dem Autor ist bekannt, dass sich bei diesem Hypoxiemodell im Vergleich zur humanen PH geringere pathologische Veränderungen in den pulmonalen Gefäßen ausbilden¹³⁹.

In den hier dargelegten Untersuchungen konnte jedoch nach permanenter Hypoxie über 35 Tage ($O_2=10\%$) in C57/Bl6 Wildtyp Mäusen eine deutliche pulmonale Hypertonie festgestellt werden. Diese Entwicklung zeigte sich jedoch überhaupt nicht (Cx40) oder nur teilweise (TRPV4, CFTR) in bestimmten Knockout Mäusen.

5.2 Methodendiskussion: Fehleranalyse

Jedes verwendete Messgerät weist einen geringen Messfehler auf. Mittels Eichung wurde jedes Messgerät vor der Datenerhebung kalibriert um zusätzliche Abweichungen zu vermeiden. Studien zum Millar Katheter am Mausmodell zeigten aufgrund der kleinen Maus Anatomie signifikant unterschiedliche Werte je nach Lage der Katheterspitze im Ventrikel¹³⁵. Bereits Positionsabweichungen von 5mm ergaben divergente Messwerte. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit jede RVSP Messung nach gleichem Protokoll durchgeführt und die maximalen Amplituden aufgezeichnet. Die Jugularvene wurde jeweils an gleicher Stelle injiziert und der Millar

Katheter jedes Mal gleichweit in Richtung Herz vorgeschoben. Eine Anlage der Katheterspitze an einer Ventrikelwand wurde versucht zu vermeiden. Es wurde auch darauf geachtet, dass unterschiedliche systolisch-diastolische Herzaktionen, sowie ein regelmäßiger Herzrhythmus erkennbar waren.

Eine weitere Fehlerquelle wird durch die Versuchsanordnung begünstigt. Aufgrund der Reihenfolge der Experimente kann durch mechanischen- und inflammatorischen Stress eine vorzeitige Schädigung, besonders des Lungengewebes, entstehen. Ventilationstraumata sowie Freisetzung von Zytokinen während der invasiven *in vivo* Untersuchung können dazu führen, dass sich vorzeitig Ödeme oder Atelektasen im Lungengewebe bilden. Diese wiederum beeinflussen die *post mortem* Messung des pulmonalarteriellen Drucks in der *ex vivo* Präparation der isoliert-perfundierten Lunge. Dies kann die gemessenen PAP_m Werte verfälschen.

Eine zusätzliche Fehlerquelle bildet die Schnittebene der Gefäße der histologischen Untersuchungen. Schnittebenen der Lunge können Gefäße abbilden, die nicht genau orthogonal sondern schräg angeschnitten wurden, wodurch die Messung des Gefäßdurchmessers einen größeren Wert ergibt. Das Gefäß würde dementsprechend einer höheren Gruppe der drei untersuchten Gefäßkategorien (25-50µm, 51-100µm, 101-150µm) zugeordnet. Dies könnte eine Reduzierung der durchschnittlichen Gefäßdicke, besonders der zweiten und dritten Gruppe, zur Folge haben. Aus diesem Grund wurde der Gefäßdurchmesser jeweils in zwei senkrecht aufeinander gestellten Achsen gemessen, und der kleinere als der „wahre“ Wert verwendet.

Die Methodik dieser Arbeit kann an bestimmten Stellen noch verbessert werden. Eine Erweiterung des Protokolls unter Zugabe des starken Vasodilatators Natrium-Nitroprussid zum Perfusat der invasiven *ex vivo* Experimente (isoliert-perfundierte Lunge) nach der Ermittlung des PAP ohne den Vasodilatator könnte besonders die Messergebnisse des PAP in der Versuchsanordnung der isoliert-perfundierten Lunge bekräftigen und lokale, sowie akute vasokonstriktorische Einflüsse während der Datenerhebung ausschließen. Anhand der zwei Messungen (mit- und ohne Natrium-Nitroprussid) kann festgestellt werden, welcher Wert der PAP Erhöhung auf das Remodelling beziehungsweise auf die Vasokonstriktion zurück zu führen ist. Jedoch wurde *in vivo* bereits die RVSP und somit ein PAP bestimmt und im Anschluss ein Remodelling der Lungengefäße histologisch nachgewiesen.

5.3 Chloridkanal CFTR

Aufgrund der Untersuchungen dieser Dissertation könnte man vermuten, dass Zystische Fibrose (CF) Patienten im Vergleich zu COPD Patienten eine leichtere Form der pulmonalen Hypertonie ausbilden. Jedoch zeigen klinische Studien, dass beide Patientengruppen eine ähnlich schwere PH entwickeln¹⁴⁰.

Bei der Zystischen Fibrose kommt es durch den Defekt des CFTR Kanals zur apikalen Blockade der Cl⁻ Sekretion, wodurch eine folgende Wassersekretion verhindert wird. Es resultiert eine übermäßige Ablagerung von viskösem Sekret, welches die Atemwege teilweise verlegt und Infektionen begünstigt. Aufgrund der Verlegung unterschiedlicher Lungenabschnitte und dem zusätzlichen Sauerstoffverbrauch verschiedener Keime entwickelt sich eine chronische Hypoxie. Interessanterweise unterschieden sich die *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäuse, welche fünf Wochen normalen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt waren, nicht von den C57/Bl6 Vergleichstieren. Eigentlich wurde ein erhöhter RVSP und ein vermehrtes Remodelling aufgrund der erwarteten PH bei den *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäusen vermutet. Ähnlich den Zystische Fibrose Patienten ist die Funktion des Cl⁻ Kanals bei den Knockout Mäusen in den Lungen defekt beziehungsweise nicht vorhanden.

Jedoch ist zu beachten, dass *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäuse nicht den typischen humanen Zystische Fibrose Phänotyp besitzen¹⁴¹. Die Mutation in den Versuchstieren bestand ausschließlich im Atemtrakt. Eine normale und suffiziente Nahrungsaufnahme war somit gewährleistet. Auch waren außer der Lunge keine anderen Organe betroffen, wodurch ein rasches Voranschreiten der Erkrankung und eine zusätzliche Schwächung des Organismus durch zum Beispiel Pankreasinsuffizienz vermieden werden konnte. Daher wurden in jüngster Zeit auch vor allem CFTR Knockout Schweine und Frettchen genetisch erzeugt, die die pulmonale Problematik besser replizieren¹⁴¹.

Der Einfluss von verringertem Sauerstoff (O₂=10%) bewirkte in den *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäusen, analog zur Vergleichsgruppe der C57/Bl6 Wildtyp Mäuse, die Entwicklung einer Hypoxie induzierten PH. Jedoch wiesen der RVSP, der PAP, sowie die Gefäßdicke nach fünf Wochen Hypoxie in den Knockout Tieren geringere Werte als in der C57/Bl6 Vergleichsgruppe auf. Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass der CFTR Kanal an der PH Entstehung beteiligt ist. Jedoch wurde analog dem klinischen Bild der CF erwartet, dass die *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* Mäuse im Vergleich zur C57/Bl6 Wildtyp Gruppe nach fünf Wochen Hypoxie eine gleiche bis

stärker ausgeprägte Form der PH entwickeln. Dies war jedoch nicht der Fall, die gemessenen Werte fielen geringer als in der Vergleichsgruppe aus.

Dazu existieren bisher nur wenige Daten. Bekannt ist jedoch, dass CF Patienten die PH nicht primär aufgrund des Defektes des CFTR Kanals entwickeln, sondern aufgrund der rezidivierenden Pneumonien und Atemwegspathologien, die zur chronischen Hypoxie führen¹⁰⁰. CFTR-defiziente Mäuse weisen jedoch keine Atemwegspathologien auf. Sie entwickeln sich unter Normoxie regelhaft. Ein direkter Vergleich, ob CF Patienten gemessen am Ausmaß ihrer Hypoxie mehr oder weniger PH als andere Patienten mit vergleichbarer Hypoxie (zum Beispiel COPD) aufweisen, kann anhand der Daten dieser Dissertation nicht eruiert werden. Die Veröffentlichung von Hayes und Mitarbeitern deutet allerdings an, dass CF Patienten eine genauso stark ausgeprägte PH aufweisen¹⁴⁰.

Die Ergebnisse dieser Dissertation bewiesen zum ersten Mal überhaupt am Tiermodell eine direkte Beteiligung des CFTR Kanals an der Reaktion des Lungengewebes auf den chronisch hypoxischen Reiz. Jedoch sind die genauen Mechanismen der morphologischen Umbauprozesse im Lungengewebe noch nicht vollständig geklärt.

Untersuchungen von Guimbellot und Mitarbeitern am Modell der Zelle wiesen eine verringerte CFTR Aktivität sowie eine Minimierung der Expression von CFTR unter Hypoxie nach¹⁴². Entsprechend der Hypothese von Guimbellot und Mitarbeitern müssten die C57/Bl6 Wildtyp Mäuse unter Hypoxie eine ähnlich starke PH ausbilden wie die *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-} Mäuse. Diese Ergebnisse sind abweichend von den Erkenntnissen dieser Dissertation, denn die *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-} Mäuse weisen nach Hypoxieexposition eine weniger stark ausgeprägte PH auf. In diesem Fall kann unter anderem ein zelluläres Modell nicht vollständig auf ein komplexes Tiermodell übertragen werden, da im Organismus sowohl interzelluläre als auch mediatorvermittelte CFTR beeinflussende Mechanismen eine Rolle spielen.

Eine weitere Studie von Robert und Mitarbeitern ergab eine Beteiligung des CFTR Kanals an der Regulation einer endothelunabhängigen pulmonalen Vasodilatation, welche den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen prinzipiell entgegensteht¹⁰³. Allerdings zeigen bereits erlangte Erkenntnisse einzelner Signalabläufe ein mögliches Erklärungsbild. So wird die Cl⁻ Aktivität des CFTR Kanals durch cAMP/cGMP abhängige Proteinkinase Phosphorylierung reguliert⁷⁷. Gleichzeitig wird die Vasodilatation der pulmonalen Gefäße unter anderem über cAMP/cGMP

gesteuert^{106,143}. Demgegenüber beweisen die Ergebnisse dieser Dissertation eine Beteiligung des CFTR Kanals an der Hypoxie induzierten PH.

Der Cl⁻ Einstrom des CFTR Kanals ist nachweislich an der Vasodilatation beteiligt, eine Vasokonstriktion durch Cl⁻ Einstrom als Pathomechanismus der PH spielt vermutlich keine Rolle. Somit ist der Anteil des CFTR Kanals an der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie vermutlich Cl⁻ unabhängig. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur akuten hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion wurde der direkte Einfluss von Cl⁻ auf den Mechanismus der akuten pulmonalen Vasokonstriktion auf Hypoxie untersucht¹²⁴. Theoretisch müsste eine Reduzierung des extrazellulären Cl⁻ den zellulären Cloridausstrom ins Gewebe fördern und eine Membrandepolarisation und Vasokonstriktion hervorrufen. Jedoch zeigten Experimente an der isoliert-perfundierten Lunge, in denen Cl⁻ aus dem Perfusat entnommen und das Lungengewebe einer 1%igen O₂ Konzentration ausgesetzt wurde, keine Veränderung der akut hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion im Vergleich zum Perfusat mit Cl⁻¹²⁴.

Zusätzlich konnten Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe eine Beteiligung des CFTR Kanals an der akuten HPV nachweisen. Diese Erkenntnisse sowie die Untersuchungen dieser Dissertation bestätigen den fördernden Einfluss des CFTR Kanals auf die Entwicklung einer Hypoxie induzierten PH mit ihren chronisch pulmonalen Umbauprozessen. Cl⁻ Ströme scheinen in diesen Mechanismen keine entscheidende Rolle zu spielen.

Eine alleinige Beteiligung des CFTR Kanals an den Pathomechanismen der PH ist anhand der Untersuchungsergebnisse dieser Dissertation auszuschließen. Ein Zusammenwirken vieler Prozesse und Kanäle ist an dieser Stelle sehr wahrscheinlich. Jüngste Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe belegen zum Beispiel eine Interaktion des CFTR Kanals mit dem Transient Receptor Potential Canonical 6 Transmembranprotein in der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration im Rahmen der akuten hypoxischen Vasokonstriktion¹²⁴. Es besteht sogar die Möglichkeit, dass eine CFTR-TRPV4 Interaktion eine Rolle in der Pathogenese der PH spielt. Viele Details beider Transmembrankanäle sowie weiterer Vertreter der TRP Familie sind noch unklar und verdienen weiterhin intensive Forschung.

5.4 Mechanosensitiver Kalziumkanal TRPV 4

Der fördernde Einfluss des hexahelikalen, drucksensiblen, unspezifischen Kalziumkanals TRPV4 auf die Entwicklung einer Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie konnte in dieser Dissertation bestätigt werden. Nachweislich sind die ermittelten Messwerte von RVSP und der Gefäßwanddicke nach 35 Tagen hypoxischer Exposition ($O_2=10\%$) in der Gruppe der *Trpv4*^{-/-} Mäuse im Vergleich zur Gruppe der Wildtyp C57/Bl6 Mäuse geringer. Die PH bildete sich demnach unter hypoxischen Bedingungen bei *Trpv4*^{-/-} Mäusen weniger stark aus.

Jedoch ist die genaue Wirkungsweise dieser Pathomechanismen noch nicht eindeutig geklärt. Martin und Mitarbeiter wiesen in ihren Untersuchungen nach chronisch hypoxischer Exposition die Migration von PASMCs unter Beteiligung des TRPV4 Kanals nach⁴⁹. Zusätzlich kommt es nach Fiorio und Mitarbeitern neben der TRPV4 induzierten Migration von PASMCs ebenfalls zur TRPV4 induzierten Migration von Endothelzellen, welche ein schnelleres Voranschreiten des Remodellings und der damit verbundenen Lumeneinengung der Gefäße bewirkt¹⁴⁴. Die Hypothese der TRPV4 gesteuerten Migration von PASMCs nach chronisch hypoxischer Exposition wird von den Erkenntnissen dieser Dissertation unterstützt. Dementsprechend kam es unter fünfwöchiger Hypoxie zu einem geringeren Anstieg der distalen pulmonalen Gefäßdicke der Knockout Tiere im Vergleich zur C57/Bl6 Wildtyp Gruppe. Zusätzlich könnte das geringere Remodelling der *Trpv4*^{-/-} Mäuse unter Hypoxie auf den ausbleibenden TRPV4 vermittelten Gefäßdehnungs- und somit ausbleibenden morphologischen Anpassungsreiz zurückzuführen sein.

Eine weitere Möglichkeit der Ergebnisinterpretation liegt im Pathomechanismus der PH aufgrund inflammatorischer Prozesse⁹³. Der TRPV4 Kanal wird ebenfalls in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert, wodurch deren Funktionsweise in *Trpv4*^{-/-} Mäusen von den ursprünglichen Immunzellen variiert^{15,61,111,145,146}. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss inflammatorischer Prozesse auf die Entwicklung der Hypoxie induzierten PH nicht näher untersucht, so dass auf diesen Sachverhalt an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird.

Hämodynamische Untersuchungen von Yang und Mitarbeitern bestätigten ebenfalls die Beteiligung des TRPV4 Kanals an der Entwicklung einer PH¹²². Versuche mit *Trpv4*^{-/-}

im Vergleich zu gleichaltrigen C57/Bl6 Wildtyp Mäusen ergaben einen signifikant geringeren Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks sowie des Fulton Indexes in den Knockout Versuchstieren nach vier Wochen Exposition mit 10%igem Sauerstoff. Zudem zeigte sich im Einklang mit den Ergebnissen dieser Dissertation bei den Wildtyp Tieren eine Hypoxie induzierte verstärkte Proliferation der PASMCs besonders in der distalen pulmonalarteriellen Strombahn, wohingegen *Trpv4*^{-/-} im Vergleich zu C57/Bl6 Wildtyp Mäusen eine signifikant geringere Hypertrophie der Gefäßwand aufwies. Zusätzlich konnten Yang und Arbeitsgruppe eine erhöhte Expression von TRPV4 Kanälen nach chronischer Hypoxie am Rattenmodell nachweisen¹²². Somit wurde die Hypothese einer Beteiligung des TRPV4 Kanals an der Entwicklung einer Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie von Yang und Mitarbeitern ebenfalls bestätigt. Nach der Argumentation von Yang und Mitarbeitern bildet TRPV4 einen Signalübermittler und induziert unter anderem bei längerfristig erhöhtem intravasalen Druck im pulmonalen Kreislauf einen vermehrten Ca²⁺ Einstrom in PASMCs, wodurch der Muskeltonus der Gefäßwände ansteigt und es zum Remodelling kommt.

Ein weiterer pathophysiologischer Baustein in der Entstehung einer PH ist die hypoxische Vasokonstriktion der pulmonalen Arterien. Untersuchungen von Kohler und Mitarbeitern im systemischen Kreislauf bestätigten die Drucksensibilität von TRPV4 Kanälen, wodurch es unter der Erhöhung des Gefäßwiderstandes zu gegenregulatorischen Prozessen kommt, die mittels intrazellulärer Ca²⁺ Erhöhung in Endothelzellen zu einer NO Ausschüttung führen¹¹². Nach Kohler resultiert somit eine TRPV4 induzierte NO vermittelte Vasodilatation. Die NO Ausschüttung induziert einen cGMP Anstieg im Endothel und somit ihre eigene negative Rückkopplung, es kommt zur Reduzierung der NO Ausschüttung. Zu beachten ist, dass Kohler und Mitarbeiter die Untersuchungen im systemischen- und nicht im pulmonalen Kreislauf durchgeführt hatten. Die Vasoreaktivität ist an diesen Stellen nicht einfach übertragbar. Inwieweit es in der Lunge wirklich zu einer NO Ausschüttung kommt, ist fraglich. Zudem erfolgt die NO Ausschüttung im zentralen Kreislauf im Endothel, während die TRPV4 Effekte unter chronischer Hypoxie vor allem in den PASMCs stattfinden. Es ist möglich, dass die Regulation von TRPV4 zellspezifisch erfolgt. Somit können diese Ergebnisse nicht direkt mit den Untersuchungen im pulmonalen Kreislauf verglichen werden, denn die Ergebnisse dieser Dissertation sowie von Yang und Mitarbeitern weisen eine TRPV4

beteiligte Erhöhung des RVSP, des PAP sowie des Fulton Indexes unter vierbeziehungsweise fünfwöchiger Exposition mit verringertem O₂ nach¹²².

Interessanterweise zeigen Untersuchungen von Bonnet und Mitarbeitern am Modell der Ratte ebenfalls eine intrazelluläre Ca²⁺ Erhöhung in PASMCs nach zweiwöchiger Hypoxieexposition¹⁴⁷. Es wurde postuliert, dass sich die Sensitivität und Ca²⁺ vermittelte Signalaktivität der PASMC unter chronischer Hypoxie auf kontraktile Reize, ausgelöst durch des Endothelin 1 und Angiotensin II, verringert. Eine genaue Erklärung der erhöhten intrazellulären Ca²⁺ Konzentration nach zweiwöchiger Hypoxie konnte von Bonnet jedoch nicht gegeben werden. Eine Beteiligung von TRPV4 scheint aber nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit durchaus möglich. Auch weisen die Ergebnisse von Yang und Mitarbeitern eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration in PASMCs nach vierwöchiger hypoxischer Exposition (O₂=10%) im Vergleich zur Normoxie Gruppe auf¹²². Diese erhöhte Ca²⁺ Konzentration induziert eine Vasokonstriktion, welche den PAP weiter erhöht. Insofern wäre es von Interesse, in folgenden Untersuchungen die intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration in PASMCs in *Trpv4*^{-/-} Mäusen und der Kontrollgruppe zu bestimmen um die TRPV4 induzierte intrazelluläre Ca²⁺ Erhöhung bei chronischer Hypoxie zu beweisen, beziehungsweise eine Reduzierung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration in *Trpv4*^{-/-} Tieren nachzuweisen.

In Zusammenschau der Veröffentlichungen und Dissertationsergebnisse kann formuliert werden, dass eine längerfristige intrazelluläre Ca²⁺ Erhöhung in Gefäßendothelzellen im systemischen Kreislauf eine Vasodilatation (nach Kohler), die intrazelluläre Ca²⁺ Erhöhung in den glatten Muskelzellen des pulmonalen Gefäßsystems jedoch eine Vasokonstriktion bewirkt.

In der Erkenntnisgewinnung mit Hilfe von *Trpv4*^{-/-} Versuchstieren sollten die vielseitigen Funktionen des TRPV4 Kanals nicht außer Acht gelassen werden. Neben der diskutierten drucksensiblen Aktivierung und reaktiver NO vermittelten Vasodilatation im systemischen Kreislauf, ist TRPV4 ebenfalls an Veränderungen der pulmonalen Gefäßpermeabilität und der endothelialen EDHF Produktion beteiligt¹¹³. Diese komplexen Mechanismen können bei *Trpv4*^{-/-} Mäusen nicht oder nur teilweise stattfinden. Die komplexe Signalkaskade der PH wird nicht nur auf Ebene der Endothelzellen oder der PASMCs beeinträchtigt, sondern verändert ebenfalls die

Funktionsweise anderer pulmonaler Zellen. Welche Bedeutung diese Prozesse bei der Entstehung der PH haben, muss in weiteren Studien evaluiert werden.

Die genauen Mechanismen der TRPV4 vermittelten Signalkaskade im Rahmen der Hypoxie induzierten PH, sowie die Ursachen der vermehrten Expression von TRPV4 unter chronisch hypoxischen Sauerstoffverhältnissen sind nicht bis ins Detail geklärt. Jedoch konnte die Beteiligung dieses Kanals an der Hypoxie induzierten PH in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Weitere Studien sind notwendig um den gesamten Prozess bis in seine Einzelheiten zu verstehen.

5.5 Connexin 40

Die Effekte einer genetischen Defizienz auf die Entwicklung einer Hypoxie induzierten PH waren gegenüber jenen von *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}* und *Trpv4^{-/-}* Mäusen für *Cx40^{-/-}* Versuchstiere am stärksten ausgeprägt. Die Messwerte des Fulton Indexes, des RVSP sowie der Gefäßwanddicke sind in den Gruppen der normoxischen und hypoxischen *Cx40^{-/-}* Tiere nahezu identisch. Auch ähnelten diese Werte den Ergebnissen der C57/Bl6 Wildtyp Mäusen unter normoxischen Aufwuchsbedingungen. Dies weist die immense Bedeutung des Cx40 Transmembranproteins, welches in der Lunge ausschließlich in den Endothelzellen der Lungenkapillaren und –arteriolen exprimiert ist, an der Entstehung der Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie nach²⁴.

Bisherige Untersuchungen betrachteten die PASMC gleichzeitig als Sensor- sowie Effektorzelle der hypoxischen Vasokonstriktion^{21,138}. Jedoch wurden diese Untersuchungen entweder an isolierten PASMCs oder nach endothelialer Abtragung an einem isolierten pulmonalarteriellen Gefäßring durchgeführt, wodurch die unterschiedlichen Mechanismen in PASMCs detailliert erforscht werden konnten. Eine Untersuchung der Signalkaskade der hypoxischen Vasokonstriktion zwischen Gefäßendothelzellen oder PASMCs war jedoch so von vornherein nicht möglich. Eine aktuelle Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe bewies demgegenüber zum ersten Mal eine retrograde Signaltransduktion in der Lungenstrombahn zwischen den Endothelzellen der alveolo-kapillären Barriere, also dem primären Ort des

Gasaustauschs, der entsprechend für die Messung des alveolären Sauerstoffgehalts prädestiniert ist und den PASMCs der vorgeschalteten, widerstandsregelnden Arteriolen^{24,124}. Akute oder chronische Hypoxie führt demnach in den alveolo-kapillären Endothelzellen zu einer Schließung Hypoxie sensitiver Kaliumkanäle. Die resultierende Membrandepolarisation wird über die Zell-Zell-Interaktion via Cx40 zu den Endothelzellen der zuführenden widerstandsregulierenden Arteriolen weitergeleitet und von dort vermutlich in Form eines vasokonstringierenden Lipid-Mediators an die benachbarten PASMCs kommuniziert. Die Signale bewirkten eine intrazelluläre Erhöhung der Kalziumkonzentration mit einer folgenden Kontraktion in den PASMCs der Pulmonalarteriolen. Nachweislich konnte in den C57/Bl6 Wildtyp Mäusen eine Hypoxie induzierte intrazelluläre Ca^{2+} Erhöhung im Endothel ermittelt werden. Jedoch erhöhte sich die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration der Lungenarteriolen in $Cx40^{-/-}$ Mäusen kaum, da die Signalübermittlung via Gap junctions in Abwesenheit von Cx40 nicht mehr möglich war. Demzufolge bildet die Signalkaskade der Zell-Zell-Interaktion via Cx40 einen zentralen Baustein in der Entstehung der akuten HPV wie auch der Hypoxie induzierten PH.

Diese Ergebnisse stehen somit in scheinbarem Widerspruch zu den Veröffentlichungen von Wolfle und Mitarbeitern 2007⁸³ und den Erkenntnissen von de Wit und Mitarbeitern aus dem Jahr 2000²³. Beide Autoren postulierten ebenfalls die direkte Signalvermittlung zwischen Endothelzellen über Cx40 (Conducted response) entgegen der Stromrichtung, jedoch als essentiellen Bestandteil der Relaxation glatter Muskelzellen der Gefäßarteriolen. An dieser Stelle ist zu beachten, dass sich die Untersuchungen auf den systemischen Kreislauf beziehen und aus diesem Grund die vasoreaktiven Prozesse verschieden sein können. Mechanismen, die in der Lunge an der hypoxischen Vasokonstriktion beteiligt sind, können demnach in der systemischen Zirkulation eine Vasodilatation hervorrufen. Somit widersprechen die Ergebnisse von de Wit und Wolfle nicht den Ergebnissen dieser Dissertation. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass in beiden Publikationen der Einfluss des Cx40 Transmembranproteins nach Auslösung einer Vasodilatation durch Acetylcholin oder Bradykinin (und nicht durch Hypoxie) in den Arteriolen des *Musculus Cremaster* untersucht und anschließend auf die generelle Funktion von Cx40 geschlossen wurde. Die Ergebnisse von de Wit, Wolfle und Wang sowie Mitarbeitern weisen auf gegenläufige Regulationsmechanismen in der pulmonalen vs. systemischen

Gefäßstrombahn hin. Die entgegengesetzten Effekte der beiden Gefäßgebiete traten ebenfalls an der Signalkaskade des TRPV4 Kanals auf und wurden zuvor beschrieben. Die Aktivierung von TRPV4 im systemischen Kreislauf führte zu einer NO vermittelten Vasodilatation, hingegen bewirkte die TRPV4 vermittelte intrazelluläre Ca^{2+} Erhöhung in den PASMCs eine Kontraktion.

Die beiden Autoren de Wit und Wolfle beschrieben bereits das Conducted response Prinzip, in dem bestimmte Stimuli die vasoaktiven Effekte nicht nur lokal am Gefäß sondern dieses Signal zwischen Endothelzellen via Cx40 entgegen des Gefäßstroms bis zur Effektorzelle weitergeben. Dieses Prinzip der retrograden endothelialen Cx40 vermittelten Signaltransduktion wurde, wie zuvor beschrieben, von unserer Arbeitsgruppe (Wang und Mitarbeiter) im pulmonalen Gefäßsystem nachgewiesen²⁴. Die Ergebnisse dieser Dissertation verdeutlichen, dass die endotheliale Cx40 vermittelte Signalweitergabe im pulmonalen Kreislauf auch unter chronischer Hypoxie eine wichtige Rolle spielt und somit an der Pathogenese der PH beteiligt ist.

Vermutungen zur Bedeutung von Gap Junctions bei der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion wurden bereits 2003 von Morio und Mitarbeitern geäußert¹⁴⁸. Dabei verringerte im Tiermodell der Ratte ein unspezifischer Gap junctions Blocker (18 α -Glycyrrhetinsäure) eine Vasokonstriktion der arteriellen Lungengefäße nach akuter Hypoxieexposition. Diese Hypothese wurde nun anhand der vorliegenden Dissertationsergebnisse zu chronisch pulmonaler- sowie den Ergebnissen zu akut pulmonaler Hypoxie von Wang und Mitarbeitern bestätigt. Cx40 ist an der interendothelialen Signalvermittlung sowohl bei der HPV als auch an der Entstehung der chronisch hypoxischen PH beteiligt²⁴.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde in vielen Studien die Beteiligung des Transmembranproteins Cx40 in akuter pulmonaler Hypoxie beschrieben. Es gibt jedoch nur wenige Ergebnisse und Vergleichswerte bezüglich des Einflusses von Cx40 auf die Entwicklung der Hypoxie induzierten PH.

Die zu Beginn dieser Dissertation formulierte Hypothese der Beteiligung von Connexin 40 an Hypoxie induzierten pathologischen pulmonalen Umbauprozessen und der Entwicklung einer PH konnte anhand der dargelegten Daten bestätigt werden.

5.6 Klinische Bedeutung der Ergebnisse

Die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten der pulmonalen Hypertonie sind in der Einführung detailliert beschrieben. Trotz der Verbesserung des Outcomes und der klinischen Symptome kann ein letaler Ausgang meist nicht verhindert, sondern nur hinausgezögert werden. Der Grundgedanke der aktuellen Behandlungsmöglichkeiten basiert auf der Verzögerung der zumeist irreversiblen vaskulären Veränderungen. Neue Therapieansätze wie Rho-Kinase Inhibitoren, Inhibierung inflammatorischer Prozesse sowie die Beeinflussung der Signalkaskaden der Endothelzellen und PASMCs untereinander werden bereits intensiv erforscht^{20,149}. Aktuell noch nicht abgeschlossene Studien befassen sich mit weiteren Therapiemöglichkeiten. Zu ihnen gehören Inhibitoren des Platelet Derived Growth Factor Receptor, Serotoninantagonisten, Elastaseinhibitoren sowie PDGF (Platelet Derived Growth Factor) Antagonisten^{20,33}. Schermuly zeigte bereits 2005 im Tiermodell, dass eine schwere pulmonale Hypertonie erfolgreich mittels Imatinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, der unter anderem als PDGF Rezeptor Antagonist wirkt, behandelt und eine Verringerung des Schweregrades der pulmonalen Hypertonie erzielt werden kann¹²⁵. Auf Basis der Untersuchungen von Hoffmann und Kollegen ist jedoch anzunehmen, dass der therapeutische Effekt von Imatinib auf andere Ursachen zurückzuführen ist und vermutlich nur zum Teil etwas mit dem PDGF Rezeptor zu tun hat¹⁵. Zusätzlich erfolgt durch Imatinib vor allem die Hemmung der Mastzellen und somit der inflammatorischen Reaktion. Auf dem Forschungsgebiet der entzündlichen Prozesse, die zur Entstehung einer PH beitragen beziehungsweise führen, sind zukünftig noch viele Erkenntnisse zu erwarten.

Die Ergebnisse dieser Dissertation stellen mit den Transmembranproteinen CFTR, TRPV4 und Cx40 einen weiteren neuen potenziellen Ansatzpunkt der Therapie der pulmonalen Hypertonie dar. Eine Blockade der pulmonalen CFTR- oder TRPV4 Proteine könnte vermutlich die pathologischen Remodellingprozesse sowie den pulmonalen Hypertonus verringern. Eine pulmonale Blockade des Cx40 könnte potenziell die Ausbildung einer PH sogar vollständig verhindern. Jedoch ist die gesamte Funktionsweise der Targetproteine (CFTR, TRPV4, Cx40) noch nicht bis ins Detail bekannt, wodurch nach Inhibierung dieser unter Umständen ein erhebliches Nebenwirkungspotential besteht. Dieses wird im folgenden Gliederungspunkt (Ausblick) näher beschrieben.

Interessanterweise bieten Phosphodiesterase-5-Inhibitoren neben den etablierten auch neue Therapieansätze der Behandlung der PH^{20,33}. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt eine Beschränkung der NO Freisetzung über cGMP. Dabei verringert der körpereigene Rückkopplungsmechanismus eine weitere NO Ausschüttung. Die medikamentöse Blockade der PDE-5 bewirkt einen verminderten Abbau von cGMP zu GMP, wodurch der Stickstoffmonoxidabbau reduziert wird. Diese Wirkungsweise kann jedoch nicht mit der pulmonalen TRPV4 Wirkung in Verbindung gebracht werden, denn die TRPV4 vermittelte NO Freisetzung und folgende Vasodilatation findet im systemischen Kreislauf statt⁸⁹. Die TRPV4 vermittelte intrazelluläre Erhöhung von Ca^{2+} in PASMC führt hingegen zu einer Kontraktion.

Die Erforschung neuer Pathomechanismen der PH ermöglicht die Identifizierung neuer therapeutischer Targets und damit langfristig möglicherweise eine Verbesserung der klinischen Behandlung. Jedoch ist darüber hinaus auch eine frühzeitige Diagnostik der Erkrankung notwendig um die Entwicklung irreversibler Prozesse zu verhindern. So ermöglicht die echokardiographische Vorsorge eine kostengünstige und nicht invasive Methode der Früherkennung⁴⁵. Zur optimalen Therapie der PH ist nicht nur die Erforschung der Pathogenese ausschlaggebend, es müssen vielmehr auch auf den Gebieten der Diagnostik sowie der Klassifizierung weitere Anstrengungen unternommen werden um die Prognose und Lebensqualität der PH Patienten stetig zu verbessern.

5.7 Ausblick

Die eindeutigen Ergebnisse der Untersuchungen zu Connexin 40 unter chronischer Hypoxie können einen Ansatz zum Verständnis der Pathogenese und somit eine Erklärung einiger klinischer Symptome bilden, die bis heute nicht bis ins Detail verstanden sind. In der Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe zur Rolle von Cx40 wurde bereits dessen Inhibition im Zuge systemischer Entzündungen oder unter Applikation volatiler Anästhetika diskutiert²⁴. Eine systemische Entzündung sowie volatile Narkotika führen in Tierexperimenten zur Reduzierung und Inhibierung der Cx40 vermittelten Signaltransduktion. Zusätzlich führen die systemischen Entzündungsprozesse zur reduzierten Expression von Cx40 im Lungengewebe.

Inwiefern diese Prozesse unter chronisch hypoxischen Bedingungen am Menschen, zum Beispiel bei Intensivpatienten mit Dauerbeatmung und Zugaben volatiler Anästhetika oder schwer zu behandelnden systemischen Infektionen, einen Einfluss auf die Prognose sowie die Letalität haben, ist unklar. In diesem Zusammenhang beeinflussen verschiedene Faktoren das Outcome des Patienten, eine protektive Wirkung hinsichtlich der Entstehung der PH ist unwahrscheinlich.

Sehr häufig sind rezidivierende Lungeninfekte auch ein fester Bestandteil des von CF Patienten. Ob die Infektion eine Reduzierung der Cx40 vermittelten Signaltransduktion bewirkt und somit die Patienten gar vor der Entwicklung einer PH schützen könnte, ist sehr fraglich. Nach klinischen Erfahrungen führt im Gegenteil eine Infektion der Atemwege bei CF Patienten zu einer Verschlimmerung der Symptomatik und zur Entwicklung einer manifesten PH¹⁴⁰.

Resultierend identifizieren die Ergebnisse dieser Dissertation neue Pathomechanismen der Entstehung der Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie. Mittels Beeinflussung von CFTR-, TRPV4 Kanälen und Cx40-Transmembranproteinen können die Exazerbation des klinischen Verlaufs, das Remodelling und der pulmonale Bluthochdruck positiv verändert werden. Die drei Transmembranproteine bilden somit neue Ansatzpunkte der medikamentösen Therapieoptionen der pulmonalen Hypertonie. Jedoch sind noch weitere Studien auf dem Gebiet der Hypoxie induzierten PH notwendig um einen für den Menschen adäquaten Therapieansatz zu etablieren.

Es ist zu beachten, dass reine Blockierungen von CFTR-, TRPV4- und Cx40 Transmembranproteinen aufgrund der Expression in einer Vielzahl von Zellen und der damit verbunden vielseitigen Funktionen ein großes Nebenwirkungspotential bergen. Aktuelle Untersuchungen am Menschen ergaben einen Zusammenhang zwischen der verminderten atrialen Cx40 Funktion und der Entstehung von Vorhofflimmern¹¹⁵. Direkte Cx40 Inhibitoren wären aufgrund der arrhythmogenen Effekte vermutlich kontraindiziert. Die Cx40 vermittelte endotheliale Kommunikation im pulmonalen sowie im systemischen Kreislauf würde ebenfalls beeinträchtigt. Auch kann der CFTR Kanal nicht einfach medikamentös inhibiert werden, was der Induzierung einer Zystischen Fibrose gleichkommen würde. Hingegen besteht die Möglichkeit mittels Blockade des unspezifischen, drucksensiblen Kalziumkanals TRPV4 eine Reduzierung der Vasokonstriktion oder des Remodellings zu bewirken. Neue Untersuchungen zeigten ebenso eine Beteiligung von TRPV4 in der Migration und Kontraktion von glatten

Muskelzellen in den Atemwegen. Die extrapulmonale TRPV4 Wirkung kann an dieser Stelle jedoch nicht unerwähnt bleiben, denn Studien zeigten eine TRPV4 vermittelte Vasodilatation der systemischen Gefäße¹¹². Auch werden durch Inhibition von TRPV4 unter anderem Signalkaskaden von Entzündungsreaktionen stark beeinflusst¹¹³.

Des Weiteren zeigen genetische Untersuchungen von COPD Patienten eine Korrelation einer Mutation im TRPV4 Gen mit der Ausprägung des Schweregrades der Erkrankung¹¹³. Es existieren jedoch noch keine Untersuchungen zur humanen TRPV4 Inhibierung.

Es ist weiterhin zu beachten, dass Erkenntnisse von Tiermodellen nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind. So konnten aktuelle Studien zur PH den positiven Einfluss von Simvastatin am Menschen nicht bestätigen, obwohl im Tiermodell Verbesserungen der PH erreicht wurden¹⁵⁰.

Es ist denkbar, dass in Zukunft die partielle Beeinflussung der drei Targetproteine in geringer Dosis oder in ganz bestimmten Erkrankungsstadien der PH Anwendung finden.

Mit den motivierenden Erkenntnissen dieser Dissertation wurden neue Ansatzwege der Behandlung der pulmonalen Hypertonie offen gelegt und verdienen weiterer Forschung. Die Ergebnisse der Grundlagenforschung müssen nun auf Studien am Mensch übertragen und auf ihre klinische Anwendbarkeit überprüft werden.

6 Zusammenfassung

Die Erkrankung der pulmonalen Hypertonie (PH) ist als Anstieg des mittleren pulmonalarteriellen Blutdrucks auf Werte größer 25mmHg definiert¹. Diese Messung erfolgt mittels Rechtsherzkatheter oder Echokardiographie.

Die Pathogenese der PH ist sehr vielfältig, jedoch sind die zellulären Mechanismen des vaskulären Remodellings und der Rechtsherzhypertrophie als gemeinsame Endstrecke der unterschiedlichen Pathogenesen bislang nicht bis ins Detail verstanden. Bisherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe vermuten und zeigten eine Beteiligung des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator- (CFTR), des Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Kanals und des Connexin 40 (Cx40) Transmembranproteins an den Mechanismen des Remodellings, der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion und der Rechtsherzhypertrophie^{24,124,151}. Einzeln oder in Summe führen diese Mechanismen zu irreversiblen Veränderungen und einer Exazerbation der pulmonalen Hypertonie.

Der CFTR Kanal ist ein aktiver Chloridionen Transmembrantransporter, der normalerweise die Viskosität des Schleimes erniedrigt⁹⁹. Der Defekt des Transmembrankanals bei Zystische Fibrose (CF) Patienten führt zu einer Viskositätserhöhung unter anderem des Lungensekrets und erschwert dessen Abtransport¹⁰⁰. Unsere Arbeitsgruppe bewies eine direkte Beteiligung des CFTR Kanals an der akuten hypoxischen Vasokonstriktion¹²⁴. Zusätzlich konnte in dieser Dissertation nun die Beteiligung an den Mechanismen der chronischen Hypoxie induzierten PH nachgewiesen werden.

Der TRPV4 Kanal ist ein unspezifischer, mechanosensitiver Kalziumkanal, welcher durch erhöhten intravasalen Druck aktiviert wird und zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration führt¹¹³. Im pulmonalen Kreislauf ist TRPV4 vor allem an pulmonalarteriellen Gefäßmuskelzellen (PASMCs) exprimiert und führt nach Aktivierung zu deren Kontraktion¹¹³. Im systemischen Kreislauf hingegen bewirkt eine Aktivierung der TRPV4 Kanäle, welche vor allem auf Endothelzellen exprimiert sind, eine Stickstoffmonoxid (NO) vermittelte Vasodilatation¹¹².

Das Cx40 Transmembranprotein stellt einen Bestandteil der Gap junctions und somit der interzellulären Kommunikation dar. Es ist in der Lunge selektiv in den Gefäßendothelzellen der pulmonalen Arteriolen und Kapillaren exprimiert¹¹⁴. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bewiesen bereits eine kritische Beteiligung des Cx40 an der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion²⁴. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnte in dieser Dissertation auch die fundamentale Beteiligung von Cx40 an der Entstehung der chronischen Hypoxie induzierten PH nachgewiesen werden.

Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um eine experimentelle Versuchsanordnung am Tiermodell der Maus. Um eine Beteiligung der drei Membranproteine an der Hypoxie induzierten PH nachzuweisen, wurden spezielle Knockout Versuchstiere (*Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}*, *Trpv4^{-/-}*, *Cx40^{-/-}*) gezüchtet und jeweils in zwei Gruppe eingeteilt. Die erste Gruppe wurde für 35 Tage hypoxischen Sauerstoffverhältnissen ($O_2=10\%$), die zweite Gruppe 35 Tage normalen Sauerstoffverhältnissen ausgesetzt ($O_2=21\%$). Nach fünf Wochen wurden das Gewicht und der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) *in vivo* bestimmt. Nach Exsanguination erfolgte eine direkte Bestimmung der Druck-Fluss Kurven am Modell der isoliert-perfundierten Lunge um Rückschlüsse auf den pulmonalen Strömungswiderstand zu erlangen. Anschließend erfolgte die Kalkulation des Fulton Indexes (Gewicht rechter Ventrikel im Verhältnis zum Gewicht des linken Ventrikels mit Septum) zur Evaluierung der Rechtsherzhypertrophie. Am Ende wurden die Lungen histologisch aufgearbeitet und nach Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung die jeweilige Wanddicke der arteriellen Gefäße ermittelt. Zum direkten Vergleich der Ergebnisse der Knockouttier-Messung wurden C57/Bl6 Wildtyp Mäuse ebenfalls hypoxischen oder normoxischen Sauerstoffverhältnissen ausgesetzt und den Messungen unterzogen.

Die Experimente ergaben eine zentrale Beteiligung des Gap junctions Proteins Connexin 40 an den pulmonalen Umbauprozessen und Veränderungen unter Einfluss von chronischer Hypoxie. Die signifikante Erhöhung der RVSP, des Fulton Indexes sowie der Wanddicke der pulmonalarteriellen Gefäße, die normalerweise in den C57/Bl6 Wildtyp Mäusen nach chronischer Hypoxie gegenüber der unter normoxischen Sauerstoffbedingungen aufwachsenden C57/Bl6 Kontrollgruppe auftraten, waren in der *Cx40^{-/-}* Hypoxie Gruppe nicht nachweisbar. Es konnte kein signifikanter Unterschied in

allen Messungen nach 35 Tagen chronischer Exposition von entweder 10%igem oder 21%igem Sauerstoff in den *Cx40*^{-/-} Mäusen ermittelt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum CFTR Transmembrankanale sowie zum TRPV4 Kationenkanal bewiesen ebenfalls deren Beteiligung an der Entwicklung einer Hypoxie induzierten PH. Der RVSP sowie die Hypertrophie der pulmonalarteriellen Gefäßwände nach 35 Tagen Hypoxie (O₂=10%) waren jeweils signifikant niedriger gegenüber der C57/Bl6 Wildtyp Vergleichsgruppe. Jedoch konnte nicht in allen Messungen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Wildtyp Vergleichsgruppe festgestellt werden. So unterschied sich die Hypoxie induzierte Rechtsherzhypertrophie bei den *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-} und den *Trpv4*^{-/-} Tieren nur marginal von der C57/Bl6 Vergleichsgruppe. Auch ergaben sich im direkten Vergleich innerhalb der *Cftr*^{tm1Unc}-*Tg(FABPCFTR)*^{-/-} sowie der *Trpv4*^{-/-} Versuchsgruppe im Gegensatz zu den *Cx40*^{-/-} Tieren weiterhin signifikante Unterschiede bezüglich der untersuchten Parameter nach fünf Wochen Hypoxie.

Es ist daher zu vermuten, dass TRPV4 und CFTR nur in Abschnitten an der Signalkaskade der PH Entstehung beteiligt sind und noch weitere Prozesse eine Rolle spielen. Hingegen scheint das Transmembranprotein Cx40 maßgeblich an der Entwicklung der PH beteiligt zu sein.

Diese Erkenntnisse erweitern das Verständnis der Entstehung der pulmonalen Hypertonie. Der zusätzliche Informationsgewinn der pathologischen Prozesse dieser Erkrankung bietet neue Ansätze der Therapie. Jedoch ist aufgrund der vielseitigen Expression der Transmembranproteine CFTR, TRPV4 und Cx40 auf unterschiedlichen Zellen die Funktionsweise nicht vollständig erforscht. Eine mögliche direkte therapeutische Hemmung birgt somit ein hohes Nebenwirkungspotential. Zur weiteren Validierung der Untersuchungsergebnisse und zur Umsetzung der Erkenntnisse in die klinischen Abläufe bedarf es daher noch weiterer intensiver Forschung.

7 Literaturverzeichnis

1. Hoepfer MM, Bogaard HJ, Condliffe R, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:D42-50.
2. Vanderpool RR, Kim AR, Molthen R, Chesler NC. Effects of acute Rho kinase inhibition on chronic hypoxia-induced changes in proximal and distal pulmonary arterial structure and function. *Journal of applied physiology* 2011;110:188-98.
3. Shimoda LA, Laurie SS. Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Journal of molecular medicine* 2013;91:297-309.
4. Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology* 2006;21:134-45.
5. Statistisches Bundesamt. (2015, 22.10.2015). Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Eckdaten der vollstationären Patienten und Patientinnen). Region: Deutschland, ICD10: Alle Diagnosen/Behandlungsanlässe, Art der Standardisierung: Standardbevölkerung "Deutschland 2011". from <http://www.gbe-bund.de>.
6. Statistisches Bundesamt. (2015, 22.10.2015). Sterbefälle, Sterbeziffern (je 100.000 Einwohner, altersstandardisiert) (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region: Deutschland, Alter: Alle Altersgruppen, Geschlecht: Beide Geschlechter, Nationalität: Alle Nationalitäten, ICD-10, Art der Standardisierung: Standardbevölkerung "Deutschland 2011". from <http://www.gbe-bund.de>.
7. West JB. Role of the fragility of the pulmonary blood-gas barrier in the evolution of the pulmonary circulation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2013;304:R171-6.
8. Naeije R, Vanderpool R, Dhakal BP, et al. Exercise-induced pulmonary hypertension: physiological basis and methodological concerns. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013;187:576-83.
9. Hughes JM, Glazier JB, Maloney JE, West JB. Effect of lung volume on the distribution of pulmonary blood flow in man. *Respiration physiology* 1968;4:58-72.
10. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiological reviews* 2012;92:367-520.

11. Presson RG, Jr., Baumgartner WA, Jr., Peterson AJ, Glenny RW, Wagner WW, Jr. Pulmonary capillaries are recruited during pulsatile flow. *J Appl Physiol* 2002;92:1183-90.
12. Kuebler WM, Ying X, Bhattacharya J. Pressure-induced endothelial Ca(2+) oscillations in lung capillaries. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2002;282:L917-23.
13. Lansman JB, Hallam TJ, Rink TJ. Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature* 1987;325:811-3.
14. Schwarz G, Droogmans G, Nilius B. Shear stress induced membrane currents and calcium transients in human vascular endothelial cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 1992;421:394-6.
15. Hoffmann J, Yin J, Kukucka M, et al. Mast cells promote lung vascular remodelling in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2011;37:1400-10.
16. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1992;327:70-5.
17. Cogolludo A, Moreno L, Villamor E. Mechanisms controlling vascular tone in pulmonary arterial hypertension: implications for vasodilator therapy. *Pharmacology* 2007;79:65-75.
18. Ward JP, McMurtry IF. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. *Current opinion in pharmacology* 2009;9:287-96.
19. Veyssier-Belot C, Cacoub P. Role of endothelial and smooth muscle cells in the physiopathology and treatment management of pulmonary hypertension. *Cardiovascular research* 1999;44:274-82.
20. Lourenco AP, Fontoura D, Henriques-Coelho T, Leite-Moreira AF. Current pathophysiological concepts and management of pulmonary hypertension. *International journal of cardiology* 2012;155:350-61.
21. Tabuchi A, Mertens M, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM. Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol* 2008;104:338-46.
22. Figueroa XF, Duling BR. Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxidants & redox signaling* 2009;11:251-66.

23. de Wit C, Roos F, Bolz SS, et al. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circulation research* 2000;86:649-55.
24. Wang L, Yin J, Nickles HT, et al. Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:4218-30.
25. Weitzenblum E, Chaouat A. Cor pulmonale. *Chronic respiratory disease* 2009;6:177-85.
26. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L, Stewart S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2007;30:104-9.
27. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006;173:1023-30.
28. Benza RL, Miller DP, Barst RJ, Badesch DB, Frost AE, McGoon MD. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest* 2012;142:448-56.
29. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:D34-41.
30. Bevc CA, J HR, D MV. New perspectives on the "silo effect": initial comparisons of network structures across public health collaboratives. *American journal of public health* 2015;105 Suppl 2:S230-5.
31. Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, et al. High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006;174:590-8.
32. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, et al. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 2013;369:351-61.
33. McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, Humbert M. Management of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2015;65:1976-97.
34. Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, et al. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* 2010;137:376-87.

35. Elliott CG, Barst RJ, Seeger W, et al. Worldwide physician education and training in pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest* 2010;137:85S-94S.
36. Vachieri JL, Adir Y, Barbera JA, et al. Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:D100-8.
37. Seeger W, Adir Y, Barbera JA, et al. Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:D109-16.
38. Chaouat A, Bugnet AS, Kadaoui N, et al. Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005;172:189-94.
39. Newman JH. Pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005;172:1072-7.
40. Brown LM, Chen H, Halpern S, et al. Delay in recognition of pulmonary arterial hypertension: factors identified from the REVEAL Registry. *Chest* 2011;140:19-26.
41. Runo JR, Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 2003;361:1533-44.
42. Rich S, McLaughlin VV, O'Neill W. Stenting to reverse left ventricular ischemia due to left main coronary artery compression in primary pulmonary hypertension. *Chest* 2001;120:1412-5.
43. Nef HM, Mollmann H, Hamm C, Grimminger F, Ghofrani HA. Pulmonary hypertension: updated classification and management of pulmonary hypertension. *Heart* 2010;96:552-9.
44. Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, et al. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;43:40S-7S.
45. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;53:1573-619.
46. Kim NH, Delcroix M, Jenkins DP, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:D92-9.

47. Bossone E, Bodini BD, Mazza A, Allegra L. Pulmonary arterial hypertension: the key role of echocardiography. *Chest* 2005;127:1836-43.
48. Soubrier F, Chung WK, Machado R, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:D13-21.
49. Martin E, Dahan D, Cardouat G, et al. Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2012;464:261-72.
50. Wojciak-Stothard B, Zhao L, Oliver E, et al. Role of RhoB in the regulation of pulmonary endothelial and smooth muscle cell responses to hypoxia. *Circulation research* 2012;110:1423-34.
51. Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, et al. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:11418-23.
52. Pozeg ZI, Michelakis ED, McMurtry MS, et al. In vivo gene transfer of the O₂-sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Circulation* 2003;107:2037-44.
53. Shao D, Park JE, Wort SJ. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2011;63:504-11.
54. Tuder RM, Abman SH, Braun T, et al. Development and pathology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;54:S3-9.
55. Hunt JM, Bethea B, Liu X, et al. Pulmonary veins in the normal lung and pulmonary hypertension due to left heart disease. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2013;305:L725-36.
56. Nicolls MR, Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, Badesch DB, Voelkel NF. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2005;26:1110-8.
57. Kerem A, Yin J, Kaestle SM, et al. Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization. *Circulation research* 2010;106:1103-16.

-
58. Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Wallwork J. Relationship between chronic hypoxia and in vitro pulmonary relaxation mediated by endothelium-derived relaxing factors in human chronic obstructive lung disease. *Angiology* 1992;43:350-6.
 59. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1995;333:214-21.
 60. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1999;159:1925-32.
 61. Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:D4-12.
 62. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2003;22:358-63.
 63. Humbert M, Monti G, Brenot F, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995;151:1628-31.
 64. Becker MO, Kill A, Kutsche M, et al. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2014;190:808-17.
 65. Lang IM, Pesavento R, Bonderman D, Yuan JX. Risk factors and basic mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a current understanding. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2013;41:462-8.
 66. Lang IM. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension--not so rare after all. *The New England journal of medicine* 2004;350:2236-8.
 67. Yang X, Long L, Southwood M, et al. Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation research* 2005;96:1053-63.
 68. Teichert-Kuliszewska K, Kutryk MJ, Kuliszewski MA, et al. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival:

- implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circulation research* 2006;98:209-17.
69. Nilius B, Voets T. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO reports* 2013;14:152-63.
70. Galie N, Manes A, Negro L, Palazzini M, Bacchi-Reggiani ML, Branzi A. A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *European heart journal* 2009;30:394-403.
71. Bassily-Marcus AM, Yuan C, Oropello J, Manasia A, Kohli-Seth R, Benjamin E. Pulmonary hypertension in pregnancy: critical care management. *Pulmonary medicine* 2012;2012:709407.
72. Sitbon O, Humbert M, Jais X, et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005;111:3105-11.
73. Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1992;327:76-81.
74. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976;263:663-5.
75. Sablotzki A, Czeslick E, Gruenig E, et al. First experiences with the stable prostacyclin analog iloprost in the evaluation of heart transplant candidates with increased pulmonary vascular resistance. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2003;125:960-2.
76. Yin N, Kaestle S, Yin J, et al. Inhaled nitric oxide versus aerosolized iloprost for the treatment of pulmonary hypertension with left heart disease. *Critical care medicine* 2009;37:980-6.
77. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation* 2002;106:1477-82.
78. Olschewski H, Simonneau G, Galie N, et al. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 2002;347:322-9.
79. Simonneau G, Barst RJ, Galie N, et al. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial

- hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;165:800-4.
80. McLaughlin VV, Benza RL, Rubin LJ, et al. Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled clinical trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;55:1915-22.
 81. Galie N, Corris PA, Frost A, et al. Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:D60-72.
 82. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, et al. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 1993;91:1367-73.
 83. Galie N, Rubin L, Hoeper M, et al. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2008;371:2093-100.
 84. Barst RJ, Rich S, Widlitz A, Horn EM, McLaughlin V, McFarlin J. Clinical efficacy of sitaxsentan, an endothelin-A receptor antagonist, in patients with pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. *Chest* 2002;121:1860-8.
 85. Galie N, Olschewski H, Oudiz RJ, et al. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation* 2008;117:3010-9.
 86. Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 2013;369:809-18.
 87. Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, et al. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:895-900.
 88. Kass DA, Champion HC, Beavo JA. Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circulation research* 2007;101:1084-95.
 89. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 2005;353:2148-57.
 90. Archer SL, Michelakis ED. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 2009;361:1864-71.

91. Ghofrani HA, D'Armini AM, Grimminger F, et al. Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 2013;369:319-29.
92. Kurzyna M, Dabrowski M, Bielecki D, et al. Atrial septostomy in treatment of end-stage right heart failure in patients with pulmonary hypertension. *Chest* 2007;131:977-83.
93. Sandoval J, Gaspar J, Pena H, et al. Effect of atrial septostomy on the survival of patients with severe pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2011;38:1343-8.
94. Reichenberger F, Pepke-Zaba J, McNeil K, Parameshwar J, Shapiro LM. Atrial septostomy in the treatment of severe pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2003;58:797-800.
95. Humbert M, Lau EM, Montani D, Jais X, Sitbon O, Simonneau G. Advances in therapeutic interventions for patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2014;130:2189-208.
96. Fadel E, Mercier O, Mussot S, et al. Long-term outcome of double-lung and heart-lung transplantation for pulmonary hypertension: a comparative retrospective study of 219 patients. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2010;38:277-84.
97. Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, et al. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;54:S55-66.
98. Blanco I, Gimeno E, Munoz PA, et al. Hemodynamic and gas exchange effects of sildenafil in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010;181:270-8.
99. Akabas MH. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:3729-32.
100. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996;154:1229-56.

101. Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, Simon RH, Rodman D. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest* 2004;125:1S-39S.
102. Soni R, Dobbin CJ, Milross MA, Young IH, Bye PP. Gas exchange in stable patients with moderate-to-severe lung disease from cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2008;7:285-91.
103. Robert R, Savineau JP, Norez C, Becq F, Guibert C. Expression and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat intrapulmonary arteries. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2007;30:857-64.
104. Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 1991;251:679-82.
105. Vaandrager AB, Tilly BC, Smolenski A, et al. cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type I β . *The Journal of biological chemistry* 1997;272:4195-200.
106. Fullerton DA, Agrafojo J, McIntyre RC, Jr. Pulmonary vascular smooth muscle relaxation by cAMP-mediated pathways. *The Journal of surgical research* 1996;61:444-8.
107. Montell C. Molecular genetics of *Drosophila* vision. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1989;11:43-8.
108. Firth AL, Remillard CV, Yuan JX. TRP channels in hypertension. *Biochimica et biophysica acta* 2007;1772:895-906.
109. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426:517-24.
110. Kung C. A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* 2005;436:647-54.
111. Yin J, Kuebler WM. Mechanotransduction by TRP channels: general concepts and specific role in the vasculature. *Cell biochemistry and biophysics* 2010;56:1-18.
112. Kohler R, Heyken WT, Heinau P, et al. Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006;26:1495-502.

113. Goldenberg NM, Ravindran K, Kuebler WM. TRPV4: physiological role and therapeutic potential in respiratory diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2015;388:421-36.
114. Rignault S, Haefliger JA, Waeber B, Liaudet L, Feihl F. Acute inflammation decreases the expression of connexin 40 in mouse lung. *Shock* 2007;28:78-85.
115. Gemel J, Levy AE, Simon AR, et al. Connexin40 abnormalities and atrial fibrillation in the human heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2014;76:159-68.
116. Severs NJ, Rothery S, Dupont E, et al. Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. *Microscopy research and technique* 2001;52:301-22.
117. Simon AM, McWhorter AR, Chen H, Jackson CL, Ouellette Y. Decreased intercellular communication and connexin expression in mouse aortic endothelium during lipopolysaccharide-induced inflammation. *Journal of vascular research* 2004;41:323-33.
118. Wolfle SE, Schmidt VJ, Hoepfl B, et al. Connexin45 cannot replace the function of connexin40 in conducting endothelium-dependent dilations along arterioles. *Circulation research* 2007;101:1292-9.
119. Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, et al. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2008;32:1639-51.
120. Urban N, Hill K, Wang L, Kuebler WM, Schaefer M. Novel pharmacological TRPC inhibitors block hypoxia-induced vasoconstriction. *Cell calcium* 2012;51:194-206.
121. Kuebler WM. Real-time imaging assessment of pulmonary vascular responses. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2011;8:458-65.
122. Yang XR, Lin AH, Hughes JM, et al. Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L555-68.
123. Stoltz DA, Meyerholz DK, Welsh MJ. Origins of cystic fibrosis lung disease. *The New England journal of medicine* 2015;372:351-62.

-
124. Tabeling C, Yu H, Wang L, et al. CFTR and sphingolipids mediate hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015;112:E1614-23.
 125. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:2811-21.
 126. Thal SC, Plesnila N. Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice. *Journal of neuroscience methods* 2007;159:261-7.
 127. Linehan JH, Haworth ST, Nelin LD, Krenz GS, Dawson CA. A simple distensible vessel model for interpreting pulmonary vascular pressure-flow curves. *J Appl Physiol* 1992;73:987-94.
 128. Spohr F, Busch CJ, Reich C, et al. 4-Aminopyridine restores impaired hypoxic pulmonary vasoconstriction in endotoxemic mice. *Anesthesiology* 2007;107:597-604.
 129. Peake MD, Harabin AL, Brennan NJ, Sylvester JT. Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species. *J Appl Physiol* 1981;51:1214-9.
 130. Maarman G, Lecour S, Butrous G, Thienemann F, Sliwa K. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulmonary circulation* 2013;3:739-56.
 131. Bernstein A, Breitman M. Genetic ablation in transgenic mice. *Molecular biology & medicine* 1989;6:523-30.
 132. Jacob HJ, Kwitek AE. Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nature reviews Genetics* 2002;3:33-42.
 133. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L363-9.
 134. Breitling S, Ravindran K, Goldenberg NM, Kuebler WM. The pathophysiology of pulmonary hypertension in left heart disease. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2015;309:L924-41.
 135. Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MA, Berger RM. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from

- preclinical animal models. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2013;305:L1-14.
136. Vitali SH, Hansmann G, Rose C, et al. The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up. *Pulmonary circulation* 2014;4:619-29.
137. Ciucan L, Bonneau O, Hussey M, et al. A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011;184:1171-82.
138. Newman JH, Phillips JA, 3rd, Loyd JE. Narrative review: the enigma of pulmonary arterial hypertension: new insights from genetic studies. *Annals of internal medicine* 2008;148:278-83.
139. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circulation research* 2006;99:675-91.
140. Hayes D, Jr., Tobias JD, Mansour HM, et al. Pulmonary hypertension in cystic fibrosis with advanced lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2014;190:898-905.
141. Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, Radzioch D. Cystic fibrosis mouse models. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2007;36:1-7.
142. Guimbellot JS, Fortenberry JA, Siegal GP, et al. Role of oxygen availability in CFTR expression and function. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2008;39:514-21.
143. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 1991;66:1027-36.
144. Fiorio Pla A, Ong HL, Cheng KT, et al. TRPV4 mediates tumor-derived endothelial cell migration via arachidonic acid-activated actin remodeling. *Oncogene* 2012;31:200-12.
145. Riemekasten G, Kuebler WM, Schermuly R, et al. [Pulmonary arterial hypertension--a disease of the immune system?]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 2014;139 Suppl 4:S116-20.

-
146. Hamanaka K, Jian MY, Townsley MI, et al. TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2010;299:L353-62.
 147. Bonnet S, Belus A, Hyvelin JM, Roux E, Marthan R, Savineau JP. Effect of chronic hypoxia on agonist-induced tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2001;281:L193-201.
 148. Morio Y, Carter EP, Oka M, McMurtry IF. EDHF-mediated vasodilation involves different mechanisms in normotensive and hypertensive rat lungs. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2003;284:H1762-70.
 149. Rhodes CJ, Davidson A, Gibbs JS, Wharton J, Wilkins MR. Therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology & therapeutics* 2009;121:69-88.
 150. Kawut SM, Bagiella E, Lederer DJ, et al. Randomized clinical trial of aspirin and simvastatin for pulmonary arterial hypertension: ASA-STAT. *Circulation* 2011;123:2985-93.
 151. Goldenberg NM, Wang L, Ranke H, Liedtke W, Tabuchi A, Kuebler WM. TRPV4, Is Required for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Anesthesiology* 2015.

8 Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Professor Doktor Kübler für seine stetige Hilfsbereitschaft, seine kritischen Hinweise, seine rasche Beantwortung meiner Fragen sowie Korrektur meiner Arbeit danken. Sein außerordentlich fachspezifischer Rat beeinflusste meine Arbeit an vielen Stellen wegweisend.

Mein herzlicher Dank geht ebenfalls an die Arbeitsgruppe von Herrn Professor Kübler. Die Einarbeitung in die spezifischen chirurgischen Messverfahren am Mausmodell schuf die Voraussetzung für die Datenerhebung dieser Dissertation. Die Drs. Arata Tabuchi, Jun Yin und Liming Wang standen mir in der Ausarbeitung der Methodik sowie dem Erlernen weiterer Arbeitstechniken stets unterstützend zur Seite. Die fachkundige Einführung der Arbeitsgruppe in die wissenschaftliche Datenerhebung sowie die stetigen Optimierungsvorschläge trugen zum Erfolg dieser Dissertation bei. Besonderer Dank gebührt Hanpo Yu für die fachkundige und kritische Unterstützung auf dem Themengebiet der CFTR Kanäle.

Von ganzem Herzen möchte ich meinem Bruder für die formale Durchsicht dieser Arbeit und Unterstützung sowie meinen Eltern für ihre aufmunternden Worte und die vielseitige Unterstützung danken. Sie machten es mir überhaupt möglich diese Arbeit während meines Studiums anzufertigen.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hannes Ranke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Beteiligung des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, des Transient Receptor Potential Vanilloid 4 und des Connexin 40 Transmembranproteins an der Entstehung der Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie am Mausmodell selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer Prof. Dr. Kübler angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Hannes Ranke hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Wang L, Yin J, Nickles HT, Ranke H, Tabuchi A, Hoffmann J, Tabeling C, Barbosa-Sicard E, Chanson M, Kwak BR, Shin HS, Wu S, Isakson BE, Witzernath M, de Wit C, Fleming I, Kuppe H, Kuebler WM. Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction. *Journal of Clinical Investigation*. 2012

Publikation 2:

Tabeling C, Yu H, Wang L, Ranke H, Goldenberg NM, Zabini D, Noe E, Krauszman A, Gutbier B, Yin J, Schaefer M, Arenz C, Hocke AC, Suttorp N, Proia RL, Witzernath M, Kuebler WM. CFTR and sphingolipids mediate hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015.

Publikation 3:

Goldenberg NM, Wang L, Ranke H, Liedtke W, Tabuchi A, Kuebler WM. TRPV4 is Required for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Anesthesiology*. 2015.

Beitrag im Einzelnen, jeweils 20% pro Publikation:

Jeweils Planung, Durchführung und Auswertung der chronisch hypoxischen/normoxischen Mausexperimente der *Cx40^{-/-}*, *Cftr^{tm1Unc}-Tg(FABPCFTR)^{-/-}*, *Trpv4^{-/-}* im Vergleich zu C57/Bl6 Wildtyp Versuchsgruppe. Graphische und statistische Auswertung der durchgeführten Experimente sowie Beteiligung an der Manuskripterstellung.

Unterschrift des Doktoranden

11 Publikationen

Publikation 1:

Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction.

Wang L, Yin J, Nickles HT, Ranke H, Tabuchi A, Hoffmann J, Tabeling C, Barbosa-Sicard E, Chanson M, Kwak BR, Shin HS, Wu S, Isakson BE, Witzenrath M, de Wit C, Fleming I, Kuppe H, Kuebler WM.

Veröffentlicht im Journal of Clinical Investigation am 24. Oktober 2012; 122:4218-30

Publikation 2:

CFTR and sphingolipids mediate hypoxic pulmonary vasoconstriction.

Tabeling C, Yu H, Wang L, Ranke H, Goldenberg NM, Zabini D, Noe E, Krauszman A, Gutbier B, Yin J, Schaefer M, Arenz C, Hocke AC, Suttorp N, Proia RL, Witzenrath M, Kuebler WM.

Veröffentlich im Journal Proceedings of the National Academy of Sciences am 31. März 2015; 112(13):E1614-23

Publikation 3:

TRPV4 is Required for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction.

Goldenberg NM, Wang L, Ranke H, Liedtke W, Tabuchi A, Kuebler WM.

Veröffentlich im Journal Anesthesiology im Juni 2015; 122(6):1338-48