

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Die Rolle von glattmuskulärem HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  bei der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertension

Frederick David Florentin Vogel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizinischen Wissenschaft genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Joner

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Agnes Görlach
2. Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Die Dissertation wurde am 10.07.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.10.2019 angenommen.



Aus der Experimentellen und Molekularen Kinderkardiologie  
am Deutschen Herzzentrum München  
Direktion: Prof. Dr. med. Agnes Görlach

**Die Rolle von glattmuskulärem HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  bei der  
Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertension**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät  
der Technischen Universität München

vorgelegt von

Frederick David Florentin Vogel  
aus Tübingen

10/2019

Wissenschaftlicher

Vorstand: Prof. Dr. Michael Joner

1. Gutachter: Prof. Dr. Agnes Görlach

2. Gutachter: Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Tag der Promotion: 25. November 2019

Meiner Familie gewidmet



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1 PULMONALE HYPERTENSION</b>	<b>7</b>
1.1.1 DEFINITION UND KLASSIFIKATION DER PULMONALEN HYPERTENSION	7
1.1.2 DAS PULMONALVASKULÄRE REMODELING	8
1.1.3 RECHTSVENTRIKULÄRE HYPERTROPHIE ALS FOLGE DER PULMONALEN HYPERTENSION	11
1.1.4 HYPOXIE IN DER PATHOBIOLOGIE DER PULMONALEN HYPERTENSION	12
1.1.5 DAS TIERMODELL DER HYPOXIE-INDUZIERTEN PULMONALEN HYPERTENSION	15
<b>1.2 MOLEKULARE MECHANISMEN DER PULMONALARTERIELLEN GLATTEN MUSKELZELLEN BEIM HYPOXIE-INDUZIERTEN PULMONALVASKULÄREN REMODELING</b>	<b>18</b>
1.2.1 PROLIFERATION UND APOPTOSERESISTENZ DER PULMONALARTERIELLEN GLATTEN MUSKELZELLEN	18
1.2.2 TRANSITIONS- UND MIGRATIONSPROZESSE	23
<b>1.3 HYPOXIE-INDUZIERBARE FAKTOREN</b>	<b>25</b>
1.3.1 FUNKTION, REGULATION UND SIGNALWEGE	25
1.3.2 DIE BEDEUTUNG VON HIF BEI DER HYPOXIE-INDUZIERTEN PULMONALEN HYPERTENSION	29
1.3.3 GLATTMUSKULÄRES HIF BEIM HYPOXIE-INDUZIERTEN PULMONALVASKULÄREN REMODELING	33
<b>1.4 GEWEBESPEZIFISCHE KNOCKOUT-MAUSLINIEN</b>	<b>35</b>
<b>2. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>38</b>
<b>3.1 MATERIAL</b>	<b>38</b>
3.1.1 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	38
3.1.2 SOFTWARE	40
3.1.3 CHEMIKALIEN	40
3.1.4 OLIGONUKLEOTIDE/PCR PRIMER	41
3.1.5 ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE	41
3.1.6 KIT SYSTEME	42
3.1.7 LÖSUNGEN	42

<b>3.2 VERSUCHSTIERE</b>	<b>43</b>
3.2.1 DAS CRE/LOXP-SYSTEM	43
3.2.2 GLATTMUSKELZELLSPEZIFISCHE HIF-KNOCKOUT-MÄUSE	44
<b>3.3 METHODEN</b>	<b>46</b>
3.3.1 DNA-ISOLATION AUS MAUSGEWEBE UND MESSUNG DER DNA-KONZENTRATION	46
3.3.2 POLYMERASE-KETTENREAKTION	47
3.3.3 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	48
3.3.4 HYPOXIEEXPERIMENT	49
3.3.5 HÄMODYNAMISCHE MESSUNG	49
3.3.6 ORGANENTNAHME UND VERARBEITUNG DER GEWEBEPROBEN	51
3.3.7 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG	52
3.3.8 ELASTIKA-VAN-GIESON-FÄRBUNG	53
3.3.9 PIKRO-SIRIUSROT FÄRBUNG	54
3.3.10 IMMUNHISTOCHEMIE	54
3.3.11 WHEAT GERM AGGLUTININ - FÄRBUNG	56
3.3.12 STATISTISCHE AUSWERTUNG	57
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>58</b>
<b>4.1 GENOTYPISIERUNG UND PHÄNOTYPISCHE MERKMALE</b>	<b>58</b>
<b>4.2 ADAPTATION AN CHRONISCHE HYPOXIE</b>	<b>59</b>
4.2.1 GEWICHTSVERLAUF UND VERHALTEN	59
4.2.2 VERÄNDERUNGEN IM BLUTBILD	61
<b>4.3 EVALUATION DER CHRONISCH-HYPOXISCHEN PULMONALEN HYPERTENSION</b>	<b>64</b>
4.3.1 PULMONALVASKULÄRES REMODELING	64
4.3.2 HÄMODYNAMISCHE MESSUNGEN	69
<b>4.4 EVALUATION DER RECHTSVENTRIKULÄREN HYPERTROPHIE</b>	<b>72</b>
4.4.1 HERZMASSE UND RECHTSVENTRIKULÄRE SCHICHTDICKE	72
4.4.2 HYPERTROPHIE RECHTSVENTRIKULÄRER KARDIOMYOZYTEN	74
4.4.3 ABHÄNGIGKEIT ZWISCHEN RECHTSVENTRIKULÄREM DRUCK UND RECHTSVENTRIKULÄRER HYPERTROPHIE	76
4.4.4 RECHTSVENTRIKULÄRE FUNKTION	78
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>80</b>
<b>5.1 PHÄNOTYP DER GLATTMUSKELZELLSPEZIFISCHEN HIF1A-KNOCKOUT-MAUSLINIEN UNTER CHRONISCHER HYPOXIE</b>	<b>80</b>
5.1.1 GLATTMUSKELZELLSPEZIFISCHE HIF1A-KNOCKOUT-MÄUSE VERLIEREN UNTER HYPOXIE NICHT SO VIEL GEWICHT WIE WILDTYP-MÄUSE	80

5.1.2 BLUTBILD ALLER MAUSLINIEN ZEIGT DIE BEI CHRONISCHER HYPOXIE TYPISCHEN VERÄNDERUNGEN	81
5.1.3 GLATTMUSKELZELLSPEZIFISCHE HIF1A-KNOCKOUT-MÄUSE ZEIGEN REDUZIERTES HYPOXIE-INDUZIERTES PULMONALVASKULÄRES REMODELING	82
5.1.4 GLATTMUSKELZELLSPEZIFISCHE HIF1A-KNOCKOUT-MÄUSE SIND VOR EINER CHRONISCH-HYPOXISCHEN PULMONALEN HYPERTENSION GESCHÜTZT	84
<b>5.2 BEITRAG VON HIF ZUR AKUTEN UND CHRONISCHEN ANTWORT AUF HYPOXIE</b>	<b>85</b>
5.2.1 HIF1A UND HIF2A ALS SCHLÜSSELFAKTOREN BEIM CHRONISCHEN REMODELING VON PULMONALARTERIELLEN GLATTEN MUSKELZELLEN	85
5.2.2 HIF1A UND HIF2A BEEINFLUSSEN MÖGLICHERWEISE AUCH DIE HYPOXISCHE PULMONALE VASOKONSTRIKTION	88
<b>5.3 PATHOGENESE DER HYPOXIE-ASSOZIIERTEN RECHTSVENTRIKULÄREN HYPERTROPHIE</b>	<b>90</b>
5.3.1 SOWOHL WILD-TYP- ALS AUCH GLATTMUSKELZELLSPEZIFISCHE HIF1A-KNOCKOUT-MÄUSE ENTWICKELN EINE RECHTSVENTRIKULÄRE HYPERTROPHIE NACH HYPOXIE	90
5.3.2 RECHTSVENTRIKULÄRE HYPERTROPHIE IST NICHT NUR AUF PULMONALARTERIELLEN DRUCK ZURÜCKZUFÜHREN	91
5.3.3 RECHTSVENTRIKULÄRE FUNKTION IST DURCH HYPOXIE NICHT EINGESCHRÄNKT	97
<b>5.4 LIMITATIONEN UND MÖGLICHE FEHLERQUELLEN</b>	<b>98</b>
5.4.1 GEWEBESPEZIFISCHE KNOCKOUT-MAUSLINIEN	98
5.4.2 VERSUCHSAUFBAU UND -BEDINGUNGEN	99
<b>5.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK</b>	<b>101</b>
5.5.1 VERGLEICHBARKEIT DES MAUSMODELLS DER CHRONISCH-HYPOXISCHEN PULMONALEN HYPERTENSION MIT DER PULMONALEN HYPERTENSION IM MENSCHEN	101
5.5.2 KLINISCHE RELEVANZ	102
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>104</b>
<b>6.1 ABSTRACT</b>	<b>105</b>
<b>7. ERGÄNZENDE DATEN</b>	<b>106</b>
<b>7.1 VERGLEICH DER CRE-NEGATIVEN KONTROLLMAUSLINIEN</b>	<b>106</b>
<b>7.2 TABELLE 2: HÄMODYNAMISCHE MESSUNGEN</b>	<b>108</b>
<b>7.3 TABELLE 3: KÖRPERGEWICHT UND HERZMASSE</b>	<b>109</b>
<b>7.4 ECHOKARDIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG DER LINKSVENTRIKULÄREN FUNKTION</b>	<b>110</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>112</b>

<b>9. ANHANG</b>	<b>129</b>
<b>9.1 ABKÜRZUNGEN</b>	<b>129</b>
<b>9.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>130</b>
<b>9.3 PUBLIKATIONEN UND POSTER</b>	<b>132</b>
<b>9.4 DANKSAGUNG</b>	<b>133</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Pulmonale Hypertension

### 1.1.1 Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertension

Die pulmonale Hypertension (PH) ist definiert als eine systolische pulmonalarterielle Drucksteigerung über 30 mmHg oder als ein Anstieg des mittleren pulmonalarteriellen Druckes über 25 mmHg in Ruhe bzw. über 30 mmHg bei körperlicher Aktivität. Die PH ist ein komplexes Syndrom, das primär oder sekundär als Folge kardiopulmonaler und systemischer Funktionsstörungen auftreten kann [1, 2]. Die klinische sowie pathobiologische Erforschung der PH hat in den letzten 100 Jahren große Fortschritte gemacht. Durch die Entwicklung neuer Therapien konnte die Morbidität und Mortalität der Patienten mit PH entscheidend verbessert werden [1]. Während man früher die PH in eine primäre und sekundäre Form, je nach Vorhandensein einer identifizierbaren Ursache, eingeteilt hat, unterscheidet man heute fünf Gruppen von Funktionsstörungen, die eine PH zur Folge haben: Pulmonale arterielle Hypertension (Gruppe 1), PH aufgrund einer Linksherzerkrankung (Gruppe 2), PH aufgrund einer chronischen Lungenerkrankung und/oder Hypoxie (Gruppe 3), chronische thrombembolische PH (Gruppe 4), PH aufgrund eines unklaren multifaktoriellen Geschehens (Gruppe 5). Ätiologisch beinhalten die fünf Gruppen dabei unterschiedliche Pathologien, die idiopathisch, hereditär, medikamentös-toxisch, infektiös, maligne oder in Assoziation mit kardiopulmonalen Fehlbildungen und Funktionseinschränkungen auftreten können. Gruppe 3 beinhaltet neben der andauernden Exposition in großen Höhen auch eine Reihe von Erkrankungen des respiratorischen Systems, die mit chronischer Hypoxie einhergehen. Dazu gehört beispielsweise die chronisch obstruktive Lungenerkrankung, das Asthma bronchiale und das Schlafapnoe-Syndrom [2, 3]. Die derzeit verfügbaren Therapieoptionen der PH zielen in erster Linie auf eine Dilatation der pulmonalen Gefäße durch Sauerstoffgabe und Vasodilatoren. Sie verbessern bisher jedoch nicht die mit der PH einhergehenden strukturellen Veränderungen der Lunge und haben

daher einen bescheidenen, nicht zufriedenstellenden klinischen Effekt. Die PH bleibt eine fortschreitende, verhängnisvolle Erkrankung, die mit einer hohen Mortalität assoziiert ist. Je früher die Diagnose gestellt werden kann und je besser die rechtsventrikuläre Funktion zu diesem Zeitpunkt noch ist, desto besser ist die Prognose der Patienten [4]. Bei Frauen tritt die pulmonale arterielle Hypertension (PAH) etwas häufiger auf, was die Vermutung mit sich brachte, dass hormonelle Einflüsse bei der Pathogenese eine Rolle spielen. Männer zeigen im Vergleich zu Frauen eine höhere Mortalität der PAH bei gleicher Behandlung. Die Gründe hierfür sind nicht geklärt [5]. Die entscheidenden zellulären und molekularen Prozesse der irreversiblen, pulmonalvaskulären Veränderungen sind noch nicht ausreichend verstanden, sodass wir aktuell keine therapeutischen Strategien haben, um diese zu verhindern. Da die PAH bei nahezu der Hälfte der Patienten binnen drei Jahren nach Diagnosestellung letal verläuft, sind neue pharmakologische Optionen zur Behandlung dringend erforderlich [4].

### **1.1.2 Das pulmonalvaskuläre Remodeling**

Die genauen Ursachen und Pathomechanismen der PH sind bis heute unklar und Gegenstand aktueller Forschung. Vermutlich existieren Unterschiede je nach zugrundeliegender Ätiologie der PH. Zwei typische Kennzeichen der PH sind jedoch immer vorhanden: eine anhaltende Vasokonstriktion der Lungengefäße und das pulmonalvaskuläre Remodeling (PVR) [6]. Das PVR ist charakterisiert durch Wandveränderungen der Pulmonalarterien sowie eine Rarefizierung der kleinen peripheren pulmonalarteriellen Gefäße [7]. Die Wandveränderungen beinhalten neben einer Verdickung von Intima, Media und Adventitia muskularisierter Gefäße das Auftreten von glatten Muskelzellen in ursprünglich nicht muskularisierten Arteriolen. An diesen Prozessen ist die Proliferation und Migration von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PAGMZ) entscheidend beteiligt. Möglicherweise spielt eine zelluläre Transdifferenzierung, die sogenannte endothelial-mesenchymale Transition, ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung der distalen Muskularisierung [8, 9]. In frühen Stadien beginnt die PH mit histologisch unspezifischen

pulmonalarteriellen Veränderungen wie Mediahypertrophie, Verdickung der Adventitia und Muskularisierung von normalerweise nicht muskularisierten Gefäßen. Diese Muskularisierung zeigt sich durch ein vermehrtes Auftreten von Zellen, die glattmuskuläres Aktin ( $\alpha$ -smooth-muscle-actin) exprimieren. Das  $\alpha$ -smooth-muscle-actin gilt als typischer Marker glatter Muskelzellen. Das späte, progrediente Stadium beinhaltet die Entstehung von komplexen zellulären, fibrotisch-neointimalen und plexiformen Läsionen. Letztere sind pathognomonisch für die PAH und werden vor allem in pulmonalarteriellen Gefäßen mit einem Durchmesser unter 300  $\mu\text{m}$  beobachtet. Plexiforme Läsionen bestehen aus einem Plexus schlitzartiger Kanäle von flachen Endothelzellen mit darunterliegenden Myofibroblasten. Die betroffenen Pulmonalarterien sind dabei stark dilatiert und innerhalb der Läsionen finden sich typischerweise Thrombusfragmente [9-11]. Die Intima zeigt bei vielen Formen der PH proliferative sowie fibrotische Veränderungen. Über entzündliche Zellinfiltrate bestehend aus Monozyten/Makrophagen, T-/B-Lymphozyten und dendritischen Zellen wurde in den Läsionen von Patienten mit PH ebenfalls berichtet [12, 13]. Auch endotheliale und mesenchymale Vorläuferzellen konnten in plexiformen Läsionen detektiert werden und tragen neben Immunzellen wahrscheinlich zur deren Entstehung bei. Dies lässt vermuten, dass eine Reihe von unterschiedlichen Zelltypen und Mechanismen an den typischen PH-assoziierten, histologischen Veränderungen beteiligt sind [14, 15]. Die beschriebenen Vorgänge führen schließlich zu einer Obstruktion und Obliteration der mittleren und kleinen Gefäße, was einen eingeschränkten pulmonalen Blutfluss zur Folge hat [12, 16-18]. Bei schweren Formen der PAH findet sich außerdem eine Rarefizierung von kleinen, peripheren Pulmonalarterien. Die Koexistenz von verstärkter Muskularisierung und Schwund kleiner Pulmonalarterien in der gleichen Lunge ist mechanistisch noch nicht verstanden. Ein mögliches Erklärungsmodell für die Rarefizierung kleiner Pulmonalgefäße ist die massive Obliteration des Lumens aufgrund verdickter Endothelzellen [19-21]. Strukturelle Veränderungen, lokale Thrombosen sowie eine anhaltende Vasokonstriktion führen schließlich zu einem erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand mit Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes [22, 23]. Histologische Studien an Kindern und Erwachsenen mit PAH deuten darauf hin, dass die PAH eine frühe reversible sowie eine späte irreversible,

progrediente Phase aufweist [18, 24, 25]. Diagnose und Stadium der PAH sollten jedoch nicht ausschließlich anhand histologischer Veränderungen festgelegt werden. Während manche Wissenschaftler behaupten, alle Patienten mit lang bestehender PAH weisen plexiforme Läsionen im pulmonalvaskulären Gefäßsystem auf, gibt es auch Hinweise darauf, dass dies nicht immer der Fall sein muss. Das klinische und histologische Bild der PH kann interindividuell, je nach Stadium und zugrundeliegender Ätiologie, sehr unterschiedlich sein [26, 27]. Ursächlich für eine geringe Ansprechbarkeit auf Vasodilatoren, welche die meisten erwachsenen Patienten mit PH aufweisen, ist die zelluläre und fibrotische Obliteration der pulmonalen Gefäßlumina. Diese strukturellen Gefäßveränderungen werden ebenfalls als Grund für die Irreversibilität der PH nach korrigierenden Herzoperationen bei Patienten mit angeborenem Herzfehler angenommen [11, 28-30]. Pulmonalvaskuläre Läsionen können sehr heterogen sein und sind lange nicht verstanden. Zur Entwicklung einer PH ist eine Reduktion der pulmonalvaskulären, luminalen Fläche von insgesamt ca. 80% notwendig. Es bleibt nach wie vor unklar, welche Art von Läsionen am meisten zu dieser Reduktion beitragen [31]. Der größte Einfluss auf den pulmonalvaskulären Widerstand resultiert vermutlich aus Veränderungen der kleinen Arteriolen. Eine verminderte Compliance proximaler Pulmonalarterien führt ebenfalls zu einem erhöhten Widerstand mit erhöhter rechtsventrikulärer Nachlast [6, 32, 33]. Das Remodeling proximaler und distaler Gefäßabschnitte beeinflusst sich dabei gegenseitig. So führt die verminderte Compliance von proximalen Pulmonalarterien durch deren Versteifung zu einer Zunahme der pulsatilen Wellen, die das vaskuläre Remodeling der distalen Gefäße aufrechterhalten und begünstigen. Umgekehrt kann ein erhöhter peripherer Widerstand, verursacht durch das PVR der distalen Gefäße, eine Versteifung der großen proximalen Gefäße fördern [34, 35]. Sowohl Endothelzellen der Intima als auch glatte Muskelzellen der Media spielen beim PVR eine wichtige Rolle. Es konnten bereits eine Reihe von Mechanismen im Endothel identifiziert werden, die zur intimalen Verengung mit Gefäßverschlüssen führen können [36]. In der Media führt die verstärkte Muskularisierung zu einer Gefäßverengung und Hyperreagibilität auf gefäßverengende Botenstoffe. Die inkomplette Relaxationsfähigkeit der Media trägt außerdem zu einem erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand bei [6, 7]. Unterschiedliche zelluläre und



molekulare Mechanismen des PVR konvergieren schließlich zum Phänotyp der typisch-pathologischen Veränderungen bei der PH. Zentral ist dabei das hypertrophe Remodeling der distalen Pulmonalarterien, das einen erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand mit pulmonalarteriellen Druckanstieg zur Folge hat [36].

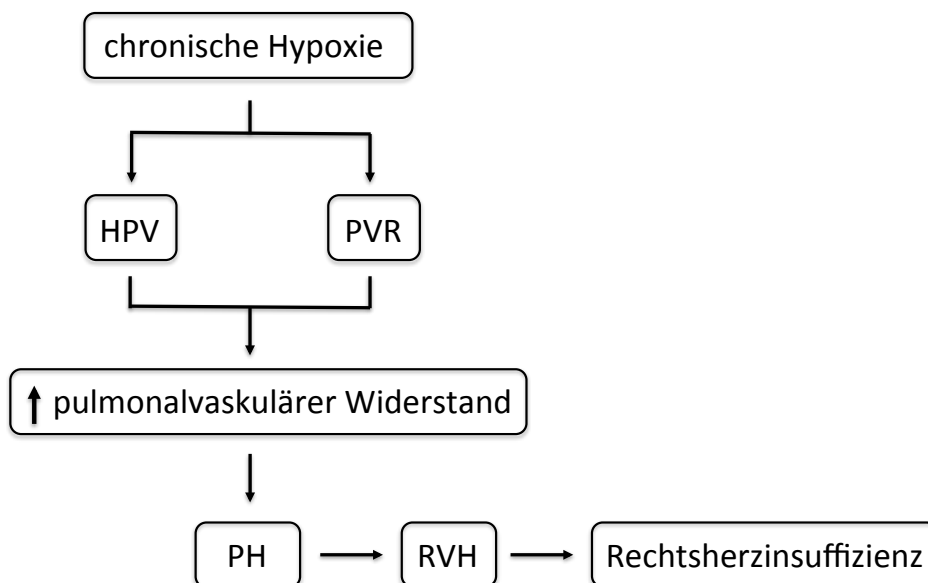
### **1.1.3 Rechtsventrikuläre Hypertrophie als Folge der pulmonalen Hypertension**

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts lieferten uns Beobachtungen an Rindern im Hochgebirge von Colorado erste Einblicke in die kardialen Folgen der PH. Die Tiere litten vermehrt unter Lungenödemen und dilatativen Kardiomyopathien mit insuffizienten Herzen. Die Höhenlage wurde dabei als primäre Ursache der Herzinsuffizienz identifiziert [37]. Eine anhaltende PH führt zu einer dauerhaft erhöhten rechtsventrikulären Nachlast. Diese ist abhängig vom pulmonalvaskulären Widerstand, der von Tonus und Struktur kleiner, distaler Gefäße sowie von der Compliance großer, proximaler Gefäße beeinflusst wird [9]. Eine Versteifung der proximalen Pulmonalarterien führt dabei hämodynamisch zu einer schädlichen Belastung des Herzens mit verminderter Koronarperfusion, eingeschränkter ventrikulärer Funktion und Progression der Rechtsherzinsuffizienz [34, 35]. Die Zunahme des pulmonalvaskulären Widerstands führt zu steigenden pulmonalarteriellen Drücken mit Erhöhung der rechtsventrikulären Wandspannung. Anhaltend erhöhte Drücke im pulmonalvaskulären System führen zu einer rechtsventrikulären Hypertrophie (RVH). Der weitere Progress des kardialen Remodelings ist schließlich charakterisiert durch Dilatation, Fibrose und Insuffizienz des rechten Ventrikels. Obwohl die rechtsventrikuläre Insuffizienz bei Patienten mit PH die häufigste Todesursache darstellt, sind die Mechanismen der Progression von Hypertrophie zu Insuffizienz bislang wenig verstanden [38].

#### **1.1.4 Hypoxie in der Pathobiologie der pulmonalen Hypertension**

Eine generalisierte Hypoxie, wie sie beispielsweise in großer Höhe auftritt, führt zu systemischen sowie Organ-spezifischen Veränderungen. Neben peripherer Vasodilatation, pulmonaler Vasokonstriktion und Sympathikusaktivierung zur Steigerung der Herzleistung, führt Hypoxie zu Veränderungen der Immunantwort und über Erythropoietin und eine Aktivierung des Knochenmarks zu einer gesteigerten Erythropoese [39]. Diese physiologischen Reaktionen auf eine verminderte Gewebeoxygenierung sind wichtige Mechanismen zur Anpassung an chronisch-hypoxische Zustände, um den Sauerstofftransport an minderversorgte Gewebe zu gewährleisten [20]. In der Lunge führt die verminderte Gewebeoxygenierung zur hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV), einem physiologischen Effekt, der erstmals 1946 von Euler und Liljestrand beschrieben wurde [40]. Die HPV ist eine Antwort auf alveoläre Hypoxie und stimmt Ventilation und Perfusion aufeinander ab, indem der kapilläre Blutfluss in Lungenareale mit einer höheren Sauerstoffkonzentrationen verteilt wird [41, 42]. Die Abnahme der alveolären O<sub>2</sub>-Konzentrationen führt zu einer unmittelbaren und reversiblen Vasokonstriktion pulmonaler Gefäße. Diese ist in ihrer Intensität abhängig von O<sub>2</sub>-Konzentrationen, Geschlecht und Spezies. Die genauen Mechanismen, die der O<sub>2</sub>-Detektion im pulmonalen Gefäßsystem zugrunde liegen, sind noch nicht komplett verstanden. Es wird jedoch angenommen, dass die HPV durch ein Zusammenspiel von Endothel und glattmuskulären Zellen der Media koordiniert wird. Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (PAGMZ) stellen bei der HPV sowohl Sensor- als auch Effektorzelle dar. Der akute Effekt von Hypoxie auf PAGMZ beinhaltet eine Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, eine Öffnung und Aktivierung von Calcium-Kanälen sowie eine Membrandepolarisation. Auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird diskutiert. [43] Das Endothel verstärkt dabei über eine gesteigerte Produktion vasokonstriktorischer Faktoren und/oder eine verminderte Produktion vasodilatatorisch wirkender Faktoren die Antwort der PAGMZ auf Hypoxie [42, 43]. Diese Reaktion auf Hypoxie mit Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands ist einzigartig im Lungenkreislauf. In allen anderen Organen führt Hypoxie zu einer Verminderung des vaskulären

Widerstands [44]. Die HPV spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von chronischen Lungenerkrankungen, wie der interstitiellen Lungenfibrose, dem akuten Lungenversagen oder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung [45-47]. In den meisten Säugetieren induziert Hypoxie eine PH, welche je nach Spezies unterschiedlich stark ausgeprägt ist [9]. Die Erkenntnisse aus diesen Modellen haben zu der seit langem anerkannten Theorie geführt, dass sich die chronisch hypoxische pulmonale Hypertension (CHPH) aufgrund anhaltender HPV sowie mittel- und langfristig entstehendem PVR manifestiert (Abb. 1). Der anhaltenden HPV folgt ein Remodeling der extrazellulären Matrix, welches die verengten Arterien fixiert. Sie verlieren so ihre Fähigkeit, sich bei Normoxie oder Gabe von Vasodilatoren wieder zu erweitern. In den Anfangsstadien der CHPH spielt die HPV eine wichtige Rolle, während in späteren Stadien vor allem das PVR entscheidend ist, welches zu irreversiblen Gefäßveränderungen mit dauerhaft erhöhtem pulmonalvaskulärem Widerstand führt [7, 48].



**Abb. 1: Pathobiologie der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertension.**

Chronische Hypoxie führt sowohl zur hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) als auch zum pulmonalvaskulären Remodeling (PVR), was zu einem erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand führt. Dieser hat wiederum eine pulmonale Hypertension (PH) und schließlich eine rechtsventrikuläre Hypertrophie (RVH) mit Progression zur Rechtsherzinsuffizienz zur Folge.

Die Erkenntnisse über das PVR bei Menschen mit PH stammen aufgrund der schwierigen Visualisierung und Messung von Gefäßwandveränderungen vor allem aus histologischen Untersuchungen mit postoperativ oder post mortem gewonnenem Lungengewebe [6]. Histologische Analysen des Gefäßsystems der Lunge bei südamerikanischen Kindern, die in großer Höhe aufgewachsen waren, zeigten im Vergleich zu Kindern auf Meereshöhe eine verstärkte Muskularisierung von kleinen Pulmonalarterien [49]. In Studien mit Einheimischen der peruanischen Anden zeigten sich ebenfalls Hinweise auf eine PH und deren Folgen [50, 51]. Diese Annahmen wurden durch Studien an Verstorbenen aus Bergregionen in Südamerika erhärtet. Histologische Untersuchungen wiesen eine signifikant häufigere Mediahypertrophie und Muskularisierung der kleinen, distalen Pulmonalarterien auf. Interindividuell bestanden jedoch deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Veränderungen nach Exposition mit chronischer Hypoxie [52, 53]. Interessanterweise zeigte sich bei Einheimischen aus dem Himalayagebirge in zwei Studien keine Mediahypertrophie in Pulmonalarterien, keine Muskularisation in kleinen Arteriolen und ein normaler pulmonalarterieller Druck [54, 55]. Dies legt die Vermutung nahe, dass genetische Faktoren bei der pulmonalvaskulären Anpassung an chronische Hypoxie eine wesentliche Rolle spielen. Eine weitere Komponente, die zur Pathogenese der CHPH beiträgt, sind Entzündungsprozesse bei chronischer Hypoxie. Die Aktivierung des Immunsystems ist sowohl beim Menschen, als auch im Tiermodell, eine frühe Konsequenz von Hypoxie [20, 56]. Es kommt zur Mobilisierung und Akkumulation von Mastzellen, Rekrutierung von zirkulierenden Vorläuferzellen und Monozyten, sowie zu vermehrten Infiltraten von Entzündungszellen. Durch die parakrine Sekretion vasoaktiver, mitogener und chemotaktischer Faktoren tragen diese Zellen zum PVR und zur gesteigerten Kollagenproduktion bei Exposition mit chronischer Hypoxie bei [56-58]. In der Pathophysiologie der CHPH sind Hypoxie und systemische Entzündungsreaktion eng miteinander verflochten [20]. Erhöhte Konzentrationen des plättchenaktivierenden Faktors (PAF), einem inflammatorischen Lipidmediator, der die Thrombozytenaggregation aktiviert und am Hypoxie-induzierten PVR beteiligt ist, wurden beschrieben. Die Applikation von PAF-Antagonisten reduziert die Entwicklung einer CHPH im Tiermodell [20, 59].

### 1.1.5 Das Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertension

Die Entdeckung der HPV führte zu einer Reihe von systematischen Studien über den Lungenkreislauf und die CHPH bei Mensch und Tier, auf Meeresebene und in großer Höhe. Diese Studien beschreiben bereits Spezies-spezifische Unterschiede in der Entwicklung von PH als Reaktion auf Hypoxie [60]. Während Schafe nach Exposition mit chronischer Hypoxie keine oder nur eine geringe PH entwickeln, findet man bei Rindern und Ratten eine PH mit signifikanten pulmonalvaskulären Veränderungen sowie einer Rechtsherzhypertrophie [61, 62]. Die Entwicklung von genetisch modifizierten Mäusen führte zu dem Bedarf, ein Mausmodell der PH zu etablieren [63]. Das Modell der Hypoxie-induzierten PH bei Mäusen und Ratten ist heute ein weit verbreitetes und akzeptiertes Modell zur Erforschung der PH. Das Modell mit Exposition in einer hypoxischen Umgebung ist zudem berechenbar und reproduzierbar [9]. Der relative Beitrag von HPV und PVR zum Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstands ist beim Tiermodell der CHPH speziesabhängig. Während bei chronisch-hypoxischen Ratten die Erhöhung des Widerstands vor allem auf eine stark ausgeprägte HPV zurückzuführen ist, hat bei Mäusen in hypoxischer Umgebung vor allem die chronische, luminale Verengung der Gefäße Bedeutung für den erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand. Eine Rarefizierung von Pulmonalgefäßen als Ursache für den Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstands wurde in Mäusen oder Ratten nicht festgestellt [44, 64]. Die Antwort auf Hypoxie ist außerdem abhängig vom Alter der Tiere. So weisen junge Tiere mit heranreifenden Lungen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie auf [65]. Die auftretenden strukturellen Veränderungen zeigen ein ausgeprägtes pulmonalvaskuläres Remodeling, das durch Kollagenablagerungen sowie Verbreiterung der Adventitia und Media von präkapillären Pulmonalarterien geprägt ist und zur Einengung der kleinen Pulmonalarterien führt. Im Tiermodell der CHPH von Nagetieren zeigt sich zwar eine luminale Verengung, jedoch keine komplette Obliteration oder Rarefizierung der Pulmonalarterien, wie es bei Patienten mit PH beschrieben ist [44, 66]. Das PVR im Tiermodell der CHPH beinhaltet sowohl eine Hypertrophie, als auch Hyperplasie der Media [67]. Es zeigt sich eine schnelle Muskularisierung und das Auftreten von  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-exprimierenden

Zellen in normalerweise nicht muskularisierten Alveolarwänden und Arteriolen, eine Fibrosierung und Versteifung von großen proximalen Pulmonalarterien sowie eine Entzündungsreaktion der pulmonalen Gefäße. Hämodynamisch manifestiert sich bei Ratten bereits nach zwei Wochen Hypoxie eine Verdopplung des mittleren pulmonalarteriellen Druckes und eine rechtsventrikuläre Hypertrophie mit erhöhter rechtsventrikulärer Masse [56, 68]. Mäuse entwickeln bei Exposition mit chronischer Hypoxie ebenfalls erhöhte pulmonalarterielle Drücke, allerdings sind hämodynamische Veränderungen weniger ausgeprägt als in Ratten. Die beständigsten Ergebnisse im Mausmodell sind die Muskularisierung und Verdickung von kleinen, distalen Lungengefäßen sowie die funktionelle Versteifung von proximalen Pulmonalarterien [9]. Der rechtsventrikuläre systolische Druck ist in normoxischen Wildtyp-Mäusen im Mittel bei 10-20 mmHg, während er nach chronischer Hypoxie auf bis zu 35 mmHg ansteigt [69, 70]. Ein weiterer Unterschied zwischen Mäusen und Ratten nach Exposition in anhaltender Hypoxie besteht in einem unterschiedlichen Genexpressionsmuster des Lungengewebes [61, 71]. Neben artspezifischen Unterschieden zeigen Studien, dass die Reaktion auf chronische Hypoxie auch Mäusestamm-spezifisch sein kann und dass verschiedene Mäusestämme teils signifikante Unterschiede im Tiermodell der CHPH aufweisen [72]. Trotz entzündlicher, fibrotischer und struktureller Gefäßveränderungen, sind alle Tiermodelle der Hypoxie-induzierten PH im Gegensatz zur PH im Menschen bei Rückkehr zu normoxischen Konditionen reversibel. Es gibt zudem keine Hinweise darauf, dass es im Tiermodell der CHPH zu einer Intimafibrose oder plexiformen Läsionen mit kompletten Gefäßverschlüssen kommt, wie sie typischerweise bei der PAH im Menschen auftreten [6, 8, 73]. Das Modell der CHPH in Nagetieren kann folglich als ein Modell der weniger schweren PH angesehen werden und sollte vor allem als relevant in Bezug auf die PH des Menschen als Folge von chronischer Hypoxie betrachtet werden. Neben dem Tiermodell der CHPH existieren noch weitere Tiermodelle der PH, die je nach Modell unterschiedliche Ausprägungen der PH-charakteristischen Veränderungen zeigen. Ein etabliertes und schon lange bekanntes Modell ist das der Monocrotalin-induzierten PH. Durch Induktion einer Entzündungsreaktion mit Endothelzellerletzungen entwickeln die Tiere eine PH mit PVR und erhöhtem

pulmonalvaskulärem Widerstand [74]. Darüber hinaus existieren eine Reihe von genetisch modifizierten Mäusen, die spontan oder nach chronischer Hypoxie eine verstärkte PH aufweisen [63]. Um die pathologischen Veränderungen der schweren PH beim Menschen mit kompletten Gefäßverschlüssen und rechtsventrikulärer Insuffizienz möglichst genau abzubilden, werden kombinierte Modelle angewandt. So führt beispielsweise die Kombination des VEGF-Rezeptor-Inhibitors Sugen 5416 mit chronischer Hypoxie zu einer irreversiblen PH und einem ausgeprägten PVR mit Apoptose der Endothelzellen und Obliteration kleiner Lungengefäße. Dabei zeigt sich außerdem eine rechtsventrikuläre Dysfunktion mit beginnendem Rechtsherzversagen [70, 75]. Auch ein Knockout des bone morphogenic protein receptor 2 (BMPR-2) oder eine Überexpression des proinflammatorischen Interleukin 6 (IL-6) führt zusammen mit chronischer Hypoxie zur kompletten Obliteration pulmonaler Gefäße und zu einem irreversiblen PVR [20, 76, 77]. Es gibt aktuell jedoch vermutlich kein Tiermodell der PH, das die schwere PH, wie sie im Menschen auftritt, mit all ihren pathologischen Veränderungen perfekt abbildet. Dennoch erlauben uns die vorhandenen Tiermodelle der PH wertvolle Einblicke und ein besseres Verständnis der Pathomechanismen und Signalwege, die zur Entwicklung und Progression der PH beitragen. Sie ermöglichen uns, neue Hypothesen zur Pathogenese zu testen und dringend benötigte, neu entwickelte Substanzen zu evaluieren, um schließlich Patienten mit PH besser behandeln und irreversible Veränderungen verhindern zu können [6, 9].

## **1.2 Molekulare Mechanismen der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen beim Hypoxie-induzierten pulmonalvaskulären Remodeling**

### **1.2.1 Proliferation und Apoptoseresistenz der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen**

Das vaskuläre Remodeling der Media resultiert zum großen Teil aus einem Ungleichgewicht von Proliferation und Apoptose der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PAGMZ). DNA-Mikroarray-Analysen zeigen, dass bei Patienten mit PH das Gleichgewicht von proapoptotischen und antiapoptotischen Genen zugunsten der antiapoptotischen Gene verschoben ist [78]. Die Resistenz gegenüber Apoptose ist dabei unter anderem durch die Herunterregulierung von Kaliumkanälen gesteigert, welche sowohl im Tiermodell der PH, als auch in Patienten mit PH beobachtet werden kann. Eine reduzierte Expression und Aktivität der Kaliumkanäle in PAGMZ hat eine erhöhte intrazelluläre Kaliumkonzentration zur Folge. Diese führt zu einer Hemmung der Caspasen und damit zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptose [79]. Die hohe Kaliumkonzentration hat eine Depolarisation der PAGMZ zur Folge. Studien über die funktionellen Veränderungen der PAGMZ im Tiermodell der CHPH oder bei Patienten mit PH zeigen diese gesteigerte Depolarisation der PAGMZ. Über spannungsabhängige Calciumkanäle führt die Depolarisation zu einem erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle, was eine verstärkte Vasokonstriktion und Proliferation der PAGMZ zur Folge hat [80-82]. Im Tiermodell der CHPH zeigt sich bei gesteigerter Expression und Aktivität der Kaliumkanäle ein vermindertes PVR, was diese Theorie untermauert [83]. Die Aktivität von Kaliumkanälen beeinflusst demnach die Proliferation der PAGMZ. Die genauen Mechanismen, durch die eine verminderte Aktivität und Expression von Kaliumkanälen zum vaskulären Remodeling führen können, sind jedoch noch nicht ausreichend verstanden [6]. Eine Steigerung der Expression und Aktivität von Kaliumkanälen könnte ein interessanter pharmakologischer Angriffspunkt sein, um das PVR bei der PH zu beschränken. Tierversuche mit Dehydroepiandrosteron, einem Steroidhormon das Kaliumkanäle öffnet, zeigen ein reduziertes PVR bei der CHPH [84]. Auch durch die pharmakologische



Inhibition des nuclear factor of activated T cells (NFAT) im Tiermodell resultiert ein signifikant geringeres Remodeling. NFAT führt über eine Reduktion der Expression und Aktivität von Kaliumkanälen zu einer gesteigerten Proliferation der PAGMZ. Die erhöhte intrazelluläre Kaliumkonzentration und verstärkte Expression des proapoptotischen Proteins B-cell lymphoma 2 (bcl2) durch NFAT fördert die Apoptoseresistenz der PAGMZ [85]. An der Regulation von Apoptose und Gefäßtonus sind ebenfalls mitochondriale, proapoptotische Faktoren und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt. Die Mitochondrien bieten möglicherweise einen interessanten pharmakologischen Angriffspunkt, um das PVR aufzuhalten. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Pyruvatdehydrogenase-Kinase in den Mitochondrien durch Dichloressigsäure die Apoptose in PAGMZ induziert und die Proliferation und damit das PVR verringert [86]. Dichloressigsäure erhöht die Expression von Kaliumkanälen, wodurch im Tiermodell die CHPH vorgebeugt und sogar rückgängig gemacht werden konnte [87]. Die Mitochondrien der PAGMZ unterscheiden sich von den Mitochondrien der glatten Muskelzellen aus Arterien des systemischen Kreislaufs. Diese Diversität ist eventuell eine Erklärung dafür, dass das vaskuläre Remodeling bei der PH streng auf den Lungenkreislauf beschränkt ist [88]. Bei der idiopathischen PAH wurde in den PAGMZ eine Hyperpolarisation der Mitochondrien beschrieben. Dies ist vereinbar mit einer erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber Apoptose. Die Ätiologie ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Die Inhibition von NFAT führt zur Depolarisation der Mitochondrien und fördert somit den Efflux von proapoptotischen Mediatoren in das Zytoplasma [85]. Neben diesen Signalwegen spielen Schäden der DNA sowie die zellulären Reaktionen darauf eine Rolle bei der Entstehung der PH. PAGMZ zeigen Anzeichen von DNA-Schäden und deren zellulären Antwort. Die Aktivierung der Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) ist Teil des DNA-Reparatursystems, verlängert das Überleben der Zelle und führt über die Aktivierung des Hypoxie induzierten Faktors 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) und NFAT zu einer gesteigerten Proliferation der PAGMZ. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass der PARP-Inhibitor ABT-888 die PH verringern und die pulmonalarterielle Hypertrophie limitieren kann [89]. Minerale und Ionen wie Zink, Eisen und Calcium scheinen als Kofaktoren und Bestandteile von Proteinen ebenfalls eine Rolle in der zellulären Homöostase der Pulmonalarterien zu spielen. Zink ist beteiligt an der

Proliferation und dem Remodeling der PAGMZ. Im Tiermodell der CHPH und bei Menschen nach Exposition mit anhaltender Hypoxie konnte eine gesteigerte Expression des Zink-Transporters 12 (ZIP12) festgestellt werden. Während nach Hypoxie in vitro die Expression von ZIP12 sowie die Proliferation der PAGMZ erhöht war, konnte durch eine Hemmung von ZIP12 die gesteigerte Proliferation der PAGMZ nach Hypoxie aufgehoben werden [90]. Eisenmangel führt vermutlich zu einer negativen Beeinflussung der PH. In klinischen Studien an Patienten mit PAH ging ein Eisenmangel mit einem verminderten Überleben der Patienten einher [36]. In Tiermodellen entwickelten Eisen-mangelernährte Tiere eine PH mit PVR und einer begleitenden Entzündungsreaktion [91]. Auch Calcium ist möglicherweise durch Effekte auf Proliferation, Migration und Vasokonstriktion der PAGMZ an der Pathogenese der PH beteiligt. Sowohl im Tiermodell der CHPH, als auch bei Patienten mit PH konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration für das Wachstum und die Migration von PAGMZ benötigt wird [92]. Eine erhöhte Calciumkonzentration ist über die Aktivierung von Calcium-abhängigen Kinasen und NFAT ein bedeutender Stimulator der Proliferation von glatten Muskelzellen [85]. Die Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums 2 (SERCA2) ist bei Patienten mit PH in den Pulmonalarterien herunterreguliert. Eine verminderte Expression von SERCA2 in glatten Muskelzellen ist mit einer Dedifferenzierung und verstärkter Proliferation assoziiert. Eine vermehrte Expression von SERCA2 in PAGMZ ist hingegen mit einer verminderten Aktivierung von signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)/NFAT und damit einer verringerten Proliferation assoziiert. Im Tiermodell der PH konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von SERCA2 durch einen viralen Gentransfer zu einer Abnahme der PH, des Remodelings der Media und der rechtsventrikulären Hypertrophie führt [93]. Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration resultiert wahrscheinlich aus einer endothelialen Dysfunktion, einer der frühesten pathobiologischen Veränderungen bei der PH. Das Ungleichgewicht von vasoaktiven Faktoren aus dem Endothelium zugunsten der Vasokonstriktoren Endothelin, Thromboxan und Serotonin führt dabei zu einem erhöhten intrazellulären Calciumgehalt in PAGMZ [94]. Intrazelluläres Calcium führt wiederum zur Aktivierung von NFAT und zur Regulierung weiterer Gene, die in

Prozesse des PVR involviert sind. Die Depolarisation der Zellen mit Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanäle und einem daraus resultierenden erhöhten Calciumeinstrom hält die hohe intrazelluläre Calciumkonzentration aufrecht [85]. Spannungsabhängige Calciumkanäle können durch Agonisten aktiviert werden und tragen zur gesteigerten Proliferation der PAGMZ bei. Sie sind somit an den Prozessen des PVR beteiligt, insbesondere bei erhöhter Konzentration von bestimmten Wachstumsfaktoren [95, 96]. Ursächlich für eine Erhöhung der Calciumkonzentration in PAGMZ sind aber auch zelleigene Mechanismen, wie eine Hochregulation der transient receptor potential channels (TRP-Kanäle), eine verminderte SERCA-Aktivität sowie eine Dysregulation des Serotonin-Transporters. TRP-Kanäle sind Calcium-durchlässige, nicht-selektive Kationenkanäle, die in PAGMZ von Patienten mit PAH und im Tierexperiment der CHPH hochreguliert sind [97-99]. Weitere Evidenz zeigt sich durch die Entdeckung eines Polymorphismus im TRP-Kanal-Gen, der die Funktion des Kationenkanals verstärkt und die Betroffenen einem erhöhten Risiko zur Entwicklung einer PAH aussetzt [100]. Außerdem konnte der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher (NHA) in glatten Muskelzellen mit einer gesteigerten Proliferation der PAGMZ in Zusammenhang gebracht werden. PAGMZ von Tieren nach chronischer Hypoxie zeigen eine gesteigerte Expression und Aktivität des NHA-1, was intrazellulär eine Alkalisierung des pH-Wertes zur Folge hat [101]. Eine reduzierte Aktivität des NHA führt zu einem verminderten Hypoxie-induzierten PVR mit verminderter Proliferation und Migration der PAGMZ [102, 103]. Experimentelle Daten aus Versuchen mit NHA-Inhibitoren und NHA-1-KO-Mäusen bestätigen die Annahme, dass eine erhöhte Expression und Aktivität des NHA-1 die Proliferation und Migration von PAGMZ stimuliert. Im Tiermodell der CHPH konnte durch Inhibition oder KO des NHA-1 die Entwicklung einer PH mit PVR unterdrückt werden [103, 104]. Für Proliferation und Migration der PAGMZ beim chronischen PVR ist zudem wahrscheinlich die Aktivierung der Rho-Kinase notwendig. Der Rho-Kinase-Signaltransduktionsweg vermittelt die zytoskelettale Neuordnung in Endothelzellen und PAGMZ [105]. Die Aktivierung der Rho-Kinase wird durch Wachstumsfaktoren, geöffnete Calciumkanäle sowie den NHA vermittelt [95, 103]. Eine Inhibition des Rho-Kinase-Signalweges reduziert den pulmonalarteriellen Druck und das PVR in Patienten mit PAH [106]. Ein

Mechanismus, der sowohl zur Aktivierung des NHA als auch des Rho-Kinase-Signalweges führt, ist die Bindung des Peptidhormons Endothelin-1 an membrangebundene Endothelinrezeptoren der PAGMZ. Die Bindung von Endothelin-1 führt außerdem zur Hemmung der Kaliumkanal-Expression und zu einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration in glatten Muskelzellen [107-109]. Neben dem akut vasokonstriktorisches Effekt führt das aus Endothelzellen sezernierte Endothelin-1 durch Bindung an Rezeptoren der PAGMZ folglich zur Steigerung der Proliferations- und Migrationsprozesse in PAGMZ. Die Spiegel von zirkulierendem Endothelin-1 sind in allen Tiermodellen und humanen Formen der PH erhöht [110]. Die Verwendung von Endothelin-Rezeptor-Inhibitoren kann in einigen Tiermodellen die Entstehung einer PH mit PVR verhindern oder sogar rückgängig machen. In der daraus resultierten klinischen Anwendung zeigte sich eine verbesserte körperliche Belastbarkeit sowie ein verlängertes Überleben der Patienten. Ob diese Effekte auf eine reduzierte Vasokonstriktion oder ein vermindertes PVR zurückzuführen sind, ist noch unklar [111]. Der Rho-Kinase-Signalweg wird außerdem durch 5-Hydroxytryptamin (5-HT/Serotonin) aktiviert. Die Aufnahme von 5-HT beeinflusst Wachstum und Remodeling der PAGMZ. Neben der Aktivierung der Rho-Kinase und der mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPKs), beinhaltet die Signalkaskade von 5-HT auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Induktion von Genen, die am Zellwachstum beteiligt sind. Die genetische oder pharmakologische Hemmung des 5-HT-Rezeptors führt zu einer reduzierten glattmuskulären Proliferation und einem verminderten Hypoxie-induzierten Remodeling [112]. Weiterhin spielt der Signalweg der knochenmorphogenetischen Proteine (bone morphogenic proteins/BMPs) beim PVR eine Rolle. Von Interesse sind dabei vor allem BMP2, BMP4, BMP7, sowie die BMP-Rezeptoren Typ 1 und 2. Je nach Lokalisation der PAGMZ im pulmonalen Gefäßsystem haben BMPs unterschiedliche Effekte. In proximalen Pulmonalarterien sind BMP2 und BMP4 antiproliferativ [113]. In distalen pulmonalarteriellen Gefäßen zeigt BMP4 über eine Hochregulation von TRP-Kanälen und eine damit einhergehende erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration proliferative Effekte [114]. Mäuse mit einem heterozygoten BMP4-Knockout sind vor der Entwicklung einer CHPH geschützt, während Mäuse mit einem heterozygoten BMP2-Knockout eine

schwerwiegendere CHPH entwickeln als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister [115, 116]. Genetische Mutationen des BMP-Rezeptor Typ 2 (BMPR-2) wurden in PAGMZ bei Patienten mit PAH beschrieben. Die Mutation führt zur Reduktion der BMP-Aktivität und somit zum Verlust der antiproliferativen Wirkung von BMP2 [117]. Weitere Mutationen in Rezeptoren des transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) wurden in Patienten mit PAH beschrieben. Die Aktivierung und Signaltransduktion von TGF- $\beta$ /BMPR-2 führt somit nicht wie normal zu einer Unterdrückung der Proliferation und Aktivierung der Apoptose von PAGMZ [113, 118]. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von STAT3 zu einer posttranslationalen Herunterregulierung von BMPR-2 führt [119]. Interessanterweise ist die Expression von BMPR-1 und -2 auch in Tiermodellen der CHPH reduziert, was darauf hindeutet, dass die Fehlregulation der BMP-Signalwege ein gemeinsames Merkmal der PH ist [120].

### **1.2.2 Transitions- und Migrationsprozesse**

Neben der gesteigerten Proliferation und Resistenz gegenüber Apoptose von PAGMZ, gibt es auch Hinweise darauf, dass zelluläre Transitions- und Migrationsprozesse am Remodeling der Media beteiligt sind. So wird vermutet, dass eine Transition von endothelialen zu mesenchymalen Zellen stattfindet, und dass diese transformierten Endothelzellen einen Teil der beim PVR neu auftretenden  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Zellen ausmachen. Sie akkumulieren und beteiligen sich am Remodeling der Media [121]. Die endothelial-mesenchymale Transition tritt sowohl physiologisch während der embryonalen Entwicklung, als auch im Rahmen einiger vaskulärer Pathologien auf [122]. Bei diesem Prozess erlangen Endothelzellen Eigenschaften von mesenchymalen Zellen. Sie verlieren die engen gap junctions, migrieren in die Media und verlieren ihre typischen Endothelzellmarker, wie beispielsweise CD31. Zeitgleich beginnen sie  $\alpha$ -smooth-muscle-actin und Vimentin zu exprimieren, typische glattmuskuläre Marker [121]. Die experimentellen Daten von Patienten mit PH bestätigen diese phänotypische Transition. Die Expression von Endothelzellen aus plexiformen Läsionen der Pulmonalarterien beinhaltet sowohl endotheliale Marker als auch  $\alpha$ -smooth-muscle-actin und

typische mesenchymale Zellmarker [123]. TGF- $\beta$  scheint bei diesem Prozess eine wichtige Rolle zu spielen. Die endothelial-mesenchymale Transition wird durch die TGF- $\beta$ -abhängige Aktivierung von unterschiedlichen Signalwegen (Smad1/2, ERK-1/2, p38MAPK) in Gang gesetzt. Weitere Stimulationsfaktoren sind inflammatorische Moleküle wie Interleukin-1 $\beta$  und der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  [124]. Neben den Veränderungen von präexistenten PAGMZ, tragen also auch in die Media migrierende Endothelzellen zur distalen Muskularisierung der Gefäße bei. Einige Wissenschaftler schlagen dazu noch weitere Transitionsprozesse vor, nach denen auch Fibroblasten, Perizyten und hämatopoetische Stammzellen als potenzieller zellulärer Ursprung der PAGMZ beim PVR in Frage kommen. Im Tiermodell der CHPH wurde in der pulmonalarteriellen Wand eine rasche Akkumulation von Fibroblasten beschrieben, welche sich in glatte Muskelzellen transformieren können [19, 21]. Welcher Mechanismus hauptverantwortlich für das vermehrte Auftreten  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-exprimierender Zellen ist, bleibt aktuell unklar. Neuere Ergebnisse von Studien lassen jedoch vermuten, dass die überwiegende Mehrheit der Hypoxie-induzierten PAGMZ der distalen Arteriolen von präexistierenden, proximalen PAGMZ stammt. Als Antwort auf Hypoxie scheinen sich diese differenzierten, präexistenten PAGMZ bereits nach wenigen Tagen zu entdifferenzieren. Darauf folgen dann, ähnlich wie bei der pulmonalarteriellen Entstehung, Proliferation, distale Migration, Maturation und erneute Differenzierung der Zellen [125]. Im Mausmodell der PH konnten an den Übergangszonen der Pulmonalarterien, wo unter normoxischen Bedingungen muskularisierte in nicht-muskularisierte Arterien übergehen, glattmuskuläre Progenitorzellen identifiziert werden. Diese Progenitorzellen exprimieren Platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ), ein Marker entdifferenzierter, mesenchymaler Zellen. Es wird daher vermutet, dass diese wenigen Progenitorzellen der Übergangszone als Reaktion auf Hypoxie distal migrieren, entdifferenzieren und klonal expandieren. Die Induktion dieser PDGFR- $\beta$ -positiven Zellen scheint somit an der Muskularisierung der distalen Arteriolen entscheidend beteiligt zu sein. Bei Hypoxie steigt in diesen Zellen die Expression des pluripotenten Transkriptionsfaktors Kruppel-like factor 4 (KLF4), welcher über den ebenfalls durch Hypoxie aktivierten Liganden Platelet-derived growth factor B (PDGF-B) induziert wird. KLF4 ist ein wichtiger Faktor bei der

Entdifferenzierung von Zellen. Zellmigration, klonale Expansion und distale Muskularisierung sind mit erhöhten Konzentrationen von KLF4 und PDGF-B assoziiert. Nicht nur in Tiermodellen, auch in experimentellen Studien mit Lungengewebe von Patienten mit PAH zeigt sich eine Hochregulation von KLF4 in PAGMZ, vor allem in proliferierenden glatten Muskelzellen der Arteriolen [126]. Die Migration von PAGMZ wird durch Hypoxie induziert und durch Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration beeinflusst. Eine Calcium-abhängige Erhöhung der Expression des membranständigen Wasserkanals Aquaporin-1 (AQP1) während Hypoxie ist für die Migration von PAGMZ notwendig [127]. Es wird vermutet, dass AQP1 an gerichteten Zellbewegungen und/oder der zytoskelettalen Neuordnung beteiligt ist, die für Migrationsprozesse der glatten Muskelzellen erforderlich ist [128].

## **1.3 Hypoxie-induzierbare Faktoren**

### **1.3.1 Funktion, Regulation und Signalwege**

Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF) sind Sauerstoff-sensitive Transkriptionsfaktoren, die eine Adaptation der Zelle an hypoxische Umgebungsbedingungen erlauben. Die zelluläre Sauerstoffversorgung spielt bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Verminderte O<sub>2</sub>-Konzentrationen im Gewebe sind während der Embryogenese physiologisch und bei einigen pathologischen Prozessen wie soliden Tumoren, Entzündungsreaktionen, Lungenerkrankungen und bei der Wundheilung zu finden. Da die Detektion und Regulation der O<sub>2</sub>-Konzentration für das Überleben essentiell ist, entwickelten sich während der Evolution die Mechanismen zur Steuerung einer schnellen Antwort auf O<sub>2</sub>-Mangel zu einem komplexen System. In höheren Organismen wird die zelluläre Antwort auf eine verminderte O<sub>2</sub>-Konzentration in großen Teilen mithilfe der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren koordiniert. Die zelluläre Adaptation durch HIF auf geringe O<sub>2</sub>-Konzentrationen beinhaltet die synchronisierte Transkription einer Vielzahl von Genen, welche die zellulären Anpassungsprozesse steuern [42, 129, 130]. Hypoxie induzierbare Faktoren sind heterodimere Proteine mit einer O<sub>2</sub>-abhängigen  $\alpha$ -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -

Untereinheit (auch bekannt als aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein/ARNT). Bei Mensch und Maus existieren drei unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten von HIF, deren Hypoxie-abhängige Expression nachgewiesen werden konnte und die allesamt mit der  $\beta$ -Untereinheit (ARNT) dimerisieren: HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  (auch bekannt unter dem früheren Namen endothelial PAS domain-containing protein 1/ EPAS1) und HIF3 $\alpha$  [131, 132]. Regulation und Stabilisierung von HIF erfolgt in erster Linie posttranslational in Abhängigkeit der O<sub>2</sub>-Konzentration. Unter normoxischen Bedingungen wird die  $\alpha$ -Untereinheit von HIF an zwei Prolinresten durch Prolylhydroxylasen (prolyl hydroxylase domain proteins, PHDs) mithilfe von molekularem Sauerstoff hydroxyliert. Das von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Protein (pVHL) interagiert dadurch mit HIF $\alpha$ , welches dann polyubiquitiniert und proteosomal abgebaut wird [133, 134]. Unter hypoxischen Bedingungen sinkt die Aktivität der Prolylhydroxylasen, die  $\alpha$ -Untereinheit von HIF wird nicht modifiziert, was zu einer Proteinstabilisation und einem Schutz vor Abbauvorgängen im Proteasom führt. Nach Stabilisation im Zytosol transloziert HIF $\alpha$  bei Hypoxie in den Nukleus und rekrutiert dort nach Dimerisation mit der  $\beta$ -Untereinheit Koaktivatoren der Transkription. Dieser Komplex steuert die Genexpression hunderter Gene über die Bindung an hypoxia response elements (HREs), welche sich in den Promotorregionen der HIF-Zielgene befinden. Die gesteigerte Transkription dieser Gene ist für die zelluläre Adaptation an hypoxischen Stress wesentlich [42, 135]. Zu diesen Genen gehören unter anderem Erythropoetin, Glukose-Transporter, Enzyme der Glykolyse, Transferrin, Hämoxxygenase, Endothelin-1, Stickstoffmonoxid-Synthasen und Signalmoleküle der Angiogenese, wie dem vascular endothelial growth factor (VEGF) [136-138]. Zusammen bewirken diese auf Hypoxie reagierenden Gene eine Reduktion der durch niedrige O<sub>2</sub>-Konzentrationen bedingten Effekte auf zellulärer und systemischer Ebene [139]. Zellen mit einem Mangel an HIF1 $\alpha$  zeigen unter Hypoxie eine gestörte Hochregulation dieser Gene, die für zelluläre Prozesse wie Proliferation, Glukosetransport und Energiemetabolismus entscheidend sind [140]. Nicht nur bei pathologischen Prozessen wie Entzündung, Tumorprogression oder der PH spielt HIF eine wichtige Rolle. In der Embryogenese und vielen physiologischen Prozessen ist HIF als Transkriptionsfaktor entscheidend beteiligt [140]. Die evolutionäre und biologische Bedeutung des HIF-Systems zeigt sich anhand der Konservierung



des HIF-Transkriptionsfaktors vom Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* bis zum Menschen. Der einfache, multizelluläre Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* besitzt ausschließlich die HIF1 $\alpha$ -Untereinheit. Die Bedeutung im Glukose-Stoffwechsel und die ubiquitäre Expression zeigt, dass HIF1 $\alpha$  unabkömmlich ist [141]. Das deutlich komplexere innere Milieu von höheren Lebewesen, verglichen zu *Caenorhabditis elegans*, benötigt möglicherweise ein deutlich flexibleres und spezialisierteres System der Sauerstoffregulation, um die Aufrechterhaltung und Anpassung der Sauerstoffversorgung bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen zu gewährleisten. Die Anwesenheit von mehreren HIF $\alpha$ -Untereinheiten könnte daher wichtig sein, um flexibel und adäquat auf Sauerstoffschwankungen reagieren zu können [142]. Während HIF3 $\alpha$  in seiner Funktion primär als Regulator von HIF1 $\alpha$  wirkt, reagieren HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  auf viele experimentelle Bedingungen auf eine ähnliche Weise [143]. HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  werden in einer Vielzahl von humanen Zelllinien exprimiert und akkumulieren bei Hypoxie binnen Minuten im Nukleus. Bei Reoxygenierung werden die Transkriptionsfaktoren rasch wieder abgebaut. Das Vorhandensein, und damit die Regulation von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  wird dabei in erster Linie posttranslational durch Stabilisierung und proteasomalen Abbau determiniert. Die Konzentration der mRNA von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  steigt bei Hypoxie nicht oder nur geringfügig an. In normoxischen Geweben kann HIF2 $\alpha$ , und in einem geringeren Ausmaß auch HIF1 $\alpha$ , bereits detektiert werden [144]. Strukturell sind HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  eng verwandt, 48% der Aminosäure-Sequenz ist bei beiden Proteinen identisch. HIF2 $\alpha$  bindet, wie HIF1 $\alpha$ , ebenfalls an HIF1 $\beta$  im Nukleus und aktiviert die Transkription von Genen über Bindung an HREs. HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  regulieren damit die Expression Hypoxie-induzierter Gene und beeinflussen über ihre Signaltransduktionswege die zelluläre Antwort auf Hypoxie [141]. Während HIF1 $\alpha$  ubiquitär in allen Geweben exprimiert wird, konnte HIF2 $\alpha$  anfangs vor allem in Gefäßendothelien während der embryonalen Entwicklung detektiert werden [145, 146]. Erkenntnisse aus Tiermodellen mit chronischer Hypoxie zeigen jedoch auch postnatal eine HIF2 $\alpha$ -Expression in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, wie Hepatozyten, Pneumozyten, Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Die Funktion von HIF2 $\alpha$  ist also nicht, wie ursprünglich angenommen, auf Gefäßendothelien beschränkt. HIF2 $\alpha$  weist im Vergleich zum ubiquitär exprimierten HIF1 $\alpha$

dennoch ein deutlich beschränkteres Expressionsmuster auf. Funktionell werden die meisten HIF-Zielgene sowohl von HIF1 $\alpha$ , als auch von HIF2 $\alpha$  induziert. Es konnten jedoch auch Unterschiede in der Genexpression und Spezifität von Zielgenen der Transkriptionsfaktoren festgestellt werden. So führt beispielsweise eine Überexpression von HIF2 $\alpha$ , im Gegensatz zu HIF1 $\alpha$ , zu einer gesteigerten Expression des endothelial tyrosine kinase receptor Tie2, was darauf hindeutet, dass Tie2 ein Zielgen ausschließlich von HIF2 $\alpha$  darstellt. Zudem scheint HIF2 $\alpha$ , verglichen zu HIF1 $\alpha$ , zu einer stärkeren Aktivierung des VEGF Promotors zu führen [130, 141, 144]. Genexpressionstudien bestimmter Zelllinien (HEK293 und 785-O) lassen vermuten, dass ausschließlich HIF1 $\alpha$  für die Aktivierung von Zielgenen verantwortlich ist, die für Enzyme der Glykolyse kodieren und typischerweise durch Hypoxie induziert werden [141]. Dies könnte eine molekulare Erklärung dafür sein, warum HIF1 $\alpha$  für den Pasteur-Effekt obligat erforderlich ist [147]. Ergebnisse zur Expression von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  zeigen außerdem, dass beide Isoformen eine komplementäre Funktion bei der koordinierten transkriptionalen Antwort auf Hypoxie aufweisen. HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  sind daher nicht redundant, sondern in Induktion und Funktionen je nach Gewebe unterschiedlich aufeinander abgestimmt [142, 145, 146]. Die Konzentrationen von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  unterscheiden sich je nach Zelltyp zum Teil deutlich. In Zelllinien, die sowohl HIF1 $\alpha$  als auch HIF2 $\alpha$  exprimieren, konnten unter normoxischen Bedingungen höhere Level von HIF2 $\alpha$  festgestellt werden. In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass HIF2 $\alpha$  bereits bei weniger ausgeprägter Hypoxie induziert wird. Diese Ergebnisse deuten möglicherweise darauf hin, dass HIF2 $\alpha$  im Vergleich zu HIF1 $\alpha$  vor allem unter normoxischen und weniger stark unter hypoxischen Bedingungen relevant ist [144]. Genetisch modifizierte Organismen, die einen Knockout (KO) von HIF1 $\alpha$  oder HIF2 $\alpha$  aufweisen, zeigen bereits in der Embryogenese kardiovaskuläre und pulmonale Malformationen und sind nicht überlebensfähig. Das verdeutlicht die biologische Bedeutung von HIF. Sowohl HIF1 $\alpha$  als auch HIF2 $\alpha$  sind für die Embryogenese unerlässlich und ihre jeweilige Funktion kann nicht kompensiert oder ersetzt werden [148, 149].

### 1.3.2 Die Bedeutung von HIF bei der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertension

Alveoläre Hypoxie bei chronischen Lungenerkrankungen oder in großer Höhe ist ätiologisch eine bedeutende Ursache der PH (WHO Klassifikation Gruppe 3) [130]. Die Tatsache, dass pulmonale Gefäße umgehend auf einen verminderten O<sub>2</sub>-Gehalt im Blut reagieren, macht eine Regulation dieser akuten Mechanismen auf transkriptionaler Ebene unwahrscheinlich. Eine direkte Regulation der HPV durch HIF scheint daher unwahrscheinlich [42]. Dennoch weisen genetische Aberrationen darauf hin, dass HIF einen Einfluss auf die HPV hat. Patienten mit Chuvash Polyzythämie, der eine seltene hypomorphe Mutation von VHL zugrunde liegt, weisen auch unter nicht-hypoxischen Bedingungen eine Akkumulation von HIF $\alpha$  auf und zeigen bei Hypoxie eine verstärkte pulmonale Vasokonstriktion [150]. Auch bei Menschen mit Gain-of-Function-Mutation von HIF2 $\alpha$  zeigt sich eine gesteigerte HPV [151]. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass HIF indirekt die akute Antwort der pulmonalen Gefäße auf Hypoxie beeinflusst. Welche Rolle dabei HIF in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen innehat ist unklar und wird kontrovers diskutiert. Neben einer Bedeutung bei der HPV, zeigen tierexperimentelle Daten einen wichtigen Einfluss von HIF bei der Entwicklung der CHPH. Grundlage für die vorliegenden Experimente sind Arbeiten, die zeigen, dass sowohl heterozygote HIF1 $\alpha$  als auch heterozygote HIF2 $\alpha$  KO-Mäuse vor der Entwicklung einer CHPH zumindest teilweise geschützt sind [152, 153]. Im Vergleich zu homozygoten HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen sind Mäuse mit einem heterozygoten KO lebensfähig und entwickeln sich normal. Unter normoxischen Bedingungen besteht phänotypisch kein relevanter Unterschied zwischen heterozygoten HIF1 $\alpha$ -KO-, HIF2 $\alpha$ -KO- und Wildtyp-Mäusen. Nach Exposition mit chronischer Hypoxie entwickeln heterozygote HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern eine signifikant verminderte CHPH. Im Hypoxieexperiment zeigt sich eine verzögert einsetzende Polyzythämie, ein reduziertes PVR sowie eine verminderte RVH im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Bei heterozygoten HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen konnte nach Hypoxie eine verminderte Muskularisierung der kleinen Lungengefäße sowie eine geringere Verdickung der Media größerer

Pulmonalarterien festgestellt werden [152, 153]. Der heterozygote KO ist bei diesen Mauslinien jedoch in allen Zellen des Organismus und führt zu einer global verminderten Expression von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$ . Eine Differenzierung der gewebespezifischen Funktion von HIF ist anhand dieser Daten nicht möglich. Die Produkte von einigen HIF1 $\alpha$ -Zielgenen wurden bei chronischer Hypoxie mit der Entstehung einer PH und Polyzythämie in Zusammenhang gebracht [154-157]. Nach Exposition mit chronischer Hypoxie zeigt sich im Endothel, in PAGMZ sowie im Bronchial- und Alveolarepithel eine erhöhte Aktivität von HIF1 $\alpha$ . Die HIF1 $\alpha$ -Konzentration ist in-vivo und in-vitro eng an die O<sub>2</sub>-Konzentrationen gekoppelt und vermindert sich bei Reoxygenierung wieder [158]. Bei Patienten mit PH konnte eine erhöhte Akkumulation von HIF1 $\alpha$  nachgewiesen werden [6]. Die Konzentration von HIF1 $\alpha$  korreliert dabei in-vitro und in-vivo mit der Expression nachgeschalteter Zielgene [140, 159]. Trotz unterschiedlicher Expressionsmuster von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$ , kann die mRNA beider Transkriptionsfaktoren bereits unter normoxischen Bedingungen im Lungengewebe detektiert werden [132]. Ähnlich wie heterozygote HIF1 $\alpha$ -KO-Mäuse verhalten sich heterozygote HIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse im Hypoxieexperiment. Sie sind im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ebenfalls vor der Entwicklung einer CHPH geschützt und entwickeln weder ein PVR, noch eine RVH. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch HIF2 $\alpha$  bei der Entstehung einer CHPH eine entscheidende Rolle spielt. Ob das fehlende PVR dabei Resultat eines direkten Effektes des HIF2 $\alpha$ -KO in pulmonalen Gefäßen ist, oder ob eine HIF2 $\alpha$ -KO-bedingte pulmonalarterielle Drucksenkung indirekt das PVR verringert, ist noch nicht geklärt [153]. Evidenz für die Bedeutung von HIF2 $\alpha$  bei der Entwicklung einer PH konnte ebenfalls in Studien mit Tibetern gefunden werden, welche große Höhen in der Regel sehr gut tolerieren. Es wurde eine Loss-of-Function-Mutation von HIF2 $\alpha$  gefunden, die mit reduzierten pulmonalarteriellen Drücken korreliert [160]. Andererseits ist eine Gain-of-Function-Mutation von HIF2 $\alpha$  mit der Entwicklung einer PH im Menschen sowie in der Maus assoziiert [151, 161]. Möglicherweise wird der Einfluss von HIF auf die Entstehung der CHPH unter anderem über Endothelin-1 vermittelt. Endothelin-1 ist ein bekanntes Zielgen von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$ , dessen Expression bei Patienten mit PH erhöht ist. Die Hemmung von Endothelin-1 oder dessen Rezeptors verhindert die Entstehung einer CHPH mit PVR [137, 162]. Endothelin-1 besitzt neben der Wirkung als

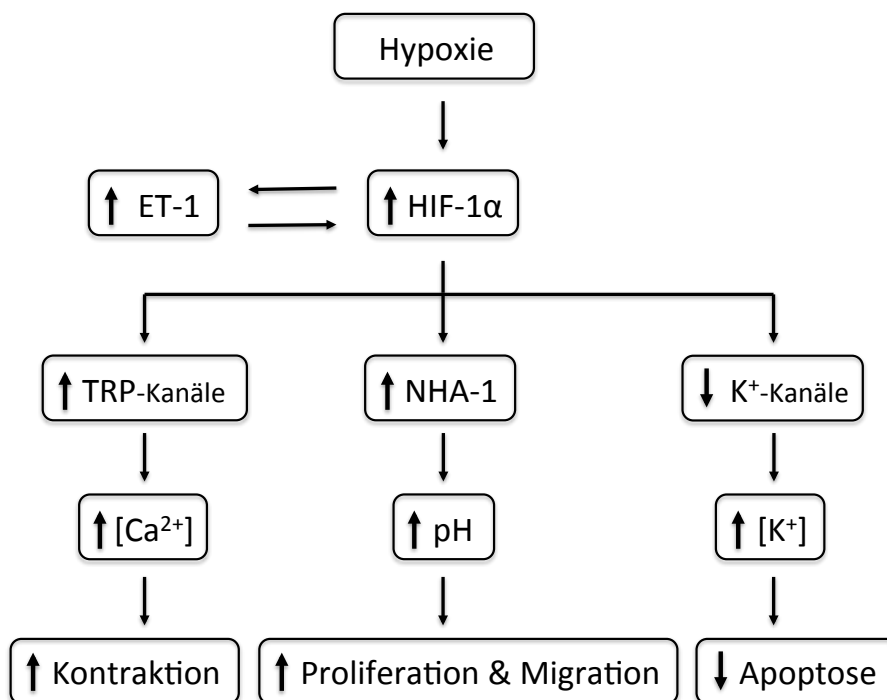
Vasokonstriktor auch eine potente proliferationsfördernde Wirkung auf PAGMZ [163]. HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  beeinflussen möglicherweise das Hypoxie-induzierte PVR über eine gesteigerte Expression von Endothelin-1 in Endothelzellen, was in PAGMZ zu einer verstärkten Konstriktion und Muskularisierung mit Wachstumsstimulation führt. Wildtyp-Mäuse zeigen unter Hypoxie eine Hochregulierung von Endothelin-1, die bei heterozygoten HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen nicht zu sehen ist. Der Effekt von HIF2 $\alpha$  auf die Entstehung der CHPH wird also möglicherweise unter anderem über eine gesteigerte Sekretion von Endothelin-1 aus dem Endothel vermittelt [153]. Ein weiterer pathophysiologischer Mechanismus könnte die HIF2 $\alpha$ -vermittelte Hochregulierung von Katecholaminen sein. Auch während der Embryogenese wurde die Bedeutung von HIF2 $\alpha$  in Zusammenhang mit der Regulation und Biosynthese von Katecholaminen bereits beschrieben [164]. Noradrenalin stimuliert die Vasokonstriktion isolierter Pulmonalarterien sowie das Wachstum von PAGMZ [165, 166]. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen findet sich bei heterozygoten HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen ein deutlich geringerer Hypoxie-assoziiertes Anstieg der Noradrenalin-Konzentration im Plasma. Dies lässt vermuten, dass bei chronischer Hypoxieexposition eine HIF2 $\alpha$ -induzierte Erhöhung der Noradrenalin-Plasmakonzentration ebenfalls einen Teil zum PVR bei CHPH beiträgt [153]. Darüber hinaus beinhaltet das proinflammatorische Milieu bei chronischer Hypoxie einige bekannte HIF-Zielgene, wie beispielsweise NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) und VEGF [20]. NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der bei Proliferation, Apoptose und Immunantwort von Zellen große Bedeutung hat. Neben der Induktion von entzündlichen Zytokinen, führt eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B wiederum zu erhöhten HIF-Konzentrationen, im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus zur Regulation inflammatorischer Prozesse [57, 167]. VEGF fördert neben der Angiogenese die Mobilisation von Entzündungszellen aus dem Knochenmark und ist an der Regulation von B- und T-Lymphozyten beteiligt [168]. Zusätzlich zu direkten Effekten auf Endothel und glatte Muskelzellen, beeinflusst HIF die Produktion und Sekretion von Entzündungsmediatoren aus Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. Dadurch wird ein entzündliches Milieu bei Hypoxie gefördert, welches das PVR zusätzlich beeinflusst [20, 42]. Die genauen Mechanismen, wie HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  die Prozesse des PVR beeinflussen, sind noch nicht ausreichend

verstanden. Die Annahme, dass HIF eine bedeutende Rolle bei diesen Prozessen spielt, ist mittlerweile jedoch unumstritten. Eine Hypoxie-assoziierte Akkumulation von HIF $\alpha$  zeigt sich sowohl im Endothel, als auch in PAGMZ [158]. In beiden Zelltypen ist HIF in die Hypoxie-assoziierten Prozesse involviert und Bestandteil wichtiger zellulärer Anpassungsmechanismen. Für ein genaues Verständnis des PVR ist es erforderlich, diese Prozesse möglichst getrennt voneinander zu untersuchen und durch gewebespezifische Knockouts die Funktion und Bedeutung von HIF1 und HIF2 zu eruieren. Ergebnisse von Experimenten mit HIF-Inhibitoren unterstreichen die Bedeutung von HIF beim PVR. Digoxin, ein Herzglykosid mit inotroper Wirkung, hemmt die Akkumulation und transkriptionale Aktivität von HIF1. Durch tägliche Digoxin-Injektion konnte das PVR und der rechtsventrikuläre Druckanstieg bei Hypoxie-exponierten Mäusen verhindert werden. Sogar bei bereits etablierter CHPH konnte Digoxin die rechtsventrikulären Drücke senken. Diese Ergebnisse untermauern eine mögliche Schlüsselrolle von HIF-Inhibitoren bei der Behandlung der CHPH [169]. Interessanterweise konnte Digoxin bei täglicher Injektion unter Hypoxie die RVH reduzieren, aber nicht komplett verhindern. Hypoxie hat also möglicherweise auch einen direkten, HIF1-unabhängigen Effekt auf den rechten Ventrikel [42]. Ein weiterer Inhibitor von HIF1 zeigt ähnliche Wirkung. Das antiseptische Präparat Acriflavin hemmt die HIF-Aktivität, indem es die Dimerisation der beiden Untereinheiten verhindert. Im Tiermodell der CHPH führt die tägliche Verabreichung von Acriflavin bei Ratten zu einem reduzierten rechtsventrikulären Druck mit vermindertem PVR und einer geringeren RVH [169, 170]. Die Gabe von Eisen ist eine weitere Möglichkeit zur Hemmung der HIF-Aktivität, da PHDs Eisen-abhängig funktionieren. Eiseninfusionen reduzieren den pulmonalarteriellen Druckanstieg bei Exposition mit chronischer Hypoxie [133, 171]. Diese Daten zeigen eindrucksvoll, dass die Hemmung der HIF-Aktivität protektive Effekte auf die Entwicklung einer CHPH haben könnte. Nebeneffekte von HIF-Inhibitoren können allerdings nicht komplett ausgeschlossen werden. Die klinische Anwendung von Digoxin bei Patienten mit PH wird aufgrund mangelnder Evidenz kontrovers diskutiert. Weitere Studien sind daher erforderlich, um eine zielgerichtete Inhibierung von HIF bei der PH weiter zu evaluieren [42].

### **1.3.3 Glattmuskuläres HIF beim Hypoxie-induzierten pulmonalvaskulären Remodeling**

Das Hypoxie-induzierte PVR beinhaltet die Proliferation, Migration und Hypertrophie von PAGMZ. Bei Wildtyp-Mäusen ist Hypoxie in PAGMZ mit einer Depolarisation, verminderten Expression und Aktivität von Kaliumkanälen, sowie aufgrund der Hochregulation des NHA-1 und der TRP-Kanäle, einer Erhöhung des pH-Wertes und der intrazellulären Calcium-Konzentration assoziiert (Abb. 2). Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde als wichtiger Trigger der Proliferation von PAGMZ bei der PH identifiziert. Diese Veränderungen gehen weiterhin mit einer erhöhten Kontraktilität, Apoptose-Resistenz und Migration von PAGMZ einher. HIF1 reguliert die Expression des NHA-1 und der TRP-Kanäle und steuert somit die Alkalisierung des pH-Wertes sowie die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in PAGMZ [97, 107, 172]. Im Mausmodell der CHPH treten diese Veränderungen der PAGMZ bei heterozygoten HIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen nicht oder verringert auf [173, 174]. Ob eine Reduktion von HIF2 $\alpha$  in PAGMZ bei Hypoxie ähnliche Effekte aufweist, ist nicht bekannt. Neben der Erhöhung des pH-Wertes und der intrazellulären Calcium-Konzentration, ist auch die verminderte Expression und Aktivität von spannungsabhängigen Kaliumkanälen abhängig von HIF1. Dies führt zur Apoptose-Resistenz und trägt somit vermutlich zum Hypoxie-induzierten PVR bei. Mäuse mit einem globalen, heterozygoten HIF1 $\alpha$ -KO zeigen bei Hypoxie keine reduzierte Dichte von spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Dadurch kommt es zu einer verminderten Depolarisation und Kontraktion, sowie durch eine Inhibition der Hypertrophie und Proliferation von PAGMZ zu einem reduzierten PVR bei chronischer Hypoxie [107, 173, 175]. Weiterhin erhöht chronische Hypoxie in PAGMZ die Expression von Endothelin-1-Rezeptoren. Die Aktivierung dieser Rezeptoren auf glatten Muskelzellen vermittelt die vasokonstriktischen und mitogenen Effekte von Endothelin-1, einem Zielgen von HIF. Neben Endothelzellen exprimieren auch PAGMZ HIF-abhängig Endothelin-1, welches an PAGMZ autokrin wirkt und das Remodeling steigert [153, 162, 163]. Endothelin-1-Rezeptor-Antagonisten sind wirksame pharmakologische Stoffe bei der Behandlung der PH im Menschen und unterbinden im Tiermodell teilweise die Entstehung einer CHPH [109, 176].

Interessanterweise erhöht Endothelin-1 seinerseits im Sinne einer Feedforward-Regulation die Expression von HIF1 $\alpha$  in PAGMZ und potenziert dadurch die Wirkung von HIF1 bei der Entstehung der PH (Abb. 2) [42, 177]. Die Effekte der PAGMZ auf Hypoxie sind weitgehend spezifisch für glatte Muskelzellen der PulmonalgefäÙe und in glatten Muskelzellen des systemischen Kreislaufs in diesem MaÙe nicht vorhanden [178, 179]. Der selektive KO von HIF1 $\alpha$  in glatten Muskelzellen zeigt im Mausmodell der CHPH eine deutliche Abschwächung der PH mit reduziertem PVR [48]. Ein HIF1 $\alpha$ -KO in glatten Muskelzellen hemmt die Hypoxie-induzierte Proliferation [180]. Ob glattmuskuläres HIF2 $\alpha$  bei Hypoxie die gleichen Effekte hat oder inwieweit sich HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in PAGMZ unterscheiden, ist bisher nicht ausreichend untersucht. Insgesamt deuten diese Erkenntnisse jedoch darauf hin, dass glattmuskuläres HIF eine wichtige Rolle in der kardiopulmonalen Antwort auf chronische Hypoxie einnimmt.



**Abb. 2: HIF1-vermittelte Effekte auf pulmonalarterielle glatte Muskelzellen.**

Die Hypoxie-bedingte Akkumulation von HIF führt in PAGMZ zu einer Erhöhung der TRP-Kanäle und des NHA-1, sowie zu einer Verminderten Expression und Aktivität von spannungsabhängigen Kalium-Kanälen. Dies hat neben einer verminderten Apoptose eine gesteigerte Kontraktilität, Proliferation und Migration von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen zur Folge.



Abb. modifiziert nach Shimoda et al., 2013/2014.

Die Inhibition von HIF1 durch Digoxin verhindert im Mausmodell die Entstehung einer CHPH sowie die Steigerung von pH-Wert und intrazellulärer Calcium-Konzentration in PAGMZ. Sogar bei bereits bestehender CHPH führt Digoxin zur Normalisierung von pH-Wert und Calcium-Konzentration in PAGMZ [169]. Diese Daten zeigen, dass HIF in PAGMZ bei der Entstehung und Regulation des Hypoxie-induzierten PVR vermutlich eine wichtige Rolle spielt. Da bei anderen, nicht mit Hypoxie assoziierten Formen der PH ebenfalls erhöhte HIF1 $\alpha$ -Konzentrationen und ähnliche Zellveränderungen von PAGMZ beobachtet wurden, könnte glattmuskuläres HIF1 auch für nicht-hypoxisches PVR von Bedeutung sein [181, 182].

#### **1.4 Gewebespezifische Knockout-Mauslinien**

Um das Genom des Menschen und die funktionelle Bedeutung einzelner Gene zu erforschen, eignet sich die Untersuchung von Expression und Funktion homologer Gene in Modellorganismen wie der Maus. Als Modellorganismus ist die Maus zur Erforschung menschlicher Erkrankungen vielseitig einsetzbar. Fast jedes menschliche Gen hat eine entsprechende Kopie im Genom der Maus [183]. Viele Erkenntnisse der modernen biomedizinischen Forschung beruhen auf genetisch modifizierten Mäusen und deren Erforschung. Es können von fast allen Genen Mutationen und Knockouts generiert werden, entweder durch Keimbahnmutationen oder durch gewebespezifische Genmutationen. Keimbahnmutationen führen zur kompletten Genmutation in allen Geweben des Organismus. Gewebespezifische Genmutationen erlauben die zeitliche und räumliche Kontrolle über den Knockout oder die Modifikation eines Gens [184]. Diese Technologie mit Verwendung einer gewebespezifischen Rekombinase hat das Feld der genetisch modifizierten Organismen revolutioniert. Mit ihrer Hilfe können genetische Modifikationen in bestimmten Zelltypen erzeugt oder zu einem gewünschten Zeitpunkt aktiviert werden, um systemische oder kompensatorische Effekte der genetischen Veränderung zu verhindern, die den Phänotyp beeinflussen und/oder maskieren würden. Außerdem kann durch induzierbare Mutationen eine

embryonale Lethalität umgangen werden. Dies ermöglicht uns ein besseres Verständnis der Gene in bestimmten Zelltypen des Organismus zu einem definierten Zeitpunkt und erlaubt die genaue Untersuchung des Zusammenhangs von Genotyp und Phänotyp [183, 185]. Die Funktion vieler Gene hängt vom Zelltyp ab und resultiert in einem komplexen Phänotyp, wie es beispielsweise beim Hypoxie-induzierten PVR der Fall ist. Die Differenzierung der zugrundeliegenden Mechanismen stellt eine große Herausforderung dar. Ob der Ursprung von Pathologien dabei in einem Zelltyp oder in einem komplexen Zusammenspiel von unterschiedlichen Geweben liegt, ist häufig unklar und kann durch gewebespezifische KO-Modelle besser untersucht werden [186]. Diese Technologie erlaubt der medizinischen Forschung außerdem die Erzeugung von Modellen genetischer Erkrankungen, die auf somatischen Mutationen beruhen, wie beispielsweise die meisten, nicht-vererbten Tumorerkrankungen [187]. Die Entwicklung gewebespezifischer Genmodifikationen ist dabei ein großer Fortschritt für die Erforschung zelltypspezifischer Genfunktionen.

## 2. Fragestellung und Zielsetzung

Hypoxie in vivo führt zur PH, charakterisiert durch PVR, RVH und erhöhte pulmonalarterielle Drücke. Glatte Muskelzellen spielen eine wichtige pathogenetische Rolle beim PVR. HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  sind wichtige Regulatoren der Hypoxieantwort mit nur teilweise überlappenden Funktionen. Beide Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle bei der CHPH. Jedoch ist ihre spezifische Rolle in glatten Muskelzellen bei der pulmonalvaskulären Antwort auf Hypoxie nicht genau bekannt. Ziel der Arbeit war, die Rolle von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in glatten Muskelzellen bei der Pathogenese der Hypoxie-induzierten PH zu untersuchen. Spezifisch sollten daher Knockout Mäuse generiert werden, bei denen HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  oder beide Gene in glatten Muskelzellen fehlen. Anhand dieser Modelle sollte untersucht werden, inwieweit es Unterschiede in der glattmuskulären Hypoxieantwort in vivo zwischen HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  gibt, und welche Auswirkungen ein Verlust von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in glatten Muskelzellen auf die Hypoxieantwort in vivo hat.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Anästhesie-System	Hugo Sachs Elektronik
Analysewaage PCB 350-3	Kern und Sohn GmbH
Analysewaage B 301 S	Sartorius
Autoklav groß KSG-116-2-ED	KSG
Autoklav klein KSG-25-2-3	KSG
Biofuge	Heraeus
Camera Controller	Hamamatsu
CO <sub>2</sub> -Absorber	Drägerwerk
Dampfgarer	Severin
Deckgläser 24x50mm	Carl Roth GmbH
Dewargefäß	KGW Isotherm
Druck-Messwandler ISOTEC	Hugo Sachs Elektronik
Einbettkassetten Rotilabo	Carl Roth GmbH
Elektrophorese-Kammer Mini-Sub Cell GT	BioRad
Entwässerungsautomat	Leica Biosystems
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf AG
Falcons 50ml	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop IX50	Olympus
Fluovac Absorber System	Harvard Apparatus
Geldokumentationssystem Gel Doc 2000	BioRad
Hg-Lampe	Olympus
Hypoxiekammer	Martin Humbs
Isofluran-Verdampfer MSS	Harvard Apparatus
Kühlplatte COP30	Medit
Kühlschrank	Liebherr
Laborspülmaschine	Miele
Magnetrührer MR3000	Heidolph
Megafuge 1.OR	Heraeus
Messverstärker-Modul-A	Hugo Sachs Elektronik

Minizentrifuge Capsulefuge PMC-060	TOMY
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss
Mikroskopleuchte HAL100	Zeiss
Mikrotom HM355S	Thermo Fisher Scientific
Mikrotomklinge S35	Feather
Mikrowelle	Whirlpool
Millipore-Anlage	Millipore GmbH
Nadeln BD Microlance 24G	Becton Dickinson
Objekträger Superfrost Plus	Gerhard Menzel GmbH
OP-Lampe	Heraeus
Paraffin-Ausgießstation	Leica Biosystems
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH
Perfusionsbesteck ECOFLO	Dispomed Witt oHG
pH Meter pH 540 GLP	WTW
Photometer NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
Pipetman	Gilson International
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH
S-Monovetten	Sarstedt
S-Monovetten-Adapter	Sarstedt
Sicherheitswerkbank CS5	Tecniplast
Spannungsquelle PowerPac 200	BioRad
Spannungsquelle PowerPac 300	BioRad
Spritzen 10ml	B. Braun AG
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermozykler PCR System 9700	PE Applied Biosystems
Tiefkühlschrank Herafreeze	Heraeus
Tierstall-Racks	Tecniplast
Ultraschallgerät	Vevo Visualsonics
UV-Transilluminator	BioRad
Video Copy Processor P91W	Mitsubishi
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage BP 4100 S	Sartorius
Wärmebecken 1052	GFL GmbH
Wärmeplatte	Leica
Wärmeunterlage ThermoLux	Witte & Sutor GmbH

### 3.1.2 Software

AxioVision Imaging	Zeiss
EBS9M Schreiber-Software	GHM Messtechnik GmbH
GelDoc	GelDoc
GraphPad Prism	GraphPad
Haemodyn	Harvard Apparatus
ImageJ	NIH Image
OpenLab	Improvision
QuantityOne (Gelelektrophorese)	Bio-Rad

### 3.1.3 Chemikalien

Agarosepulver NEE0	Carl Roth GmbH
Atemkalk	Drägerwerk
Dulbecco's PBS	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
EDTA	Carl Roth GmbH
Eisenhämatoxylin nach Weigert	Carl Roth GmbH
Entellan	Merck
Enthaarungscreme	Veet
Eosin G-Lösung 0,5%	Carl Roth GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethidium Bromid	Carl Roth GmbH
Fluoreszenz-Eindeckmedium	Dako
Formaldehyd	Merck
Hoechst 33258	Molecular Probes
Isofluran 100%	Abbott GmbH
Isopropanol	JT Baker
Mayer's Hämalaun Lösung	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Qiagen
Natriumazetat	Merck
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Paraffin	Carl Roth GmbH

PBS Tabletten	Gibco
PCR-Puffer	Qiagen
Pikro-Siriusrot-Lösung	Sigma
Proteinkinase K	Qiagen
Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert	Carl Roth GmbH
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Salzsäure	Merck
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH
Siriusrot-Lösung	Sigma
Taq-Polymerase	Qiagen
Tris	Carl Roth GmbH
Triton-X-100	Sigma
Tween 20	Sigma
Van-Gieson-Lösung (Pikrofuchsin)	Carl Roth GmbH
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck
WGA-Färbelösung RL-1022	Vector Laboratories
Xylenes	Sigma-Aldrich
100-Basenpaare-DNA-Marker	Invitrogen

### 3.1.4 Oligonukleotide/PCR Primer

Name:	Sequenz:
sm22-Cre800-Primer	5'- GCT GCC ACG ACC AAG TGA CAG CAA TG -3'
sm22-Cre1200-Primer	5'- GTA GTT ATT CGG ATC ATC AGC TAC AC -3'
HIF1 $\alpha$ -F2	5'- GCA GTT AAG AGC ACT AGT TG -3'
HIF1 $\alpha$ -Rev	5'- GGA GCT ATC TCT CTA GAC C -3'
HIF2 $\alpha$ -F	5'- CAG GCA GTA TGC CTG GCT AAT TCC AGT T -3'
HIF2 $\alpha$ -R	5'- CTT CTT CCA TCA TCT GGG ATC TGG GAC T -3'

### 3.1.5 Antikörper für die Immunhistochemie

Primäre Antikörper:  $\alpha$ -smooth-muscle-Actin, monoklonaler Mausantikörper, anti-Human (Dako)

Sekundäre Antikörper: M.O.M. Biotinylated Anti-Mouse IgG (Vector Laboratories)

### 3.1.6 Kit Systeme

DAKO REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse  
VECTOR M.O.M. Immunodetection Kit, Peroxidase

### 3.1.7 Lösungen

#### DNA-Isolation und Gelelektrophorese:

Lyse-Puffer:

Tris-HCL 50mM

EDTA 0,1M

NaCl 0,1M

SDS 1%

Der pH-Wert wurde auf pH 8,0 eingestellt.

Tris-EDTA (TE) Puffer zur Lösung von DNA-Proben:

Tris 10mM

EDTA 1mM

Der pH-Wert wurde auf pH 8,0 eingestellt.

10x Tris/Azetat/EDTA (TAE) Puffer:

Tris 0,5M

Natriumazetat 0,2M

EDTA 0,02M

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf pH 7,4 eingestellt.

#### Immunhistochemie:

Blockierungslösung: BSA 5% in PBS

Tris-EDTA-Puffer:

Tris 10mM

EDTA 1mM

Tween 0,05%

Der pH-Wert wurde auf pH 9,0 eingestellt.



Wheat Germ Agglutinin- Färbung:

Permeabilisierung-Puffer: Triton-X-100 0,2% in PBS

PBS-Triton-Puffer: Triton-X-100 0,05% in PBS

Blockierungslösung: BSA 1% in PBS, Triton-X-100 0,05%

## **3.2 Versuchstiere**

### **3.2.1 Das Cre/loxP-System**

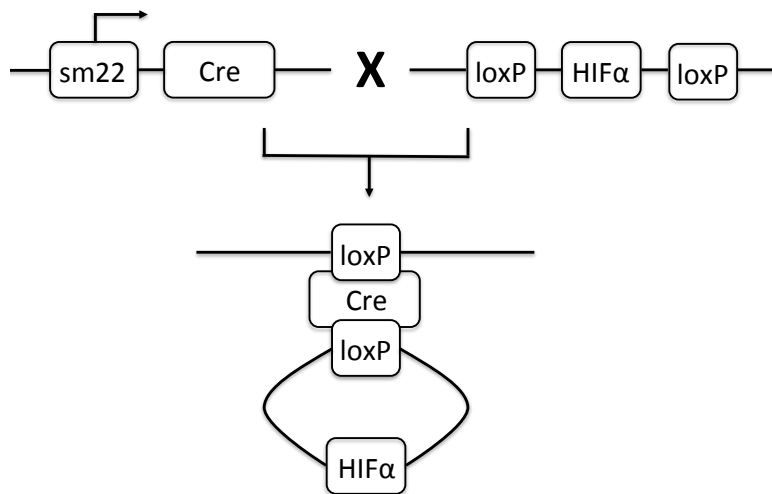
Das bewährteste Vorgehen für die Erzeugung gewebespezifischer Knockouts ist die Verwendung des Cre/loxP-Systems. Es ist das am besten studierte Rekombinase-System, das die gezielte Exzision oder Inversion von DNA-Sequenzen in lebenden Organismen ermöglicht. Dieses Rekombinase-System stammt ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 und ist hochspezifisch, schnell und effizient. Es kommt natürlicherweise bei Prozessen wie der bakteriellen Genomreplikation, der Differenzierung und der Translokation von Genen vor. Die Rekombinase Cre (causes recombination) kann DNA-Sequenzen effizient exzidieren oder invertieren, die durch zwei loxP-Sequenzen (locus of cross-over in Bakteriophage P1) flankiert werden. Durch die Platzierung eines gewebespezifischen oder induzierbaren Promotors, der das Cre-Gen kontrolliert, können gewebe- und zeit-spezifische Mutationen erzeugt werden [185, 186]. Zur Erzeugung eines gewebespezifischen KO wird das Zielgen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen einer Mauslinie gefloxt, das heißt von zwei loxP-Erkennungssequenzen flankiert. Da diese Erkennungssequenz aus 34 Basenpaaren besteht, ist ein zufälliges Auftreten und damit eine möglicherweise fehlerhafte Genmodifikation im Mausgenom unwahrscheinlich. Gleichzeitig ist die Sequenz aber klein genug, um die natürliche Genexpression chromosomaler DNA nicht zu beeinflussen [185]. In der zweiten transgenen Maus wird Cre unter Kontrolle eines Promotors, der im Zielgewebe aktiv ist, exprimiert. Bei Kreuzung beider transgenen Mauslinien resultieren Cre/loxP-Mäuse, in denen die Cre-Rekombinase in einem spezifischen Zelltyp aktiv ist und das gefloxt Zielgen modifiziert (Abb. 3). Weltweit nimmt die Anzahl der unterschiedlichen Cre-Mauslinien zu, was die Erforschung von bestimmten Genen in immer mehr

Zelltypen im lebenden Organismus erlaubt. Neben der Bildung gewebespezifischer Mutationen kann mithilfe des Cre/loxP-Systems eine Mutation ebenfalls zu einem gewünschten Zeitpunkt aktiviert werden. Durch Fusion der kodierenden Regionen von Cre mit einem bestimmten Steroidrezeptor entsteht ein Fusionsprotein, das erst durch die Applikation von synthetischen Steroiden aktiviert wird und damit die Rekombination steuert [185, 187].

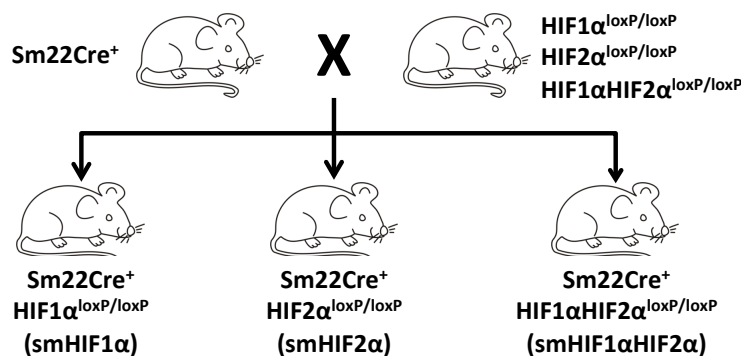
### 3.2.2 Glattmuskelzellspezifische HIF-Knockout-Mäuse

Die glattmuskelzellspezifischen HIF-KO-Mäuse, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, gingen aus Verpaarungen von zwei transgenen Mauslinien hervor: eine mit gefloxtem HIF-Gen (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  oder HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$ ) und eine mit Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des glattmuskelzellspezifischen Promotors sm22-alpha (smooth muscle protein 22-alpha) (Abb. 3A). Dieser Promotor steuert normalerweise die Expression des glattmuskulären Proteins sm22 und ist in glatten Muskelzellen von Arterien aktiv, während er in glatten Muskelzellen von Venen oder viszerale Organen keine Aktivität zeigt [188]. Aus den Verpaarungen von gefloxten und Cre-Mäusen resultierten die glattmuskelzellspezifischen Gen-KO-Mauslinien smHIF1 $\alpha$ , smHIF2 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  (Abb. 3B). Die eingesetzten transgenen Mauslinien waren kommerziell bei The Jackson Laboratory (USA) erhältlich (Tg(Tagln-cre)<sup>1Her</sup>; Hif1a<sup>tm3Rsjo</sup>; Epas1<sup>tm1Mcs</sup>). Genetisch entstammen die verwendeten transgenen Mauslinien den Stämme C57BL/6 und 129/SvJ. Die Generierung der gewebespezifischen KO-Mäuse erfolgte durch Eigenzucht in der Maushaltung am Deutschen Herzzentrum München. Um den Knockout von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in glatten Muskelzellen zu verifizieren, erfolgten Vorversuche in unserem Labor mit primären Zellkulturen glatter Muskelzellen der KO-Mauslinien smHIF1 $\alpha$  und smHIF2 $\alpha$ . Dabei wurde das Fehlen von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  immunhistochemisch bestätigt. Als Kontrollen wurden bei unseren Experimenten Cre-negative Tiere derselben Mauslinie verwendet.

[A]



[B]



**Abb. 3: Generierung glattmuskelspezifischer HIF-Knockout-Mäuse.**

[A] Exzision von HIF mithilfe der Cre-Rekombinase. Ein gewebespezifischer Promotor (sm22 für glatte Muskelzellen) kontrolliert die Expression von Cre. Bei Verpaarung der transgenen Mauslinien exzidiert Cre die gefloخته DNA-Sequenz in dem gewünschten Zelltyp. Abb. modifiziert nach Branda et al., 2004. [B] Aus den Verpaarungen von Mäusen mit Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Promotors sm22 und Mäusen mit gefloxtem HIF $\alpha$ -Gen resultieren die Mauslinien smHIF1 $\alpha$ , smHIF2 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ .

Für unsere Experimente wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet, da sich zwischen den Geschlechtern kein relevanter Unterschied in PVR, PH und RVH nach chronischer Hypoxie gezeigt hat. Als Kontrollen wurden Cre-negative Wurfgeschwister verwendet. Je nach Mauslinie, ist bei diesen Mäusen HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  oder HIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  von zwei loxP-Sequenzen flankiert. Zur Überprüfung von möglichen Differenzen zwischen den drei Cre-

negativen Kontrollmauslinien wurden die Kontrollmäuse miteinander verglichen. Dabei zeigte sich sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie kein relevanter Unterschied bzgl. Körpergewicht, Hämatokrit, PVR, kardialer Druckwerte, rechtsventrikulärer Funktion und RVH (Abb. 19, Kapitel 7.1). Da sich die Cre-negativen Kontrollmäuse auch trotz unterschiedlichem genetischen Background nicht voneinander unterscheiden, wurden in den folgenden Daten die Kontrollmäuse in eine Kontrollgruppe zusammengefasst. Streng genommen handelt es sich bei diesen Kontrollen nicht um Wildtyp-Mäuse, das Einfügen der kurzen loxP-Sequenzen stellt eine genetische Modifizierung dar. Da eine Beeinflussung des Phänotyps durch loxP jedoch sehr unwahrscheinlich ist [185], sich die Kontrollmauslinien nicht voneinander unterscheiden (Abb. 19) und dem beschriebenen Phänotyp von Wildtyp-Mäusen entsprechen, wurden die verwendeten Kontrollmäuse im Folgenden als Wildtyp bezeichnet.

### **3.3 Methoden**

#### **3.3.1 DNA-Isolation aus Mausgewebe und Messung der DNA-Konzentration**

Nach Ohrlochung der Mäuse wurden die Ohrstanzen entnommen und in 500µl Lysis-Puffer und 15µl Proteinkinase K (20mg/ml) für 12 Stunden bei 56°C in einem Thermomixer inkubiert. Sobald das Gewebe aufgelöst war, wurde zum Lysat 250µl gesättigte 5M NaCl-Lösung dazugegeben, gut geschüttelt und 15 Minuten bei Raumtemperatur und 13000rpm zentrifugiert. 600µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß gegeben und mit 400µl Isopropanol gemischt. In diesem Stadium war präzipitierte DNA zu sehen, die dann 15 Minuten bei Raumtemperatur und 13000rpm abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entfernt und 600µl 70%iges Ethanol hinzugegeben. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 13000rpm wurde der Überstand erneut entfernt und das DNA-Pellet 40 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde die DNA in 50µl 0,1x TE-Puffer bei 37°C 10 Minuten im Thermomixer gelöst und bei -20°C gelagert. Die gewonnenen DNA-Proben wurden mithilfe des NanoDrop quantitativ und qualitativ überprüft. Wir erreichten in der Regel Konzentrationen zwischen 150

und 400ng/μl, was auf eine für die Polymerase-Kettenreaktion ausreichende DNA-Konzentration schließen lässt. Um einen hohen Reinheitsgrad der DNA zu verifizieren, wurde das Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei 260 und 280nm gemessen. Dabei deuteten Werte zwischen 1,8 und 2,0 auf einen hohen Reinheitsgrad der isolierten DNA.

### 3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter Gensequenzen. Mithilfe dieser Methode wurde die aus Mausgewebe isolierte DNA zur Genotypisierung der Versuchstiere auf bestimmte Genloci überprüft. Die PCR-Reaktionsansätze wurden vorbereitet und mit der DNA-Probe in ein PCR-Gefäß pipettiert. 2μl DNA wurden in 23μl PCR-Reaktionsansatz gegeben, was ein Reaktionsvolumen von 25μl ergab.

PCR-Reaktionsansätze:

HIF1α-flox-PCR: 18,5μl dH<sub>2</sub>O, 2,5μl PCR-Puffer, 0,25μl 10mM dNTP's, 0,5μl DMSO, 0,5μl MgCl<sub>2</sub>, 0,25μl 5U/μl Taq-Polymerase, jeweils 0,25μl der Primer  
HIF2α-flox-PCR: 18,5μl dH<sub>2</sub>O, 2,5μl PCR-Puffer, 0,25μl 10mM dNTP's, 0,5μl DMSO, 0,5μl MgCl<sub>2</sub>, 0,25μl 5U/μl Taq-Polymerase, jeweils 0,25μl der Primer  
Cre-PCR: 18,5μl dH<sub>2</sub>O, 2,5μl PCR-Puffer, 0,25μl 10mM dNTP's, 0,5μl DMSO, 0,5μl MgCl<sub>2</sub>, 0,25μl 5U/μl Taq-Polymerase, jeweils 0,25μl der Primer

Bis zum Start der PCR wurden die Proben auf Eis gelagert. Um das Vorhandensein des Cre-Gens, das für die Cre-Rekombinase kodiert, in Maus-DNA zu überprüfen, wurden die Oligonukleotide sm22-Cre800 und sm22-Cre1200 als Primer verwendet. Zur Detektion der geflochtenen Gene HIF1α und HIF2α wurden die Primer HIF1α-F2, HIF1α-Rev, HIF2α-F und HIF2α-R verwendet. Um Verunreinigungen der Proben zu erkennen, wurden Kontrollen ohne DNA erstellt. Die Reaktionsspezifischen Konditionen des für Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation wurden in einem Thermozykler programmiert und die PCR gestartet.

PCR-Programme:

HIF1 $\alpha$ -gefloxt: Denaturierung bei 94° (5min); 35 PCR Zyklen mit Denaturierung bei 94°C (30s), Primerhybridisierung bei 55°C (30s) und Elongation bei 72°C (45s); Polymerisation bei 72°C (4min); Inkubation bei 4°C.

HIF2 $\alpha$ -gefloxt: Denaturierung bei 94° (5min); 35 PCR Zyklen mit Denaturierung bei 94°C (30s), Primerhybridisierung bei 67°C (60s) und Elongation bei 72°C (60s); Polymerisation bei 72°C (4min); Inkubation bei 4°C.

Cre-Rekombinase: Denaturierung bei 94° (5min); 35 PCR Zyklen mit Denaturierung bei 94°C (30s), Primerhybridisierung bei 65°C (30s) und Elongation bei 72°C (45s); Polymerisation bei 72°C (4min); Inkubation bei 4°C.

### **3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine biochemische Methode, bei der Nukleinsäuren nach ihrer Größe getrennt werden können. Je nach Größe der negativ geladenen DNA-Stränge wandern diese mit unterschiedlicher Geschwindigkeit entlang eines elektrischen Feldes. Das Agarosegel hat dabei die Funktion eines Siebes, der größere Moleküle stärker zurückhält. Zur optimalen Auftrennung wurden 1-2%ige Agarosegele hergestellt. Das Agarosepulver wurde mit 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle erwärmt, bis das Pulver vollständig aufgelöst war und eine klare Lösung resultierte. Nach kurzem Abkühlen wurde der Interkalator Ethidium-Bromid (0,5 $\mu$ g/ml) dazu gegeben und vermischt. Der Ansatz wurde in einen Gelschlitten zum Erkalten gegeben und ein Kamm mit Taschen eingesetzt. Nach 60 Minuten wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1x TAE-Puffer übergossen. Nun wurden 20 $\mu$ l der amplifizierten DNA-Proben und ein 100-Basenpaar-DNA-Marker in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die 60-minütige Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei Raumtemperatur und einer Spannung von 90 Volt. Die Gele wurden dann unter UV-Licht mittels Transilluminator analysiert und die Größe in Bezug zum DNA-Marker bestimmt. Unter UV-Licht wird die Fluoreszenz von Ethidium-Bromid stark erhöht, das Agarosegel leuchtet an den Stellen hell auf, an denen sich Nukleinsäuren befinden. Mit einer an den UV-

Transilluminator verbundenen Kamera wurden Bilder des Gels angefertigt und ausgewertet.

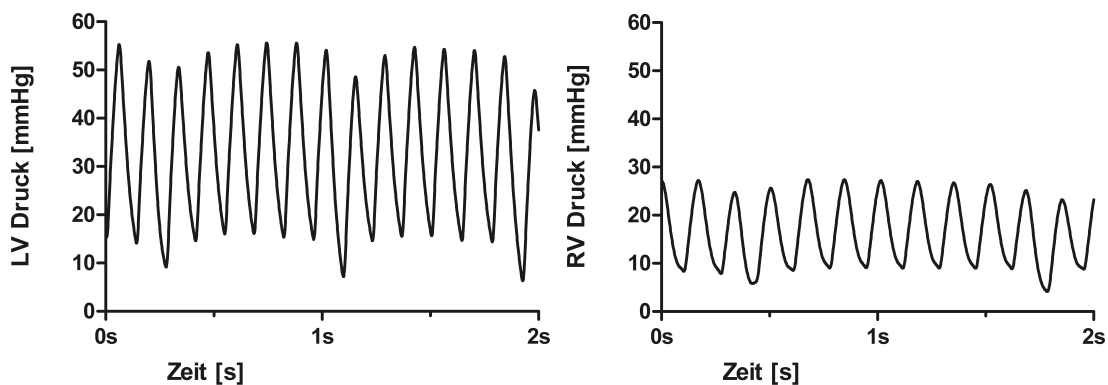
### **3.3.4 Hypoxieexperiment**

Die Versuchstiere wurden im Alter von 5 Wochen genotypisiert, mit 8 Wochen zufällig in Normoxie- oder Hypoxiegruppe eingeteilt und nach weiteren 3 Wochen Normoxie oder Hypoxie im Alter von 11 Wochen hämodynamisch untersucht. Die Gruppe der hypoxischen Mäuse wurde nach Messung des Körpergewichts für insgesamt 3 Wochen in einer Plexiglaskammer bei 10% Luftsauerstoff gehalten. Durch eine hermetische Konstruktion der Kammern fand kein Austausch zwischen Kammer- und Raumluft statt. Sauerstoffkonzentration, Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden kontinuierlich überwacht. Die Sauerstoffkonzentration wurden bei 10,0-10,3% Luftsauerstoff, und die Luftfeuchtigkeit bei 75-80% konstant gehalten. Mithilfe von Atemkalk wurde die Kammerluft von CO<sub>2</sub> gereinigt. Vigilanz, Aussehen und Verhalten der Mäuse wurden mehrmals täglich kontrolliert. Einmal wöchentlich wurde die Kammer kurze Zeit geöffnet, um die Käfige zu reinigen, das Futter zu erneuern und das Körpergewicht der Mäuse zu bestimmen. Bedingungen, bei denen das Hypoxieexperiment aus Tierschutzgründen abgebrochen werden musste, wie starke Gewichtsabnahme, Bewegungseinschränkungen, Blutungen oder schwere Automutilationen, sind bei den in dieser Arbeit eingesetzten Mäusen nicht aufgetreten. Sowohl in der Hypoxie- als auch Normoxiegruppe wurden die Versuchstiere im Alter von 11 Wochen hämodynamisch untersucht.

### **3.3.5 Hämodynamische Messung**

Die hämodynamischen Messungen wurden nach 3 Wochen Normoxie oder Hypoxie bei Mäusen im Alter von 11 Wochen durchgeführt. Die Versuchstiere im Hypoxieexperiment wurden 60 Minuten vor der Messung in eine normoxische Umgebung gebracht, um sich zu adaptieren und einen Hypoxie-assoziierten akut-vasokonstriktorischen Effekt der Pulmonalgefäße auszuschließen. Vor der Narkoseeinleitung wurde das Körpergewicht der

Mäuse bestimmt. Die Isofluran-Narkose wurde in einer Kammer mit 4L/min O<sub>2</sub>-Fluss und 4% Isoflurangas eingeleitet. Aufrechterhalten wurde die Narkose mithilfe einer Narkose-Atemmaske bei einem O<sub>2</sub>-Fluss von 2L/min und 2,0-2,5% Isoflurangas. Die Mäuse wurden auf einer Wärmematte bei 37°C auf dem Rücken platziert und am linken Thoraxrand etwas gesichert und desinfiziert. Die Überprüfung der Narkose erfolgte engmaschig durch Kontrolle der Vitalparameter und verschiedener Reflexe, wie dem Zwischenzehenreflex. Nach Inspektion und Palpation des Herzspitzenstoßes, wurde die linke Herzkammer transthorakal mit einer an einen Druck-Messfühler angeschlossenen 24G Kanüle (BD Microlance) von links-lateral punktiert. Die Punktion erfolgte auf einer nahezu horizontalen Linie. Durch transeptale Punktion nach medial/rechts-lateral konnten neben den linksventrikulären auch die rechtsventrikulären Druckwerte aufgezeichnet werden. Die Herzfrequenz sowie die links- und rechtsventrikulären Drücke wurden mithilfe der Haemodyn-Software auf einem Graphen am Monitor dargestellt und für mindestens 10 Herzaktionen pro Ventrikel aufgezeichnet. Die Messdaten wurden mit einer Genauigkeit von 1000 Messwerten pro Sekunde registriert.



**Abb. 4: Beispielhafte Darstellung der links- und rechtsventrikulären Druckwerte.**

Aufzeichnung der links- (LV) und rechtsventrikulären (RV) Druckwerte mithilfe eines Druck-Messwandlers nach transthorakaler Punktion. Messung in mmHg, graphische Darstellung mit der Haemodyn-Software (Harvard Apparatus), Messgenauigkeit 1000 Messwerte/ Sekunde.



Um eine hämodynamische Entgleisung der Maus und damit auch eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, wurde nur einmalig punktiert. Nach erfolgter Messung wurden die Versuchstiere noch während der Narkose rasch mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Die Punktionsstellen an beiden Ventrikeln wurden post mortem untersucht und verifiziert. Ausgewertet wurden die Druckwerte der jeweils ersten 10 Herzaktionen nach ventrikulärer Punktion. Bei jeder Herzaktion wurden dabei Kurvenmaximum und -minimum ermittelt. Aus den Mittelwerten von 10 Herzaktionen ergaben sich die systolischen und diastolischen Druckwerte der jeweiligen Versuchstiere. Die experimentelle Durchführung der hämodynamischen Messungen erfolgte in Anlehnung an bereits beschriebene Techniken [189].

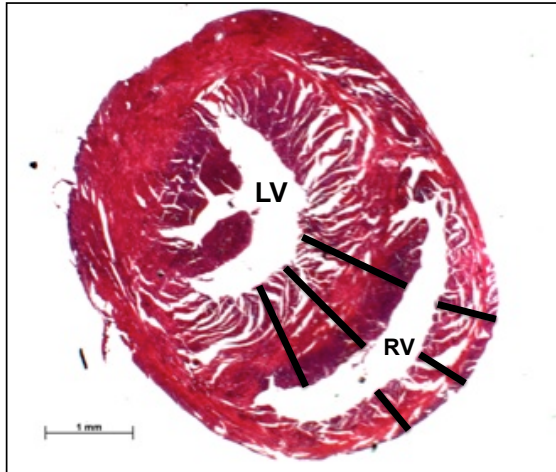
### **3.3.6 Organentnahme und Verarbeitung der Gewebeproben**

Zur Erstellung eines kleinen Blutbildes wurde post mortem der Thorax rasch eröffnet und EDTA-Blut durch kardiale Punktion entnommen. Die laborchemische Auswertung erfolgte im Institut für Laboratoriumsmedizin am Deutschen Herzzentrum München. Bei der anschließenden Präparation der Versuchstiere wurden Thorax und Abdomen vollständig eröffnet. Durch einen kleinen Einschnitt des rechten Leberlappens konnte die Druckbelastung beim darauffolgenden intrakardialen Spülen des Körperkreislaufs mit PBS verringert werden. Bei Verwendung des Lungengewebes für die Histologie wurde zusätzlich die Trachea kanüliert und das Lungengewebe mit 4%igem Formalin gespült. Die für die Histologie entnommenen Organe wurden in frisch zubereitetem 4%igem Formalin für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Gewebeproben wurden dann in 70%iges Ethanol überführt und nach einer automatisierten Gewebeerwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit Paraffin ausgegossen und bei 4°C gelagert. Die Mäuseherzen wurde entweder ebenfalls für die histologische Weiterverarbeitung in 4%igem Formalin fixiert oder für die Bestimmung des Herzgewichtes verwendet und bei -80°C eingefroren. Dabei wurde der rechte vom linken Ventrikel inklusive Septum getrennt und das Gewebe gesäubert, sodass keine Blutreste mehr vorhanden waren. Sowohl rechter als auch linker

Vorhof wurden entfernt und das Ventrikelgewicht mithilfe einer Feinwaage bestimmt. Für nachfolgende Experimente wurden weitere Organe und Gewebe der Versuchstiere entnommen, in PBS gereinigt, in flüssigem Stickstoff unmittelbar tiefgefroren und später bei -80°C gelagert.

### **3.3.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) ist eine weit verbreitete Übersichtsfärbung. Für die HE-Färbung muriner Herzen und Lungen wurden mit einem Microtom 4µm dicke, horizontale Gewebeschnitte angefertigt, nachdem die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte bei -15°C gekühlt wurden. Nach Glättung der Schnitte in einem 40°C warmen, vollentsalzten Wasserbad, wurden die Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet und schließlich bei Raumtemperatur gelagert. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte 30 Minuten bei 60°C inkubiert und dann in Bädern von 100% Xylol (2 x 5 Minuten), 100% Ethanol (2 x 3 Minuten), 96% Ethanol (2 x 3 Minuten), 70% Ethanol (1 x 3 Minuten) und destilliertem Wasser (2 x 3 Minuten) rehydriert. Die Schnitte wurden 15 Minuten in Hämalaun-Lösung nach Mayer inkubiert und mit destilliertem Wasser gespült. Nach dem 10-minütigen Bläuen in lauwarmem Leitungswasser und erneutem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit wässriger Eosin G-Lösung (0,5% Eosin + 1 Tropfen Essigsäure pro 100ml Lösung) für 4 Minuten. Die Schnitte wurden nach erfolgter Färbung mit destilliertem Wasser gespült, zur Dehydrierung in 70% Ethanol (1 x 5 Minuten), 96% Ethanol (2 x 5 Minuten), 100% Ethanol (2 x 5 Minuten), 100% Xylol (2 x 2 Minuten) inkubiert und mit Entellan eingedeckt.



**Abb. 5: Beispielhafte Darstellung einer Herzmuskelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin.**

Der horizontale Schnitt durch den linken (LV) und rechten (RV) Ventrikel ermöglicht die Ausmessung der links- und rechtsventrikulären Muskelschicht. Zur Bestimmung der rechts- und linksventrikulären Dicke wurde die muskuläre Schicht an drei Stellen des Ventrikels bzw. Septums vermessen (schwarze Balken). Zur Auswertung wurde der Mittelwert der drei Messungen herangezogen.

### **3.3.8 Elastika-van-Gieson-Färbung**

Die Elastika van Gieson Färbung ist eine histologische Färbung zur Darstellung elastischer Fasern. Für die Färbung wurden 4µm dicke Paraffinschnitte muriner Lungen verwendet. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte 30 Minuten bei 60°C inkubiert und anschließend in Bädern von 100% Xylol (2 x 5 Minuten), 100% Ethanol (2 x 3 Minuten), 96% Ethanol (2 x 3 Minuten), 70% Ethanol (1 x 3 Minuten) und destilliertem Wasser (2 x 3 Minuten) rehydriert. Dann wurde das Gewebe 20 Minuten mit einer Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert (Carl Roth) gefärbt und unter fließendem Leitungswasser gespült. Nach einer Differenzierung mit 70% Ethanol für 30 Sekunden wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert für 3 Minuten. Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser und Bläuen unter Leitungswasser wurde für 3 Minuten mit Van-Gieson-Lösung (Pirkofuchsin) gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 1 Minute 96% Ethanol, 2 x 2 Minuten 100% Ethanol, 2 x 3 Minuten Xylol) rehydriert und mit Entellan eingedeckt. Bei der

Elastika van Gieson Färbung erscheinen die Zellkerne im Lichtmikroskop dunkelbraun, das Zytoplasma hellbraun/beige, Kollagen rosa und elastische Fasern dunkelviolett/schwarz.

### **3.3.9 Pikro-Siriusrot Färbung**

Die Pikro-Siriusrot Färbung ist eine histologische Methode zur Färbung von Kollagen in Geweben. Für die Färbung wurden Paraffinschnitte muriner Lungen und Herzen mit einer Dicke von 4µm verwendet. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte zunächst 30 Minuten bei 60°C inkubiert und anschließend in Bädern von 100% Xylol (2 x 5 Minuten), 100% Ethanol (2 x 3 Minuten), 96% Ethanol (2 x 3 Minuten), 70% Ethanol (1 x 3 Minuten) und destilliertem Wasser (2 x 3 Minuten) rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte für 60 Minuten in Pikro-Siriusrot-Lösung (Sigma) gefärbt und 2 Minuten in 0,01M Salzsäure differenziert. Nach dem Spülen der Schnitte in vollentsalztem Wasser wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 1 Minute 96% Ethanol, 2 x 2 Minuten 100% Ethanol, 2 x 3 Minuten Xylol) rehydriert und mit Entellan eingedeckt. Lichtmikroskopisch erscheint bei der Pikro-Siriusrot-Färbung Kollagen rot und das Zytoplasma blass gelb/rosa.

### **3.3.10 Immunhistochemie**

Um spezifische Proteine in Gewebeschnitten zu detektieren, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem primären Antikörper gegen das  $\alpha$ -Actin von glatten Muskelzellen durchgeführt. Da es sich bei dem verwendeten primären Antikörper gegen  $\alpha$ -smooth-muscle-actin um einen murinen Antikörper handelt, wurde das VECTOR Mouse on Mouse Immunodetection Kit verwendet. Für immunhistochemische Färbungen wurden Dünnschnitte muriner Lungen mit einer Schichtdicke von 4µm verwendet, welche zunächst für 30 Minuten bei 60°C inkubiert wurden. Die Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte mit Bädern von 100% Xylol (2 x 5 Minuten), 100% Ethanol (2 x 3 Minuten), 96% Ethanol (2 x 3 Minuten), 70% Ethanol (1 x 3 Minuten) und destilliertem Wasser (2 x 3 Minuten). Zur Antigendemaskierung wurden die

Proben in Tris-EDTA-Puffer gegeben und für 30 Minuten in einem Dampfgerät erhitzt. Nach 20-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte 3 x 2 Minuten mit PBS gewaschen. Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren, wurden die Proben 10 Minuten in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in PBS) gegeben und erneut in PBS gewaschen. Zur Blockierung der freien Bindungsstellen in den Gewebeproben wurde für 20 Minuten mit 3% BSA (in PBS) und für 60 Minuten mit dem M.O.M. Mouse Ig Blocking Reagent inkubiert. Nach 2 x 2 Minuten Waschen in PBS erfolgte die Inkubation der Proben in M.O.M. Diluent für 5 Minuten. Danach wurden die Proben für 30 Minuten mit dem primären Antikörper gegen  $\alpha$ -smooth-muscle-actin (Verdünnung 1:100 in M.O.M. Diluent) in einer feuchten Kammer inkubiert. Pro Schnitt wurden dabei ca. 100 $\mu$ l auf den Objektträger aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mit M.O.M. Diluent ohne primären Antikörper inkubiert. Nach 2 x 2 Minuten Waschen in PBS erfolgte die Inkubation der Proben mit dem sekundären Antikörper, M.O.M. Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent, für insgesamt 10 Minuten und nach erneutem Waschen mit VECTASTAIN ABC Reagent für 5 Minuten. Nach 2 x 5 Minuten Waschen in PBS wurden die Proben schließlich zum 5-minütigen Färben mit dem Peroxidase-Substrat Diaminobenzidin (DAB+ Chromogen mit Substrat-Puffer, DAKO) bedeckt. Es resultierte ein kontrastreiches braunes Endprodukt am Ort des Zielantigens. Nach dem Waschen in destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun Lösung für 30 Sekunden und das anschließende Bläuen in Leitungswasser für 5 Minuten. Zur Dehydrierung wurden die Proben in 70% Ethanol (1 x 5 Minuten), 96% Ethanol (2 x 5 Minuten), 100% Ethanol (2 x 5 Minuten), 100% Xylol (2 x 2 Minuten) gegeben und schließlich mit Entellan eingedeckt. Die Bilder der immunhistochemischen Färbungen wurden schließlich mit einem Lichtmikroskop und der Software AxioVision Imaging (Zeiss) aufgenommen. Zur Quantifizierung wurden die  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäße mit einem 10x-Objektiv dargestellt und pro Lunge 4 Bildausschnitten (865 x 685 $\mu$ m) angefertigt. In diesen Bildausschnitten wurden alle immunreaktiven Gefäße ausgemessen und quantitativ erfasst. Pro Versuchsgruppe wurden vier Lungen gefärbt und ausgewertet.

### 3.3.11 Wheat Germ Agglutinin - Färbung

Wheat Germ Agglutinin (WGA) ist ein Lektin, das Oberflächenmoleküle an Zellmembranen bindet. In Kombination mit einem fluoreszierenden Farbstoff wird die WGA-Färbung zur Visualisierung von Zellmembranen durchgeführt. In dieser Arbeit wurde murines Herzmuskelgewebe des rechten Ventrikels gefärbt, um den mittleren Durchmesser der rechtsventrikulären Kardiomyozyten zu bestimmen. Es wurden 4µm dicke Transversalschnitte der Herzen erstellt, in Paraffin eingebettet, im Wasserbad bei 40°C geglättet, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Nach Inkubation von 30 Minuten bei 60°C wurden die Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und 2 x 3 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Es folgte eine 60-minütige Inkubation mit dem Permeabilisierungspuffer und das Waschen der Proben mit PBS-Triton-Puffer (3 x 2 Minuten). Zum Blockieren nicht-spezifischer Bindungsstellen wurden die Proben 60 Minuten mit der Blockierungslösung inkubiert. Das Färben erfolgte im Dunkeln mit der WGA-Färbelösung (10µg/ml, in Blockierungslösung) für 60 Minuten bei 37°C. Die Proben wurden erneut mit PBS-Triton-Puffer (3 x 2 Minuten) gewaschen und zur Färbung der Zellkerne eine Minute mit Hoechst (1:10.000 in PBS) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (3 x 2 Minuten) wurden die Gewebeschnitte schließlich mit Fluoreszenz-Eindeckmedium eingedeckt. Pro Herz wurden vier Aufnahmen rechtsventrikulärer, longitudinal-angeschnittener Kardiomyozyten mit einem 40x-Objektiv angefertigt. In jeder Aufnahme wurde der maximale Durchmesser von 10 Kardiomyozyten bestimmt. Somit erfolgte die Messung von 40 Einzelwerten pro Herz. Pro Versuchsgruppe wurden vier Herzen gefärbt und analysiert.

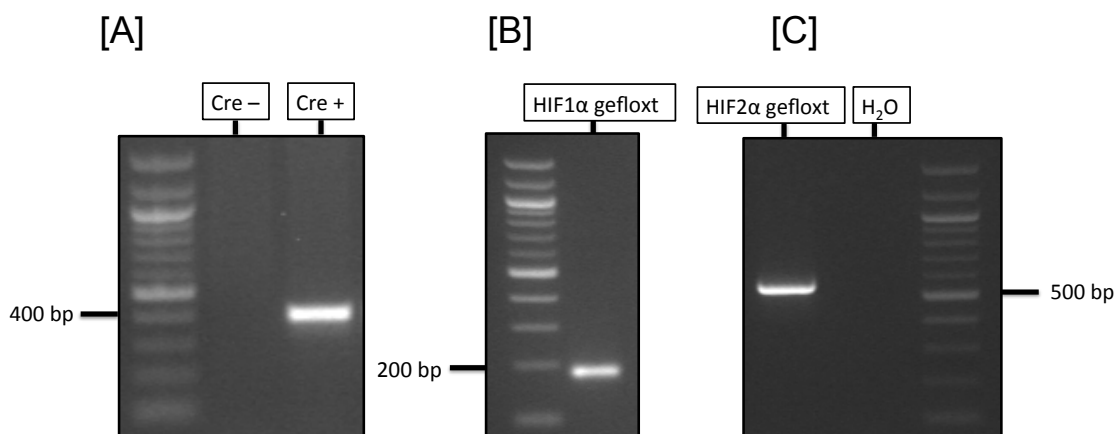
### **3.3.12 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) von n Experimenten angegeben. Die statistische Analyse der Daten zwischen zwei Gruppen wurde mit dem t-Test durchgeführt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde ein Ergebnis als statistisch signifikant angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Genotypisierung und phänotypische Merkmale

Bei jeder in unsere Studie eingeschlossenen Maus wurde zunächst DNA aus Mausgewebe gewonnen und quantitativ sowie qualitativ überprüft. Mithilfe einer PCR wurde die gewonnene DNA anschließend amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bei smHIF1 $\alpha$ -, smHIF2 $\alpha$ - und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Mäusen, die das Gen für die Cre-Rekombinase besitzen, zeigte sich in der Gelelektrophorese nach der entsprechenden PCR eine DNA-Bande bei einer Größe von ca. 400 Basenpaaren (Abb. 6A). Bei homozygot geflochten HIF1 $\alpha$ -Mäusen erschien eine Bande bei ca. 200 Basenpaaren (Abb. 6B) und bei homozygot geflochten HIF2 $\alpha$ -Mäusen bei ca. 500 Basenpaaren (Abb. 6C). Die DNA heterozygot gefloxter HIF1 $\alpha$ - oder HIF2 $\alpha$ -Mäuse zeigte in der Gelelektrophorese zwei Banden bei ca. 200 und 250 (HIF1 $\alpha$ ) bzw. 460 und 500 (HIF2 $\alpha$ ) Basenpaaren. Bei jeder PCR erfolgte eine Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O.



**Abb. 6: Beispiel für die Genotypisierung der glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -Mauslinien.**

[A] Die Abbildung zeigt beispielhaft ein Cre-negatives und Cre-positives Ergebnis. Bei Vorhandensein der Cre-Rekombinase im Genom der Mauslinien smHIF1 $\alpha$ , smHIF2 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  zeigte sich nach Cre-PCR-Protokoll in der Gelelektrophorese eine Bande bei einer Größe von ca. 400 Basenpaaren. [B] Nachweis des homozygot geflochten HIF1 $\alpha$ -Gens mit einer Bande bei ca. 200 Basenpaaren. [C] Nachweis des homozygot geflochten HIF2 $\alpha$ -Gens mit einer Bande bei ca. 500 Basenpaaren.



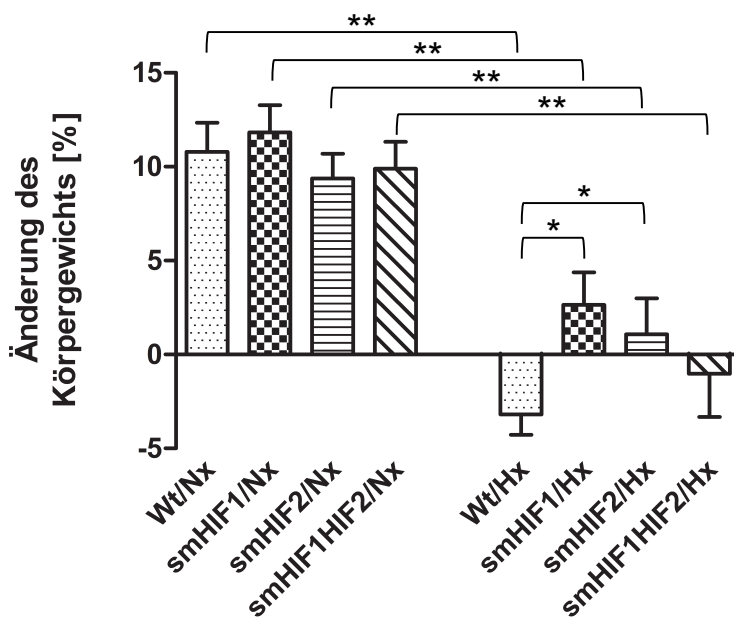
Aus der Verpaarung einer Cre-negativen Maus mit einer Cre-positiven Maus, bei der ein Allel das Cre-Gen aufweist, resultieren in Theorie gleich viele Cre-positive wie Cre-negative Nachkommen [190]. Dies entspricht einem autosomal-dominanten Erbgang, bei dem die Wahrscheinlichkeit der Vererbung des Allels, welches das Cre-Gen enthält, bei 50% liegt. Unsere Beobachtungen bei den Verpaarungen der Versuchstiere bestätigen das. Es gingen im Mittel ebenso viele Cre-positive, also glattmuskelspezifische HIF-KO-Mäuse hervor, wie Cre-negative Kontrollmäuse. Bis auf das Vorhandensein des Cre-Gens in einem Allel besitzen die Cre-negativen und Cre-positiven Wurfgeschwister einer Mauslinie einen nahezu identischen genetischen Hintergrund. Alle glattmuskelspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mauslinien waren überlebensfähig, fertil, hatten eine normale Größe und zeigten keine Hinweise auf körperliche oder organische Abnormalitäten. In Aussehen, Fressverhalten, Gewichtszunahme und körperlicher Entwicklung waren keine Unterschiede zwischen Knockout- und Kontrollmäusen zu erkennen.

## **4.2 Adaptation an chronische Hypoxie**

### **4.2.1 Gewichtsverlauf und Verhalten**

Da chronische Hypoxie mit einem Gewichtsverlust einhergehen kann, wurde zunächst untersucht, welche Auswirkungen eine solche Exposition auf Wildtyp-Mäuse und glattmuskelspezifische HIF $\alpha$ -KO-Mäuse (smHIF1 $\alpha$ , smHIF2 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ ) hat. Wildtyp- und smHIF $\alpha$ -KO-Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen für 3 Wochen einer normobaren Hypoxie (10% O<sub>2</sub>) ausgesetzt. Vor und nach der Hypoxieexposition wurde das Körpergewicht bestimmt. Ebenfalls wurde das Gewicht der Mäuse unter Normoxie mit 8 Wochen und 3 Wochen später bestimmt. Unter normoxischen Bedingungen erhöhte sich das Körpergewicht von Wildtyp- und HIF $\alpha$ -KO-Mäusen innerhalb von 3 Wochen um ca. 10%, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen (Abb. 7). Nach 3 Wochen Hypoxie zeigte sich dagegen bei Wildtyp-Mäusen eine Gewichtsreduktion von  $3,2 \pm 1,1\%$  (Abb. 7). Mäuse der Linien smHIF1 $\alpha$  und smHIF2 $\alpha$  nahmen unter hypoxischen Bedingungen um  $2,6 \pm 1,7\%$  bzw.  $1,1 \pm 1,9\%$  zu und unterschieden sich somit

signifikant von Wildtyp-Mäusen. Die Mäuse der Linie smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  verloren nach 3 Wochen Hypoxie im Mittel  $1,0 \pm 2,3\%$  an Gewicht und unterschieden sich damit weder signifikant von Wildtyp-, noch von smHIF1 $\alpha$ -KO- oder smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen (Abb. 7). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mauslinien smHIF1 $\alpha$  und smHIF2 $\alpha$  nach Hypoxie im Mittel an Gewicht zunehmen, und sich somit signifikant von Wildtyp-Mäusen unterscheiden. Die glattmuskelzellspezifischen HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -KO-Mauslinien tolerierten also möglicherweise eine Exposition mit chronischer Hypoxie besser als Wildtyp-Mäuse. Die smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Mäuse verloren minimal an Gewicht und unterschieden sich damit weder signifikant von HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -Mäusen, noch von Wildtyp-Mäusen. Möglicherweise tolerierten sie daher chronische Hypoxie weniger gut als HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse.

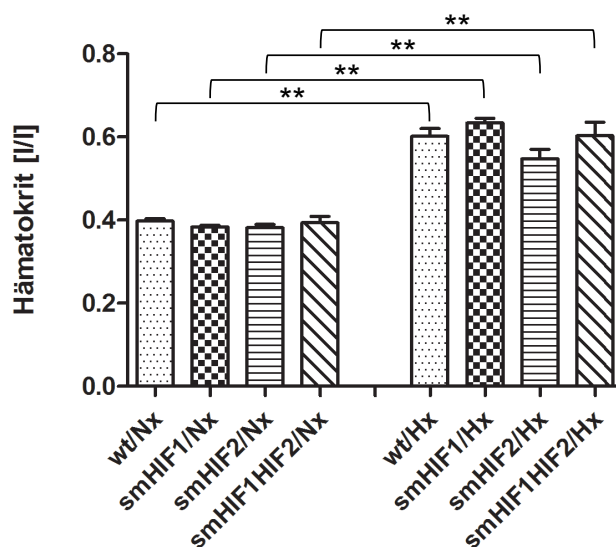


**Abb. 7: Änderung des Körpergewichts unter Normoxie und Hypoxie.**

Wildtyp- sowie glattmuskelzellspezifische HIF $\alpha$ -KO-Mäuse wurden ab einem Alter von 8 Wochen für 3 Wochen unter 10% Sauerstoff in einer isobarischen Hypoxiekammer oder unter Normoxie gehalten. Die Abbildung zeigt die Körpergewichtsänderung nach 3 Wochen in Prozent. Wt/Nx: n=10, smHIF1/Nx: n=7, smHIF2/Nx: n=12, smHIF1HIF2/Nx: n=6, Wt/Hx: n=32, smHIF1/Hx: n=8, smHIF2/Hx: n=12, smHIF1HIF2/Hx: n=14. Verglichen wurden die Normoxie- vs. Hypoxiegruppen derselben Mauslinie sowie die verschiedenen smHIF-KO-Mauslinien vs. Wildtyp unter Normoxie bzw. Hypoxie, \*\*p<0.01 vs. Hypoxie (Hx), \*p<0.05 vs. Wildtyp (Wt), Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 4.2.2 Veränderungen im Blutbild

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob chronische Hypoxie Auswirkungen auf das Blutbild von Wildtyp- und smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen hat. Der Hämatokrit von Wildtyp-Mäusen war nach 3 Wochen Hypoxie mit  $60,18 \pm 1,86\%$  im Vergleich zu  $39,74 \pm 0,66\%$  unter normoxischen Bedingungen signifikant erhöht (Abb. 8). Die smHIF $\alpha$ -KO-Mauslinien zeigten ebenfalls einen signifikant erhöhten Hämatokrit nach Hypoxieexposition. Zwischen Wildtyp-Mäusen und smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen fand sich sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie kein signifikanter Unterschied (Abb. 8).



**Abb. 8: Hämatokritanstieg nach 3 Wochen Hypoxie.**

Die Abbildung zeigt die Hämatokritwerte bei 11 Wochen alten Mäusen unter Normoxie (Nx) und nach 3 Wochen Hypoxie (Hx). Durch eine kardiale Punktion wurde EDTA-Blut entnommen und der Hämatokrit mittels Hämatologieanalyzer bestimmt. Die Abbildung zeigte die Hämatokritwerte in Liter pro Liter (l/l). Wt/Nx: n=12, smHIF1/Nx: n=5, smHIF2/Nx: n=10, smHIF1HIF2/Nx: n=2, Wt/Hx: n=13, smHIF1/Hx: n=6, smHIF2/Hx: n=7, smHIF1HIF2/Hx: n=4. Verglichen wurden die Normoxie- vs. Hypoxiegruppen derselben Mauslinie sowie die verschiedene smHIF-KO-Mauslinien vs. Wildtyp unter Normoxie bzw. Hypoxie, \*\*p<0.01 Hypoxie (Hx) vs. Normoxie (Nx), Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die Erythrozyten und der Hämoglobingehalt waren bei hypoxischen Wildtyp- und smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen im Vergleich zu normoxischen Mäusen signifikant erhöht. Die Veränderungen des Hämatokrit, der Erythrozyten und des

Hämoglobingehalts zeigen die systemische Anpassungsreaktion der Mäuse an chronische Hypoxie. Im Gegensatz zu smHIF2 $\alpha$ -KO- und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen war bei smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen nach Hypoxie die Zahl der Erythrozyten sowie der Hämoglobingehalt im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach Hypoxie signifikant erhöht (Tabelle 1). Beim mittleren korpuskulären Volumen (MCV) der Erythrozyten fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt (MCH) der Erythrozyten war im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter Normoxie bei smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen verringert und unter Hypoxie bei smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen erhöht. Die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) der Erythrozyten zeigte sich bei Wildtyp-Mäusen nach Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Wildtyp-Mäusen reduziert. Bei hypoxischen smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen fand sich im Vergleich zu hypoxischen Wildtyp-Mäusen eine erhöhte MCHC, während sich bei Hypoxie zwischen smHIF1 $\alpha$ -KO- und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigte (Tabelle 1). Weiterhin wurde die Leukozytenzahl im Blut bestimmt. Bei Wildtyp-Mäusen war nach Hypoxie im Vergleich zu Normoxie keine signifikante Änderung der Leukozytenzahl zu erkennen. Bei smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen zeigte sich nach Hypoxie eine Leukozytose mit  $4,633 \pm 0,702 \times 10^3/\mu\text{l}$  im Vergleich zu einer Leukozytenzahl von  $2,681 \pm 371 \times 10^3/\mu\text{l}$  bei Wildtyp-Mäusen nach Hypoxie (Tabelle 1). Die Thrombozytenzahl war bei Wildtyp-Mäusen nach Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Wildtyp-Mäusen reduziert. Bei allen drei smHIF $\alpha$ -KO-Mauslinien zeigte sich dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen Normoxie- und Hypoxiegruppe. Zwischen Wildtyp- und smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen fand sich ebenfalls sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie kein signifikanter Unterschied (Tabelle 1).

### Tabelle 1: Hämatologische Laborwerte

Die Tabelle zeigt das kleine Blutbild der Mäuse nach 3 Wochen Normoxie (Nx) oder Hypoxie (Hx). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren alle Mäuse 11 Wochen alt. MCV, mittleres korpuskuläres Volumen; MCH, mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt; MCHC, mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration. Wt/Nx: n=12, smHIF1/Nx: n=5, smHIF2/Nx: n=10, smHIF1HIF2/Nx: n=2, Wt/Hx: n=13, smHIF1/Hx: n=6, smHIF2/Hx: n=7, smHIF1HIF2/Hx: n=4. \*p<0,05 vs. Wildtyp/Nx, \*\*p<0,05 vs. KO/Nx, #p<0,05 vs. Wildtyp/Hx, Mittelwert ± SEM.

#### Hypoxie

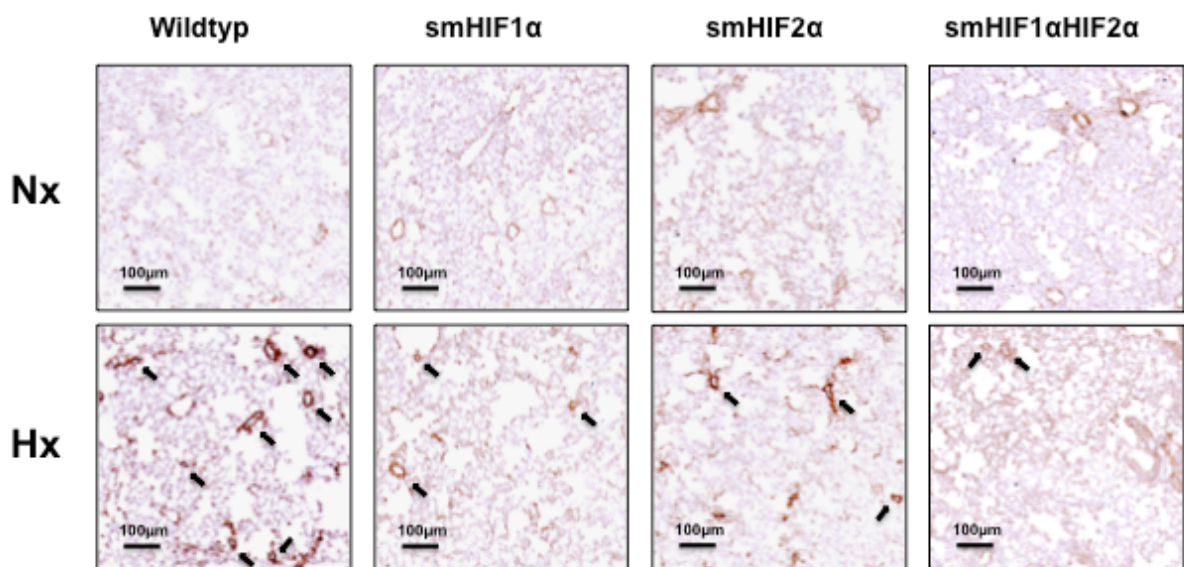
	Wildtyp	smHIF1α	smHIF2α	smHIF1α HIF2α	Wildtyp	smHIF1α	smHIF2α	smHIF1α HIF2α
Leukozyten (10 <sup>3</sup> /μl)	2,495 ± 0,287	1,962 ± 0,091	2,997 ± 0,317	2,880 ± 0,890	2,681 ± 0,371	3,458 ± 0,312 **	2,684 ± 0,438	4,633 ± 0,702 #
Erythrozyten (10 <sup>6</sup> /μl)	8,42 ± 0,20	8,78 ± 0,14	7,90 ± 0,22	8,30 ± 0,15	11,37 ± 0,20 *	12,51 ± 0,20 # **	10,96 ± 0,39 **	10,98 ± 0,40 **
Hämoglobin (g/dl)	13,16 ± 0,25	13,10 ± 0,23	12,60 ± 0,28	12,60 ± 0,30	18,25 ± 0,48 *	20,35 ± 0,32 # **	18,79 ± 0,58 **	18,08 ± 0,57 **
Hämatokrit (%)	39,74 ± 0,66	38,38 ± 0,38	38,19 ± 0,80	39,35 ± 1,55	60,18 ± 1,86 *	63,37 ± 1,15 **	54,80 ± 2,24 **	60,28 ± 3,28 **
MCV (fl)	47,36 ± 0,95	43,72 ± 0,40 *	48,45 ± 0,62	47,45 ± 1,05	52,87 ± 1,15 *	50,73 ± 1,35 **	49,96 ± 0,87	54,80 ± 1,12 **
MCH (pg)	15,65 ± 0,16	14,90 ± 0,11 *	15,97 ± 0,12	15,20 ± 0,10	16,03 ± 0,27	16,27 ± 0,15 **	17,16 ± 0,26 # **	16,48 ± 0,26 **
MCHC (g/dl)	33,14 ± 0,49	34,12 ± 0,40	33,00 ± 0,39	32,00 ± 0,50	30,46 ± 0,69 *	32,15 ± 0,62 **	34,39 ± 0,46 # **	30,13 ± 0,75
Thrombozyten (10 <sup>3</sup> /μl)	685,6 ± 77,1	640,2 ± 127,9	526,1 ± 108,8	513,5 ± 25,5	409,3 ± 56,5 *	361,0 ± 63,6	330,6 ± 45,0	494,5 ± 44,1

## 4.3 Evaluation der chronisch-hypoxischen pulmonalen Hypertension

### 4.3.1 Pulmonalvaskuläres Remodeling

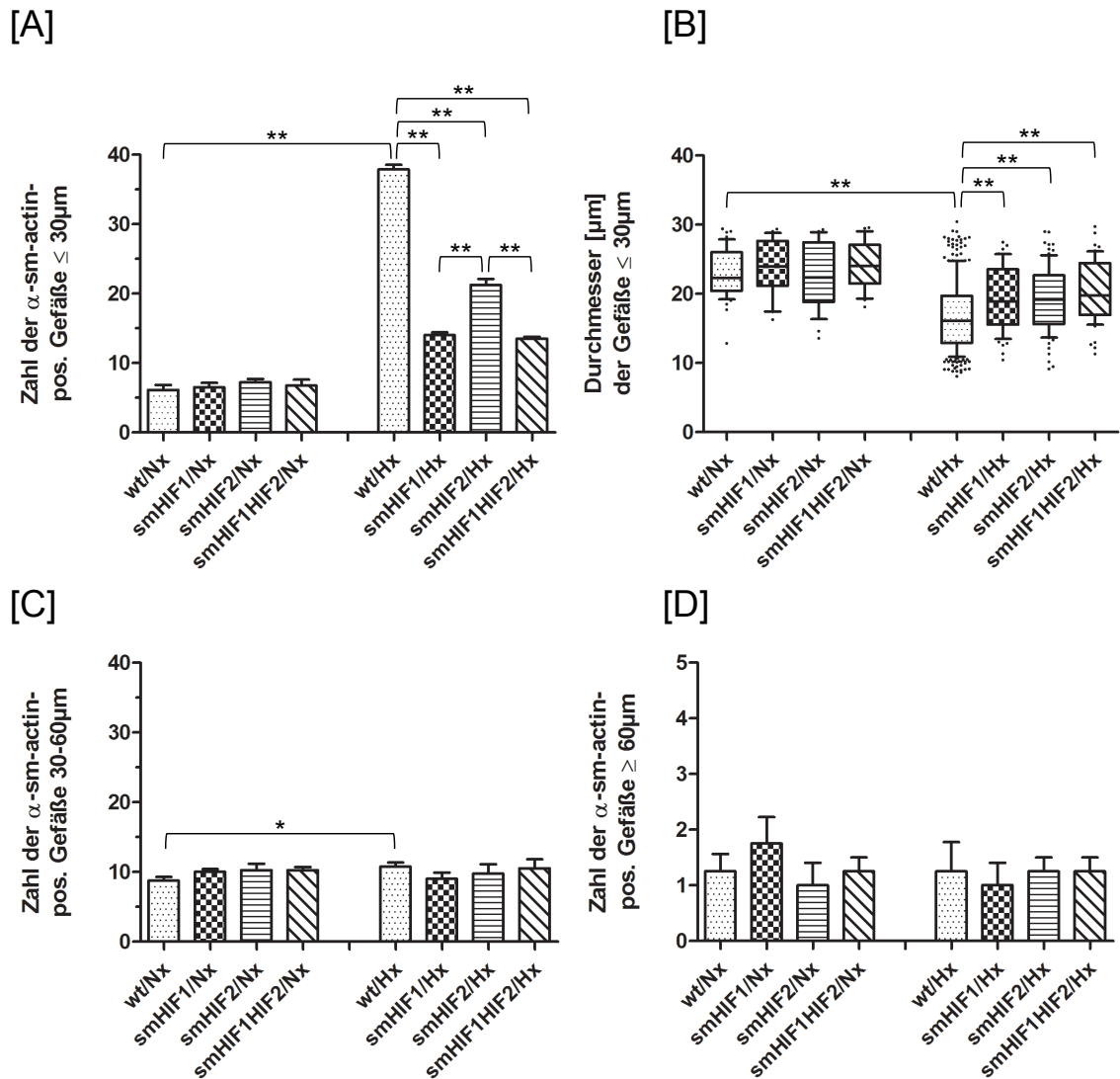
Das PVR spielt eine entscheidende Rolle in der Pathobiologie der CHPH. Im Tiermodell der CHPH zeigen Nagetiere bei Exposition mit chronischer Hypoxie ein PVR mit strukturellen Veränderungen des pulmonalen Gefäßsystems, die zu einem erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand führen. Von großer Bedeutung ist dabei vor allem eine luminale Einengung durch die verstärkte Muskularisierung mit Erscheinung von  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-exprimierenden Zellen in normalerweise nicht muskularisierten Pulmonalarterien. Zur Evaluation des PVR nach Hypoxie wurden Gewebeschnitte der murinen Lungen mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -smooth-muscle-actin immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. Wildtyp-Mäuse nach Hypoxie zeigten eine starke Zunahme an muskularisierten,  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäßen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach Normoxie (Abb. 9). Diese Zunahme zeigte sich vor allem bei Lungengefäßen mit einem maximalen Innendurchmesser von  $\leq 30 \mu\text{m}$  (Abb. 10A). Während unter Normoxie zwischen Wildtyp- und smHIF $\alpha$ -KO-Mauslinien kein Unterschied zu erkennen war, zeigten die Mauslinien smHIF1 $\alpha$ , smHIF2 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  nach Hypoxie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikant geringere Anzahl an  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäßen (Abb. 9 & 10A). Der Innendurchmesser der  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäßen lag bei Wildtyp-Mäusen nach Hypoxie im Mittel bei  $16,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ , während der Innendurchmesser bei smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen  $19,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$ , bei smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen  $19,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$  und bei smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen  $20,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$  betrug (Abb. 10B). Diese Ergebnisse zeigen, dass alle drei glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mauslinien im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach chronischer Hypoxie eine geringere Muskularisierung kleiner Pulmonalarterien und damit ein reduziertes PVR entwickeln. Wildtyp-Mäuse zeigten dagegen nach Hypoxie ein verstärktes Auftreten von  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäßen, als auch einen geringeren mittleren Durchmesser dieser Gefäße (Abb. 10A & 10B). Dies zeigt die Zunahme an vor allem kleinen  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäßen bei Wildtyp-Mäusen nach Hypoxie, während der Unterschied in der Muskularisierung zwischen Normoxie und

Hypoxie mit der Größe der Lungengefäße abnimmt (Abb. 10C & 10D). Bei den Mauslinien smHIF1 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  erschien nach Hypoxie im Vergleich zu smHIF2 $\alpha$ -Mäusen eine noch geringere Anzahl an kleinen,  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäßen. Zwischen smHIF1 $\alpha$ -KO- und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen fand sich dabei kein signifikanter Unterschied (Abb. 10A). Die Feinstruktur der Gefäße reichte von partiell muskularisiert bis komplett muskularisiert. Sofern bei einem angeschnittenen Gefäß mehr als 50% der Gefäßwand muskularisiert war, wurde das Gefäß als  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiv gewertet.



**Abb. 9: Glattmuskelzellspezifischer HIF $\alpha$ -Knockout schützt partiell vor pulmonalvaskulärem Remodeling nach chronischer Hypoxie.**

Immunohistochemische Färbung von Gewebeschnitten muriner Lungen mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -smooth-muscle-actin (braun). Die Organentnahme erfolgte nach Normoxie (Nx) oder nach 3 Wochen chronischer Hypoxie (Hx) bei 11 Wochen alten Mäusen. Die schwarzen Pfeile zeigen auf kleine,  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positive Lungengefäße. Vergrößerung 10x, Hauptgesichtsfeld 865 x 685  $\mu$ m.

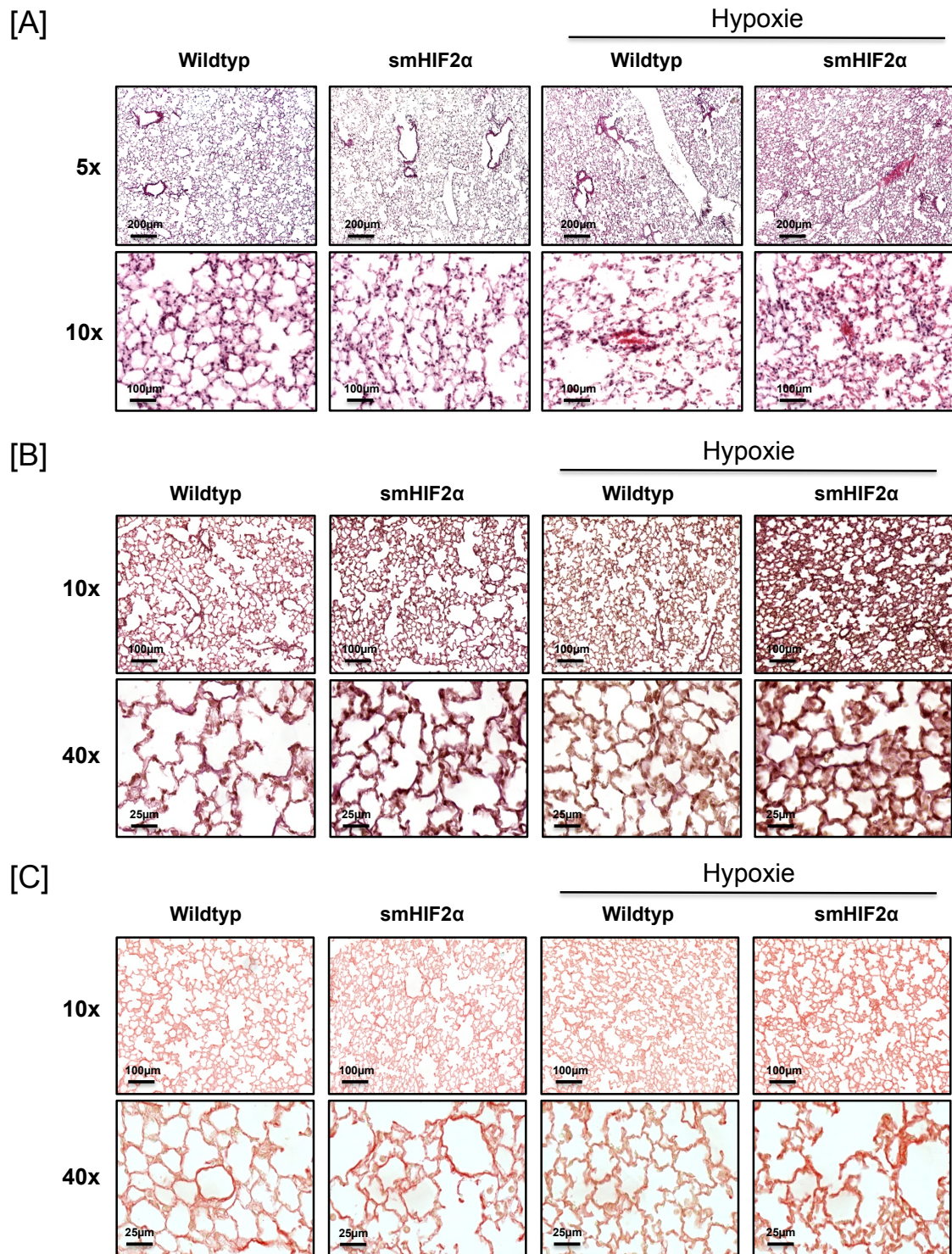


**Abb. 10: Glattmuskelzellspezifische HIF $\alpha$ -Knockout-Mäuse zeigen reduzierte Muskularisierung kleiner Pulmonalarterien nach Hypoxie.**

[A] Quantitative Darstellung der  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäße mit einem maximalen Innendurchmesser von  $\leq 30 \mu\text{m}$ . [B] Darstellung der maximalen Innendurchmesser aller  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäße  $\leq 30 \mu\text{m}$  mithilfe eines Boxplot (Whisker 10.-90. Perzentile). [C] Quantitative Darstellung der  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäße mit einem maximalen Innendurchmesser von 30-60  $\mu\text{m}$ . [D] Quantitative Darstellung der  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäße mit einem maximalen Innendurchmesser von  $\geq 60 \mu\text{m}$ . Pro Färbung wurden 4 Hauptgesichtsfelder (865 x 685  $\mu\text{m}$ ) analysiert. Wt/Nx: n=8, smHIF1/Nx: n=4, smHIF2/Nx: n=4, smHIF1HIF2/Nx: n=4, Wt/Hx: n=8, smHIF1/Hx: n=4, smHIF2/Hx: n=4, smHIF1HIF2/Hx: n=4. Verglichen wurden die verschiedene smHIF-KO-Mauslinien vs. Wildtyp unter Normoxie bzw. Hypoxie, \*p<0.05, \*\*p<0.01, Mittelwert  $\pm$  SEM.



Zur Evaluation von Lungengerüstveränderungen und einer möglichen Beeinflussung der extrazellulären Matrix durch das PVR nach chronischer Hypoxie erfolgten Färbungen der murinen Lungen mit Hämatoxylin-Eosin, Elastika van Gieson und Picro-Siriusrot. Weder bei der Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin und Eosin, noch bei den Spezialfärbungen für elastische Fasern (Elastika van Gieson) und Kollagen (Picro-Siriusrot) zeigten sich histologische Unterschiede zwischen Wildtyp-Mäusen nach Normoxie und Hypoxie (Abb. 11A-C). Ebenfalls kein Unterschied fand sich zwischen Wildtyp- und smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen (Abb. 11A-C) unter Normoxie oder nach Hypoxie. Aufgrund der Negativergebnisse wurde auf Färbungen der Lungen von smHIF1 $\alpha$ -KO- und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen verzichtet.



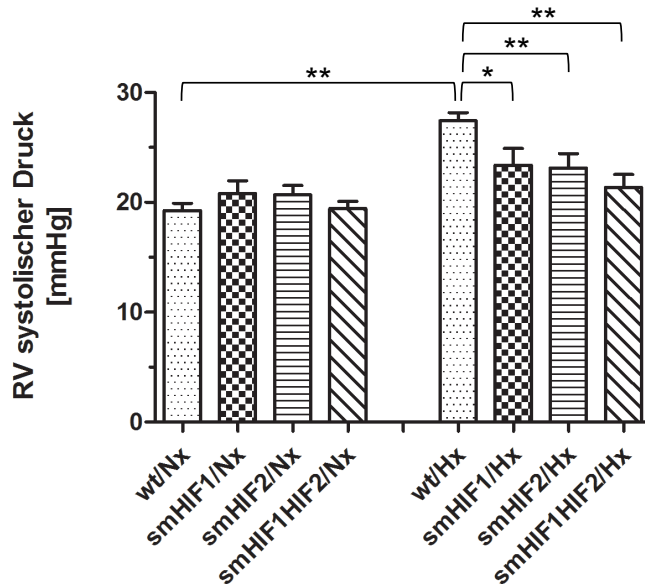
**Abb. 11: Hypoxie und glattmuskulärer HIF2 $\alpha$ -Knockout haben keinen Einfluss auf die Bildung von Kollagen und elastischen Fasern in der Lunge.**

[A] Übersichtsfärbung der murinen Lungen mit Hämatoxylin und Eosin. [B] Elastika van Gieson Färbung zur Darstellung elastischer Fasern (dunkelviolettschwarz). [C] Picro-Siriusrot-Färbung zur Darstellung von Kollagen (rot). Vergrößerungen 5x, 10x und 40x; Wt/Nx: n=4, smHIF2/Nx: n=4, Wt/Hx: n=4, smHIF2/Hx: n=4.

### 4.3.2 Hämodynamische Messungen

Die Evaluation der CHPH mit Messung der kardialen Druckwerte erfolgte mittels hämodynamischer Messungen unter Allgemeinanästhesie. Die Versuchstiere wurden im Alter von 8 Wochen für den Versuchszeitraum von 3 Wochen unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen gehalten. Unmittelbar im Anschluss erfolgten die hämodynamischen Messungen. Die Mäuse im Hypoxieexperiment wurden nach 60-minütiger Reoxygenierung gemessen, um akut vasokonstriktorische Effekte auf den pulmonalarteriellen Druck auszuschließen. Die rechtsventrikulär gemessenen systolischen Druckwerte zeigten bei Normoxie zwischen Wildtyp- und glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mäusen keinen signifikanten Unterschied. Nach 3 Wochen Hypoxie stieg bei Wildtyp-Mäusen der rechtsventrikuläre systolische Druck auf  $27,44 \pm 0,72$  mmHg, deutlich erhöht im Vergleich zu  $19,27 \pm 0,64$  mmHg bei Normoxie (Abb. 12). Dies bestätigt die Entwicklung einer Hypoxie-induzierten PH in unserem Tiermodell. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen wurden nach 3 Wochen Hypoxie bei den Mauslinien smHIF1 $\alpha$ , smHIF2 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  signifikant geringere rechtsventrikuläre systolische Drücke detektiert. Die gemessenen Druckwerte sind für smHIF1 $\alpha$ -Mäuse im Mittel bei  $23,39 \pm 1,52$  mmHg, für smHIF2 $\alpha$ -Mäuse bei  $23,15 \pm 1,30$  mmHg und für smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Mäuse bei  $21,35 \pm 1,18$  mmHg (Abb. 12). Die Mäuse mit Doppelknockout von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in glatten Muskelzellen zeigten nach Hypoxie demnach einen noch niedrigeren rechtsventrikulären systolischen Druck als Mäuse mit glattmuskulärem HIF1 $\alpha$ - oder HIF2 $\alpha$ -KO. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant und daher nur eine Tendenz. Alle drei glattmuskelzellspezifische HIF $\alpha$ -KO-Mauslinien zeigten eine leichte Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Druckes bei Hypoxie im Vergleich zu den Druckwerten der Mauslinien bei Normoxie. Diese jeweiligen Druckunterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie sind jedoch bei keiner KO-Mauslinie statistisch signifikant. Dies zeigt, dass im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen die Mauslinien smHIF1 $\alpha$ , smHIF2 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  einen geringeren Druckanstieg im pulmonalarteriellen Kreislauf als Antwort auf chronische Hypoxie zur Folge haben. Die glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mäuse scheinen somit vor der Entwicklung einer CHPH zumindest partiell geschützt zu sein. Da sich zwischen

weiblichen und männlichen Mäusen bei Normoxie und nach Hypoxie kein signifikanter Unterschied der rechtsventrikulären Druckwerte gezeigt hat, erfolgte keine geschlechtsspezifische Auftrennung der Versuchsgruppen.

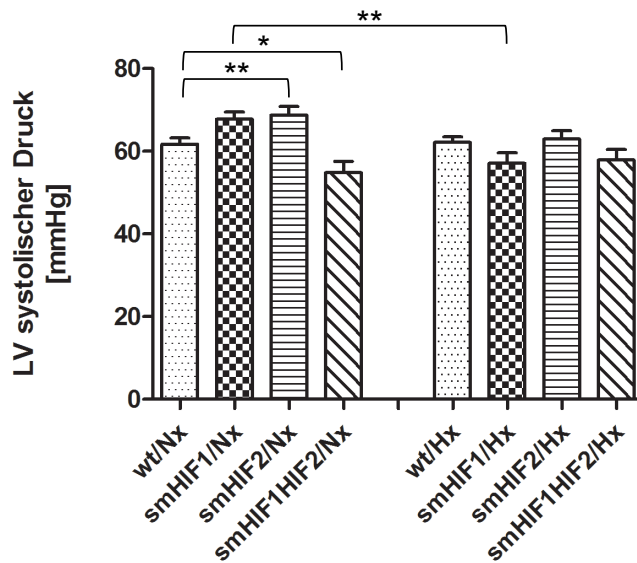


**Abb. 12: Glattmuskelzellspezifischer HIF $\alpha$ -KO schützt partiell vor Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie nach chronischer Hypoxie.**

Die Abbildung zeigt die systolischen Druckwerte im rechten Ventrikel (RV) bei 11 Wochen alten Mäusen unter Normoxie (Nx) und nach 3 Wochen Hypoxie (Hx). Die hämodynamischen Messungen erfolgten unter Isofluran-Narkose mittels kardialer Punktion. Wt/Nx: n=31, smHIF1/Nx: n=7, smHIF2/Nx: n=13, smHIF1HIF2/Nx: n=9, Wt/Hx: n=25, smHIF1/Hx: n=7, smHIF2/Hx: n=8, smHIF1HIF2/Hx: n=9. Verglichen wurden die Normoxie- vs. Hypoxiegruppen derselben Mauslinie sowie die verschiedene smHIF-KO-Mauslinien vs. Wildtyp unter Normoxie bzw. Hypoxie, \*p<0.05, \*\*p<0.01, Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die linksventrikulär gemessenen systolischen Druckwerte zeigten bei Wildtyp-Mäusen nach Hypoxie keinen signifikanten Unterschied zu den linksventrikulären Drücken unter Normoxie (Abb. 13). Unter Normoxie fand sich im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bei smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen ein im Mittel erhöhter und bei smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen ein im Mittel erniedrigter systolischer Druck im linken Ventrikel. Bei der smHIF1 $\alpha$ -KO-Mauslinie zeigte sich der linksventrikuläre Druck nach Exposition mit chronischer Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Bedingungen reduziert. Zwischen den Wildtyp-

Mäusen und smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen nach Hypoxie war kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abb. 13).



**Abb. 13: Linksventrikulärer systolischer Druck zeigt nach Hypoxie keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen.**

Die Abbildung zeigt die systolischen Druckwerte im linken Ventrikel bei 11 Wochen alten Mäusen unter Normoxie (Nx) und nach 3 Wochen Hypoxie (Hx). Die hämodynamischen Messungen erfolgten unter Isofluran-Narkose mittels kardialer Punktion. Wt/Nx: n=32, smHIF1/Nx: n=7, smHIF2/Nx: n=18, smHIF1HIF2/Nx: n=9, Wt/Hx: n=25, smHIF1/Hx: n=7, smHIF2/Hx: n=9, smHIF1HIF2/Hx: n=10. Verglichen wurden die Normoxie- vs. Hypoxiegruppen derselben Mauslinie sowie die verschiedene smHIF-KO-Mauslinien vs. Wildtyp unter Normoxie bzw. Hypoxie, \*p<0.05, \*\*p<0.01, Mittelwert  $\pm$  SEM.

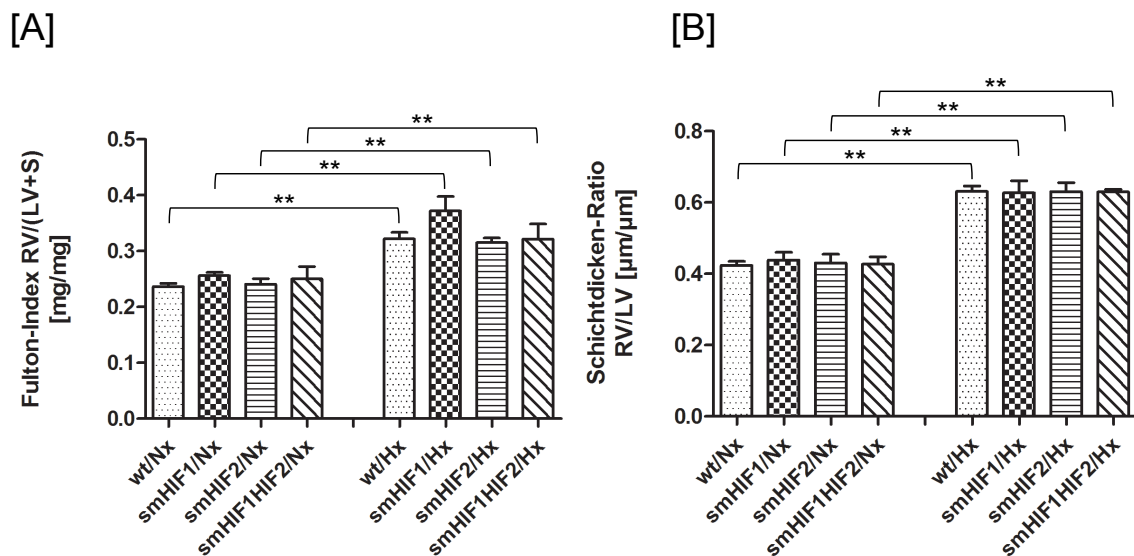
## 4.4 Evaluation der rechtsventrikulären Hypertrophie

### 4.4.1 Herzmasse und rechtsventrikuläre Schichtdicke

Zur Evaluation der rechtsventrikulären Hypertrophie (RVH) nach chronischer Hypoxie wurden Masse und Dicke des rechten Ventrikels untersucht. Für die Bestimmung der rechtsventrikulären Masse wurde das Herz post mortem entnommen und der rechte Ventrikel von linkem Ventrikel und Septum separiert. Die mithilfe einer Feinwaage gemessenen Werte des rechten Ventrikels wurden ins Verhältnis zur Masse des linken Ventrikels inklusive Septum gesetzt, um die interindividuellen Größen- und Gewichtsunterschiede der Versuchstiere auszugleichen (Fulton-Index). Wildtyp-Mäuse zeigten nach 3 Wochen Hypoxie im Vergleich zu altersentsprechenden Wildtyp-Mäusen bei Normoxie eine signifikante Zunahme der rechtsventrikulären Masse. Die Mauslinien smHIF1 $\alpha$ , smHIF2 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen weder bei Normoxie, noch bei Hypoxie signifikante Massenunterschiede des rechten Ventrikels. Die rechtsventrikuläre Masse der smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäuse nach Hypoxie scheint dabei sogar tendenziell größer zu sein als die von Wildtyp-Mäusen nach Hypoxie (Abb. 14A). Zur Dickenbestimmung der rechtsventrikulären Muskelschicht wurden die Mäuseherzen in toto entnommen und horizontale Gewebeschnitte angefertigt. Nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Schichtdicken des rechten und linken Ventrikels unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Dabei zeigte sich eine ähnliche Dynamik wie bei der Bestimmung der rechtsventrikulären Masse. Wildtyp-Mäuse zeigten nach 3 Wochen Hypoxie im Vergleich zur Normoxiegruppe eine signifikante Verbreiterung der rechtsventrikulären Muskelschicht im Verhältnis zum linken Ventrikel. Zwischen Wildtyp-Mäusen und smHIF1 $\alpha$ -KO-, smHIF2 $\alpha$ -KO- und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen bestand dabei weder unter Normoxie, noch unter Hypoxie ein signifikanter Unterschied (Abb. 14B). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Wildtyp-Mäuse, als auch die drei untersuchten glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mauslinien nach Hypoxie Merkmale einer RVH entwickeln. Im Gegensatz zur Entwicklung des PVR und der PH nach chronischer Hypoxie zeigten die smHIF $\alpha$ -KO-Mauslinien



bezüglich der Entwicklung einer RVH nach chronischer Hypoxie keinen protektiven Effekt.



**Abb. 14: Sowohl Wildtyp- als auch glattmuskelzellspezifische HIF $\alpha$ -KO-Mäuse entwickeln rechtsventrikuläre Hypertrophie nach chronischer Hypoxie.**

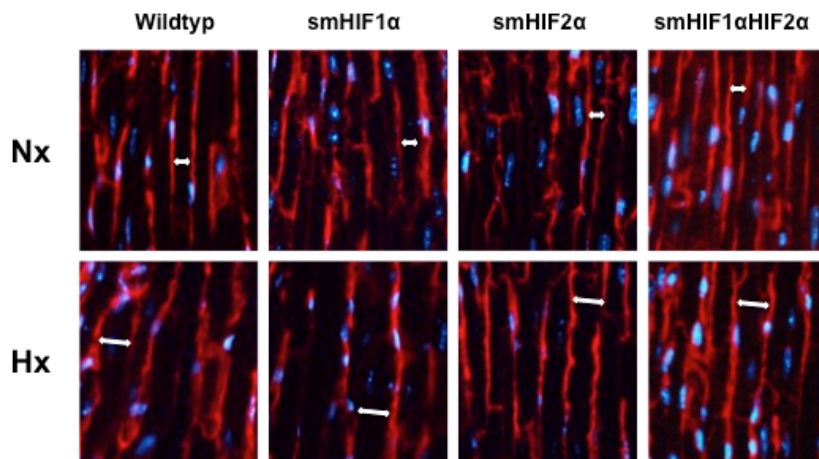
[A] Bestimmung des Fulton-Index, der Ratio zwischen rechtsventrikulärer (RV) und linksventrikulärer Masse inklusive Septum (LV+S). Die Organentnahme erfolgte nach Normoxie (Nx) oder 3 Wochen Hypoxie (Hx) bei 11 Wochen alten Mäusen. Die Massen von RV und LV+S wurden nach Separation mittels Feinwaage bestimmt. Wt/Nx: n=25, smHIF1/Nx: n=7, smHIF2/Nx: n=22, smHIF1HIF2/Nx: n=5, Wt/Hx: n=22, smHIF1/Hx: n=6, smHIF2/Hx: n=10, smHIF1HIF2/Hx: n=22. [B] Bestimmung der Ratio zwischen rechtsventrikulärer (RV) und linksventrikulärer (LV) Schichtdicke. Die Organentnahme erfolgte nach Normoxie (Nx) oder 3 Wochen Hypoxie (Hx) bei 11 Wochen alten Mäusen. Sowohl Wildtyp- als auch smHIF $\alpha$ -KO-Mäuse zeigten eine Dickenzunahme der rechtsventrikulären Muskelschicht nach Hypoxie. Wt/Nx: n=12, smHIF1/Nx: n=4, smHIF2/Nx: n=4, smHIF1HIF2/Nx: n=4, Wt/Hx: n=14, smHIF1/Hx: n=5, smHIF2/Hx: n=4, smHIF1HIF2/Hx: n=4. Verglichen wurden die Normoxie- vs. Hypoxiegruppen derselben Mauslinie sowie die verschiedene smHIF-KO-Mauslinien vs. Wildtyp unter Normoxie bzw. Hypoxie, \*p<0.05, \*\*p<0.01, Mittelwert  $\pm$  SEM.

#### 4.4.2 Hypertrophie rechtsventrikulärer Kardiomyozyten

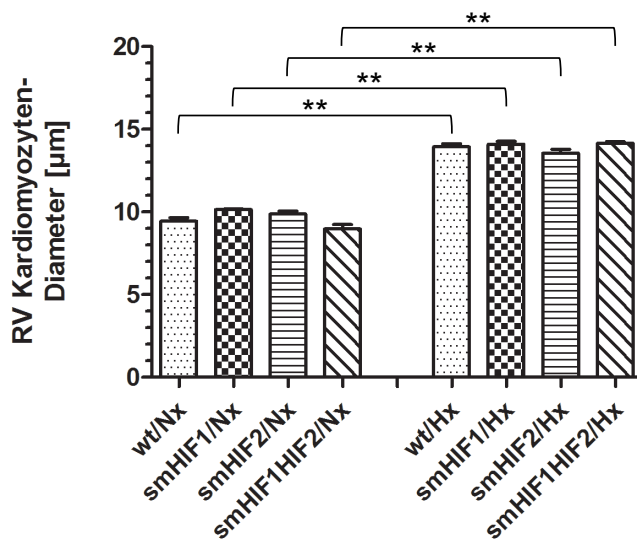
Zur weiteren Evaluation des Hypoxie-induzierten kardialen Remodelings wurde die Hypertrophie rechtsventrikulärer Kardiomyozyten untersucht. Durch Färbung mit Wheat Germ Agglutinin (WGA) konnten Kardiomyozyten angefärbt und in ihrem Durchmesser analysiert werden (Abb. 15A). Dabei zeigte sich bei Wildtyp-Mäusen nach 3 Wochen Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Wildtyp-Mäusen eine signifikante Zunahme des Durchmessers rechtsventrikulärer Kardiomyozyten. Während unter Normoxie der Durchmesser rechtsventrikulärer Kardiomyozyten im Mittel bei  $9,45 \pm 0,22 \mu\text{m}$  lag, zeigte sich nach Hypoxie ein Durchmesser von  $13,93 \pm 0,19 \mu\text{m}$  (Abb. 15B). Zwischen Wildtyp-Mäusen und smHIF1 $\alpha$ -KO-, smHIF2 $\alpha$ -KO- und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen konnte sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie kein signifikanter Unterschied zwischen den Mauslinien festgestellt werden. Diese Daten zeigen, ebenso wie die Ergebnisse der rechtsventrikulären Massen- und Schichtdickenbestimmung, dass sowohl Wildtyp- als auch glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mäuse bei Exposition mit chronischer Hypoxie gleichermaßen eine RVH entwickeln (Abb. 15).



[A]



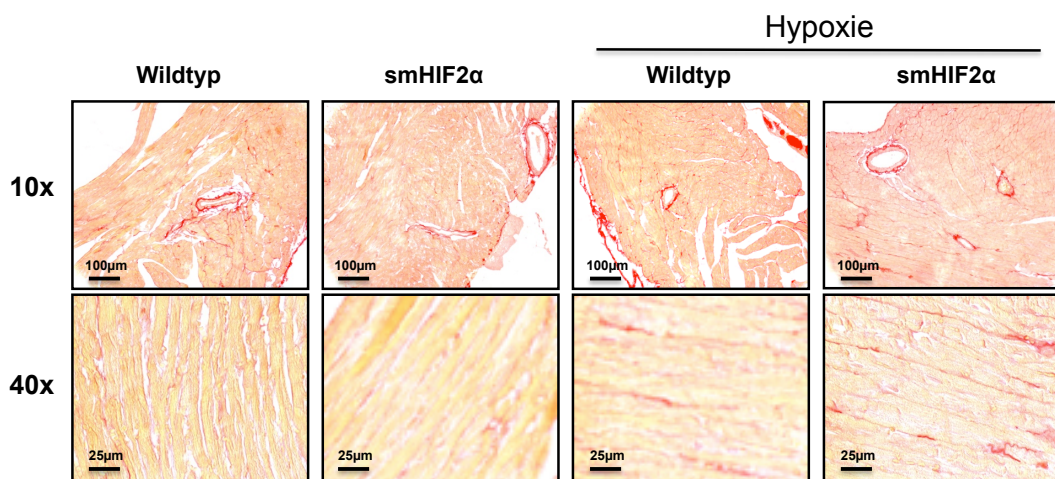
[B]



**Abb. 15: Hypertrophie rechtsventrikulärer Kardiomyozyten bei Wildtyp- und glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mäusen nach chronischer Hypoxie.**

[A] Wheat Germ Agglutinin (WGA) Färbung muriner rechtsventrikulärer Kardiomyozyten. Die Organentnahme erfolgte nach Normoxie (Nx) oder 3 Wochen Hypoxie (Hx) bei 11 Wochen alten Mäusen. Die weißen Pfeile zeigen die maximalen Durchmesser rechtsventrikulärer Kardiomyozyten. [B] Bestimmung des mittleren Durchmessers rechtsventrikulärer (RV) Kardiomyozyten. Die Messungen der maximalen zellulären Breite erfolgte an 40 Zellen pro rechtsventrikulärer Muskelschicht und Maus, pro Herz wurde der mittlere rechtsventrikuläre Kardiomyozyten-Durchmesser bestimmt. Wt/Nx: n=8, smHIF1/Nx: n=4, smHIF2/Nx: n=4, smHIF1HIF2/Nx: n=4, Wt/Hx: n=8, smHIF1/Hx: n=4, smHIF2/Hx: n=4, smHIF1HIF2/Hx: n=4. Verglichen wurden die Normoxie- vs. Hypoxiegruppen derselben Mauslinie sowie die verschiedene smHIF-KO-Mauslinien vs. Wildtyp unter Normoxie bzw. Hypoxie, \*\*p<0.01 vs. Hypoxie (Hx), Mittelwert  $\pm$  SEM.

Zur Evaluation einer rechtsventrikulären Fibrose nach chronischer Hypoxie wurde eine Piko-Siriusrot-Färbung der Gewebeschnitte muriner Herzen durchgeführt. Die Färbung zeigte im Bereich des rechtsventrikulären Myokards keinen signifikanten Unterschied an gefärbtem kollagenösem Bindegewebe zwischen Wildtyp-Mäusen nach Normoxie und chronischer Hypoxie (Abb. 16). Auch zwischen Wildtyp- und smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen fand sich kein histologischer Unterschied sowohl unter Normoxie als auch nach Hypoxie (Abb. 16). Aufgrund der Negativergebnisse erfolgten keine Färbungen weiterer Mauslinien.



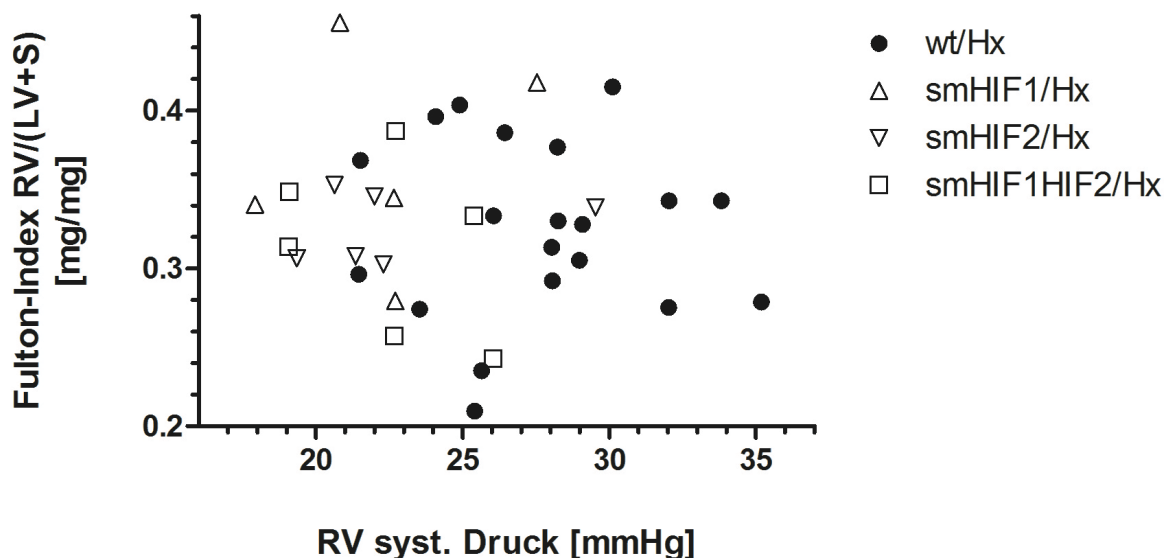
**Abb. 16: Rechtsventrikuläres Myokard zeigt keine relevante Zunahme an kollagenösem Bindegewebe nach chronischer Hypoxie.**

Piko-Siriusrot-Färbung zur Darstellung von Kollagen (rot). Das Zytoplasma erscheint blass gelb/rosa. Die Organentnahme erfolgte nach Normoxie (Nx) und 3 Wochen Hypoxie (Hx) bei 11 Wochen alten Mäusen. Vergrößerungen 10x und 40x; n=4.

#### **4.4.3 Abhängigkeit zwischen rechtsventrikulärem Druck und rechtsventrikulärer Hypertrophie**

Zur genaueren Beurteilung der nach Hypoxie entstandenen RVH führten wir eine Korrelationsanalyse zwischen den gemessenen rechtsventrikulären systolischen Druckwerten und dem Verhältnis der Masse des rechten Ventrikels zu linkem Ventrikel einschließlich Septum (Fulton-Index) durch. Analysiert wurden dabei die Wertepaare von Wildtyp-, smHIF1 $\alpha$ -KO-, smHIF2 $\alpha$ -KO- und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen nach Exposition mit chronischer Hypoxie. Da nur bei Versuchstieren nach Hypoxie mit einem Effekt des rechtsventrikulären

Drucks auf die myokardiale Masse zu rechnen ist, wurden nur die Wertepaare der Mäuse nach chronischer Hypoxie eingeschlossen. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zeigen, dass weder bei Wildtyp-Mäusen, noch bei smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen, eine Korrelation zwischen dem rechtsventrikulären systolischen Druck und dem Fulton-Index besteht. Der Korrelationskoeffizient zeigt mit -0,04 bei Wildtyp-, 0,21 bei smHIF1 $\alpha$ -, 0,29 bei smHIF2 $\alpha$ - und -0,37 bei smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Mäusen keinen linearen Zusammenhang der zwei Merkmale (Abb. 17). Dies deutet darauf hin, dass die Entwicklung der RVH nach Exposition mit chronischer Hypoxie nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit dem tatsächlichen rechtsventrikulären Druck steht, sondern unabhängig davon entstehen könnte.



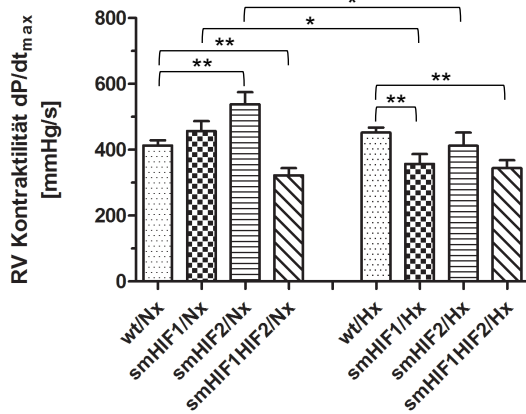
**Abb. 17: Fulton-Index korreliert nicht mit rechtsventrikulärem Druck nach Hypoxie.**

Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit zwischen dem rechtsventrikulären (RV) systolischen Druck und dem Fulton-Index RV/(LV+S) bei Mäusen nach 3 Wochen chronischer Hypoxie. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus, bei der sowohl hämodynamische Messung als auch Bestimmung der kardialen Masse erfolgte. Eine Korrelation dieser beiden Merkmale besteht nach vorliegenden Daten nicht. Korrelationskoeffizient Pearson  $r = -0,04$  für Wt/Hx,  $0,21$  für smHIF1/Hx,  $0,29$  für smHIF2/Hx und  $-0,37$  für smHIF1HIF2/Hx. Wt/Hx:  $n = 20$ , smHIF1/Hx:  $n = 5$ , smHIF2/Hx:  $n = 6$ , smHIF1HIF2/Hx:  $n = 6$ .

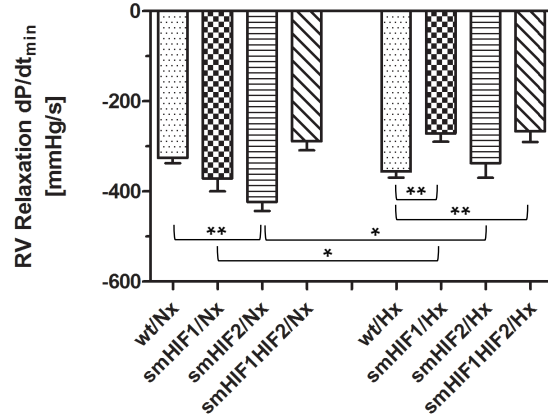
#### 4.4.4 Rechtsventrikuläre Funktion

Zur Beurteilung der rechtsventrikulären Funktion mit Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit können das maximale und minimale Verhältnis der ventrikulären Druckänderungen pro Zeit herangezogen werden. Diese Parameter wurden mithilfe der Daten hämodynamischer Messungen berechnet. Der Quotient zwischen dem maximalen Druckanstieg während der isovolumetrischen Kontraktion und der Zeit ( $dP/dt_{max}$ ) ist dabei ein Surrogatparameter für die Kontraktilität des Ventrikels. Je höher die Kontraktilität, desto höher der Druckanstieg in der frühen Systole. Der Quotient zwischen dem maximalen Druckabfall und der Zeit ( $dP/dt_{min}$ ) kann zur Abschätzung der diastolischen Funktion bzw. der Relaxationsfähigkeit (Lusitropie) verwendet werden. Eine Erhöhung der Lusitropie zeigt sich dabei in einem schnellen und gesteigerten Druckabfall während der isovolumetrischen Relaxation [69, 191]. Die Ergebnisse der hämodynamischen Messungen zeigten, dass sich die  $dP/dt_{max}$ - und  $dP/dt_{min}$ -Werte bei Wildtyp-Mäusen zwischen Normoxie und Hypoxie nicht signifikant unterscheiden (Abb. 18). Diese Tatsache bestätigt, dass das Tiermodell der CHPH bei Wildtyp-Mäusen nach 3 Wochen Hypoxie trotz der Entwicklung einer RVH nicht zu einer funktionellen Beeinträchtigung der rechtsventrikulären Funktion führt. Glattmuskelspezifische HIF $\alpha$ -KO-Mäuse zeigten bereits unter Normoxie signifikante Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen hinsichtlich Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit. Während bei normoxischen smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine gesteigerte Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit zu erkennen war, zeigten smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse eine verminderte Kontraktilität. Bei den KO-Mauslinien smHIF1 $\alpha$  und smHIF2 $\alpha$  fand sich zudem zwischen Normoxie- und Hypoxiegruppe eine signifikante Reduktion der Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit. Bei KO-Mäusen der Linie smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Normoxie- und Hypoxiegruppe (Abb. 18).

[A]



[B]



**Abb. 18: Rechtsventrikuläre Funktion bei Normoxie und nach 3 Wochen Hypoxie.**

[A] Die Abbildung zeigt die maximale rechtsventrikuläre (RV) Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dP/dt_{max}$  in mmHg/s während der Systole. [B] Darstellung der maximalen rechtsventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeit  $dP/dt_{min}$  in mmHg/s während der Diastole. Die hämodynamischen Messungen erfolgten invasiv mittels Druck-Messwandler bei 11 Wochen alten Mäusen unter Normoxie (Nx) und nach 3 Wochen Hypoxie (Hx). Wt/Nx: n=31, smHIF1/Nx: n=7, smHIF2/Nx: n=13, smHIF1HIF2/Nx: n=9, Wt/Hx: n=25, smHIF1/Hx: n=7, smHIF2/Hx: n=8, smHIF1HIF2/Hx: n=9. Verglichen wurden die Normoxie- vs. Hypoxiegruppen derselben Mauslinie sowie die verschiedene smHIF-KO-Mauslinien vs. Wildtyp unter Normoxie bzw. Hypoxie, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 5. Diskussion

Die besondere Reaktion des pulmonalen Gefäßsystems auf Hypoxie wurde bereits breit studiert. Dennoch sind viele Mechanismen bis heute noch nicht verstanden. Erkenntnisse aus Studien mit Patienten und Tiermodellen der PH zeigen, dass HIF $\alpha$  eine besondere Rolle spielt. Sowohl als Modulator der akuten HPV, als auch als entscheidender Faktor beim Hypoxie-induzierten PVR wurde insbesondere HIF1 $\alpha$  bereits beschrieben [152, 173, 180, 192]. Diese Arbeit hat den Beitrag von glattmuskulärem HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in der Pathogenese von Hypoxie-induzierter PH, PVR und RVH in einem murinen Modell erforscht. Die vorliegenden Daten zeigen interessante neue Erkenntnisse. Sowohl HIF1 $\alpha$  als auch HIF2 $\alpha$  spielen in PAGMZ eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CHPH und des PVR. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das rechtsventrikuläre Remodeling nach Hypoxie nicht direkt mit dem Grad der PH zusammenhängt, da eine verminderte Ausprägung der PH in smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen nicht mit einer verminderten RVH einhergeht.

### 5.1 Phänotyp der glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -Knockout-Mauslinien unter chronischer Hypoxie

#### 5.1.1 Glattmuskelzellspezifische HIF $\alpha$ -Knockout-Mäuse verlieren unter Hypoxie nicht so viel Gewicht wie Wildtyp-Mäuse

Sowohl bei Wildtyp- als auch bei smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen zeigte sich im Versuchszeitraum unter normoxischen Bedingungen eine deutliche Zunahme des Körpergewichts ohne signifikante Unterschiede. Dies deutet darauf hin, dass der KO von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in glatten Muskelzellen bei Normoxie keinen Einfluss auf die Gewichtszunahme hat. Mäuse mit einem globalen, heterozygoten Knockout von HIF1 $\alpha$  oder HIF2 $\alpha$  nehmen bereits unter normoxischen Bedingungen weniger Gewicht zu, was vermutlich auf die Beteiligung von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  bei metabolischen Prozessen zurückzuführen ist [152, 153]. Nach 3-wöchiger Hypoxie zeigte sich bei Wildtyp- und

smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Mäusen eine Gewichtsreduktion, bei smHIF1 $\alpha$ - und smHIF2 $\alpha$ -Mäusen dagegen eine geringe Gewichtszunahme. Dies zeigt, dass sich smHIF1 $\alpha$ - und smHIF2 $\alpha$ -Mäuse möglicherweise besser an die chronisch-hypoxischen Umgebungsbedingungen adaptieren können. Heterozygote HIF1 $\alpha$ -Mäuse verlieren im Gegensatz zu heterozygoten HIF2 $\alpha$ -Mäusen unter Hypoxie mehr Gewicht als Wildtyp-Mäuse. Diese Tatsache ist vermutlich auf die unterschiedlichen Rollen und die andersartige Zell-spezifische Expression zurückzuführen. Ein globaler Mangel an HIF1 $\alpha$  beeinträchtigt die Glykolyse und damit möglicherweise den gesamten Metabolismus während chronischer Hypoxie [152, 153]. HIF2 $\alpha$  scheint in der hypoxischen Hochregulation glykolytischer Enzyme eine untergeordnete Rolle zu spielen [193]. Bezogen auf das Körpergewicht zeigen unsere Ergebnisse einerseits, dass ein HIF1 $\alpha$ - oder HIF2 $\alpha$ -KO in glatten Muskelzellen die Gewichtszunahme bei Normoxie nicht beeinträchtigt, und andererseits, dass die KO-Mauslinien bei Hypoxie im Vergleich zum Wildtyp weniger an Gewicht verlieren. Der KO von HIF1 $\alpha$ - oder HIF2 $\alpha$  in glatten Muskelzellen wirkt sich im Hypoxieexperiment über eine verminderte PH vermutlich protektiv aus.

### **5.1.2 Blutbild aller Mauslinien zeigt die bei chronischer Hypoxie typischen Veränderungen**

Im Blutbild zeigte sich sowohl bei Wildtyp- als auch bei glattmuskelspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mäusen ein deutlicher Hämatokrit-Anstieg. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen konnte bei Normoxie oder Hypoxie nicht festgestellt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass der HIF $\alpha$ -KO in glatten Muskelzellen keinen Einfluss auf den kompensatorischen Hämatokrit-Anstieg als Antwort auf chronische Hypoxie hat. Da es sich bei dem HIF $\alpha$ -KO um einen gewebespezifischen KO in glatten Muskelzellen handelt, der hämatopoetische Zellen in der Regel nicht mit beeinflusst, ist dieses Ergebnis wenig überraschend. Bei Mäusen mit einem globalen heterozygoten HIF1 $\alpha$ -KO konnte hingegen ein verzögerter Hämatokrit-Anstieg beobachtet werden [152]. Dieser Effekt zeigte sich bei heterozygoten HIF2 $\alpha$ -Mäusen nicht, da die hypoxische Induktion der Erythropoetin-Expression

möglicherweise stärker von HIF1 $\alpha$  als von HIF2 $\alpha$  abhängig ist [153]. Die Thrombozytenzahl war nach chronischer Hypoxie bei Wildtyp- als auch bei glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mäusen vermindert. Eine Verminderung der Thrombozytenzahl bei Hypoxie bzw. Exposition in großer Höhe wurde bereits beschrieben [194, 195]. Ob dies das Resultat einer Kompensation bei erhöhter Blutviskosität oder einer erhöhten funktionellen Aktivierung von Thrombozyten im Sinne eines erhöhten Thrombozytenverbrauchs ist, ist bisher nicht ausreichend untersucht [196]. Weitere Studien sind notwendig, um die Auswirkungen von Hypoxie auf das Gerinnungssystem und die vermehrten thrombembolischen Ereignisse in großer Höhe zu verstehen [197]. Die Ergebnisse der Blutanalysen zeigen jedoch, dass der KO von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in glatten Muskelzellen vermutlich keinen Einfluss auf die systemischen Kompensationsmechanismen des Blutes bei Exposition mit chronischer Hypoxie hat. Die vergleichbare Erhöhung des Hämatokrits aller Mauslinien unter Hypoxie zeigt, dass der Schutz vor der Entwicklung einer CHPH bei smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen nicht auf einen verringerten periphervaskulären Widerstand aufgrund einer verminderten Erythropoese unter Hypoxie zurückzuführen ist.

### **5.1.3 Glattmuskelzellspezifische HIF $\alpha$ -Knockout-Mäuse zeigen reduziertes Hypoxie-induziertes pulmonalvaskuläres Remodeling**

Die Evaluation des PVR bei smHIF1 $\alpha$ -, smHIF2 $\alpha$ - sowie smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Mäusen zeigt eindrücklich, dass alle glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mauslinien vor der Entwicklung Hypoxie-induzierter Gefäßveränderungen in der Lunge geschützt sind. Das PVR nach 3 Wochen chronischer Hypoxie war bei diesen Mäusen signifikant geringer ausgeprägt als bei Wildtyp-Mäusen, da alle smHIF $\alpha$ -KO-Mauslinien weniger kleine muskularisierte Gefäße als die Wildtyp-Mäuse aufwiesen. Zudem war die Muskularisierung der kleinen Gefäße in den KO-Mäusen weniger ausgeprägt als in den Wildtyp-Mäusen. Glattmuskuläres HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  scheint also direkt an den strukturellen Veränderungen der PAGMZ bei chronischer Hypoxie beteiligt zu sein. Mäuse mit glattmuskelzellspezifischem HIF2 $\alpha$ -KO zeigten in der quantitativen Auswertung



der immunhistochemischen Färbungen im Vergleich zu smHIF1 $\alpha$ - und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Mäusen signifikant mehr kleine,  $\alpha$ -sm-actin-positive Gefäße. Dies lässt vermuten, dass smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse weniger vor dem PVR geschützt sind als smHIF1 $\alpha$ -KO- und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse. Der KO von HIF1 $\alpha$  in PAGMZ hat demnach vermutlich einen stärkeren Effekt auf das Hypoxie-induzierten PVR. Die Bedeutung von HIF1 $\alpha$  bei der Reaktion von Geweben auf Hypoxie wurde bereits in einigen Arbeiten beschrieben. So zeigen Mäuse mit einem globalen, heterozygoten KO von HIF1 $\alpha$  nach chronischer Hypoxie ebenfalls ein vermindertes PVR [152]. Weiterhin konnte bei diesen Mäusen gezeigt werden, dass Depolarisation und Hypertrophie von PAGMZ vermindert sind. Das hat sowohl Einfluss auf die HPV als auch auf das chronische PVR [173]. Über einen protektiven Effekt bei einem Mangel an HIF2 $\alpha$  gibt es ebenfalls Hinweise. Mäuse mit einem heterozygoten HIF2 $\alpha$ -KO zeigen nach Exposition mit chronischer Hypoxie ein vermindertes PVR mit reduzierter Muskularisierung der Pulmonalgefäße [153]. Weiterhin zeigen heterozygote HIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse in einem Mausmodell der Chuvash-Erkrankung mit VHL-Mutation ein vermindertes PVR [198]. Unsere Ergebnisse bestätigen bzw. zeigen erstmals, dass HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in PAGMZ eine wichtige Rolle beim Hypoxie-induzierten PVR spielen. Interessanterweise sind die Effekte des HIF1 $\alpha$ -KO und HIF2 $\alpha$ -KO in glatten Muskelzellen nicht additiv. Bei smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Mäusen sind nahezu gleich viele kleine, muskularisierte Lungengefäße zu erkennen wie bei smHIF1 $\alpha$ -Mäusen. Es zeigt sich bei beiden Mauslinien eine Reduktion des PVR von ca. 65%. Ein Knockout von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in glatten Muskelzellen kann das PVR nach unseren Erkenntnissen deutlich reduzieren, aber nicht komplett verhindern. Andere Faktoren, Signalwege, Zelltypen und HIF-unabhängige Mechanismen tragen ebenfalls zum Hypoxie-induzierten PVR bei. So gibt es beispielsweise Evidenz dafür, dass auch Endothelzellen und Fibroblasten an der vaskulären Reaktion auf Hypoxie beteiligt sind [65]. Fibroblasten beeinflussen möglicherweise durch parakrine Effekte die Proliferation von angrenzenden glatten Muskelzellen [199-202]. Die HIF-Aktivierung in Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder in anderen Geweben wirkt vermutlich ebenfalls an der Entstehung der CHPH mit [202, 203]. Aber auch HIF-unabhängige Effekte spielen möglicherweise eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Hypoxie über Wachstumsfaktoren promotogene

Effekte auf glatte Muskelzellen hat, auch wenn HIF1 $\alpha$  in diesen Zellen ausgeschaltet wurde [180].

#### **5.1.4 Glattmuskelzellenspezifische HIF $\alpha$ -Knockout-Mäuse sind vor einer chronisch-hypoxischen pulmonalen Hypertension geschützt**

Nach den Ergebnissen der hämodynamischen Messungen weisen die KO-Mauslinien smHIF1 $\alpha$ , smHIF2 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  nach Hypoxie signifikant geringere rechtsventrikuläre Drücke auf als Wildtyp-Mäuse. Dies zeigt, dass diese Mauslinien durch den HIF $\alpha$ -KO in glatten Muskelzellen vor der Entwicklung einer Hypoxie-induzierten PH zumindest teilweise geschützt sind. Während dieser Effekt bei glattmuskelzellenspezifischen HIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen bereits beschrieben wurde [48], sind die Ergebnisse mit der smHIF2 $\alpha$ - und der smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Mauslinie neu. SmHIF1 $\alpha$ -KO- und smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse haben sowohl bei Normoxie als auch nach chronischer Hypoxie einen annähernd identischen systolischen Druck im rechten Ventrikel. Es ist davon auszugehen, dass neben HIF1 $\alpha$  also auch HIF2 $\alpha$  in den glatten Muskelzellen ein wichtiger Faktor für die Entwicklung einer CHPH ist. Die Bedeutung von HIF2 $\alpha$  zeigen auch Untersuchungen einer aktivierenden, autosomal-dominanten Mutation des HIF2 $\alpha$ -Gens, bei der die betroffenen Patienten eine PH entwickeln [204]. Der schützende Effekt eines glattmuskulären HIF1 $\alpha$ - oder HIF2 $\alpha$ -KO scheint bezüglich der Entstehung einer CHPH ähnlich stark zu sein. Dass ein Mangel an HIF1 $\alpha$  oder HIF2 $\alpha$  zu einem geringeren Anstieg der rechtsventrikulären Drücke im Modell der CHPH führt, konnte in heterozygoten HIF1 $\alpha$ - und heterozygoten HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen bereits festgestellt werden [152, 153]. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen nun, dass glattmuskuläres HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  bei der pulmonalen Antwort auf Hypoxie eine entscheidende Rolle spielen. Ein kompletter KO von HIF1 $\alpha$  oder HIF2 $\alpha$  in den glatten Muskelzellen führt mindestens zur partiellen Protektion der Mäuse vor der Entwicklung einer CHPH. Neu ist außerdem, dass bei KO beider Transkriptionsfaktoren die Mäuse nach Hypoxie noch geringere rechtsventrikuläre Spitzendrücke entwickeln als bei einem KO von HIF1 $\alpha$  oder HIF2 $\alpha$ . Der Unterschied zwischen einfachem smHIF1 $\alpha$ - oder smHIF2 $\alpha$ -KO und einem KO beider

Transkriptionsfaktoren ist jedoch nicht signifikant und daher nur eine Tendenz. Die Daten des PVR sowie der hämodynamischen Messungen zeigen, dass HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in PAGMZ aufgrund ihrer Rolle beim PVR Schlüsselfaktoren bei der Entstehung einer CHPH sind.

## **5.2 Beitrag von HIF zur akuten und chronischen Antwort auf Hypoxie**

Im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH tragen HPV und PVR gleichermaßen zu den histopathologischen Veränderungen bei. Mithilfe von quantitativen, stereologischen Techniken konnte gezeigt werden, dass der Anstieg des pulmonal-vaskulären Widerstands im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH sowohl durch anhaltende Vasokonstriktion als auch durch strukturelle Einengung der Gefäßlumina bedingt ist. Diese Einengung entsteht durch eine Verdickung der Gefäßwände und ein nach innen gerichtetes Remodeling [44]. Es gibt Hinweise darauf, dass HIF1 $\alpha$  für Hypertrophie und Proliferation glatter Muskelzellen und damit für das chronische Remodeling der Pulmonalgefäße benötigt wird. Es ist jedoch auch denkbar, dass die HPV und somit das chronische Remodeling der Gefäße beeinflusst wird, indem die Lungengefäße bei chronischer Hypoxie in einem weniger kontrahierten Zustand durch das Remodeling der extrazellulären Matrix fixiert werden [64, 205, 206].

### **5.2.1 HIF1 $\alpha$ und HIF2 $\alpha$ als Schlüsselfaktoren beim chronischen Remodeling von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen**

Über welche genauen Mechanismen HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  zum Remodeling von PAGMZ bei Hypoxie führen, ist noch nicht ausreichend verstanden. Vor allem zum Beitrag von HIF2 $\alpha$  gibt es noch wenig Daten. Wie bereits erwähnt, reguliert HIF1 $\alpha$  in PAGMZ über die Expression von spannungsabhängigen Kaliumkanälen, NHA-1 und TRP-Kanälen den pH-Wert und die intrazelluläre Calcium-Konzentration, was Proliferation, Migration und Apoptose-Resistenz von PAGMZ steigert [97-99, 107, 173-175]. Es gibt jedoch eine Reihe weiterer Hypothesen und Hinweise, wie Hypoxie-induzierte Faktoren das Remodeling von PAGMZ beeinflussen könnten. Beispielweise gibt es Hinweise darauf, dass

HIF über metabolische Prozesse Zellproliferation und Apoptose-Verhalten von PAGMZ beeinflusst. Durch Hochregulation der Pyruvat Dehydrogenase Kinase hemmt HIF1 $\alpha$  die Pyruvat Dehydrogenase und steigert dadurch die aerobe Glykolyse bei Hypoxie, was mit einem verstärkten PVR in Zusammenhang gebracht wurde. Dichloroacetat, ein Hemmstoff der Pyruvat Dehydrogenase Kinase konnte als protektiver Faktor beschrieben werden [36, 86, 207]. Durch einen gestörten Metabolismus der PAGMZ bei Hypoxie, könnte HIF durch Steigerung der aeroben Glykolyse Zellproliferation und Apoptose-Resistenz begünstigen. Bei einem KO von HIF in PAGMZ, wie in den beschriebenen Mauslinien der Fall, würde sich demnach ein verringertes PVR aufgrund reduzierter Apoptose-Resistenz und Zellproliferation zeigen [42, 207, 208]. Weiterhin ist denkbar, dass HIF1 $\alpha$  über eine gesteigerte Expression von Endothelin-1 und ein gesteigertes Angiotensin II- vermitteltes Remodeling das PVR als Antwort auf chronische Hypoxie beeinflusst. Erhöhte Spiegel von Angiotensin II und Endothelin-1 führen zu einer Aktivierung von STAT3, was wiederum mit einer gesteigerten glattmuskulären Proliferation und Apoptose-Resistenz in Verbindung gebracht wurde [36, 209-211]. Ein weiterer Faktor, der einen relevanten Einfluss auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration sowie Apoptoseresistenz haben könnte, ist das Gewebshormon Sphingosin-1-Phosphat. Die Bildung von Sphingosin-1-Phosphat wird durch die Sphingosin-Kinase-1 katalysiert, die HIF1 $\alpha$ -abhängig exprimiert wird und bei Hypoxie in PAGMZ akkumuliert. Sphingosin-1-Phosphat konnte bereits als wichtiger Faktor mit hypoxischen Lungenerkrankungen und der HPV in Verbindung gebracht werden [20]. In humanen PAGMZ konnte gezeigt werden, dass HIF1 $\alpha$  die Proliferation zudem über Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise FGF-2 und PDGF, beeinflusst. Ein KO von HIF1 $\alpha$  in humanen PAGMZ führt aufgrund verringerter promotogener Effekte von FGF-2 und PDGF zu einer verminderte Proliferation humaner PAGMZ [180]. Eine Bedeutung beim HIF-vermittelten PVR glatter Muskelzellen haben möglicherweise auch Proteine des Zytoskeletts. Die Gerüstproteine Four and a half LIM domain protein 1 (FHL-1), Cofilin und Paxillin werden in humanen PAGMZ HIF-abhängig reguliert und bei Hypoxie vermehrt gebildet. Sie sind vor allem in der Media kleiner Pulmonalarterien lokalisiert und daher mögliche Effektoren des HIF-vermittelten Remodelings [212-214]. Neben den direkten Effekten auf das Remodeling von

PAGMZ könnte der glattmuskelzellspezifische HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -KO aber auch das Remodeling des Endothels oder der extrazellulären Matrix beeinflussen. Erhöhte Kupferlevel in PAGMZ wurden mit dem Remodeling der extrazellulären Matrix bei der Hypoxie-induzierten PH in Verbindung gebracht. HIF1 $\alpha$  reguliert dabei die Expression des Kupfertransporters Cu-uptake transporter 1 (CTR 1) und somit auch die Kupferkonzentration in PAGMZ [215, 216]. Außerdem wäre eine HIF-vermittelte Aufhebung der endothelial-mesenchymalen Transition denkbar. Sobald Endothelzellen im Rahmen der endothelial-mesenchymalen Transition glattmuskelzellspezifische Marker, wie beispielsweise  $\alpha$ -sm-actin, exprimieren, würde der HIF-KO aktiv werden, da er selbst unter der Kontrolle eines glattmuskel-spezifischen Promotors steht. Auf diese Weise wäre es denkbar, dass unser Modell des glattmuskelzellspezifischen HIF-KO nicht nur präexistente PAGMZ betrifft, sondern auch die unter chronischer Hypoxie zu mesenchymalen Zellen transformierenden Endothelzellen. Das durch den HIF-KO reduzierte Remodeling dieser Zellen wäre dann eine weitere mögliche Erklärung für die signifikant reduzierte Muskularisierung distaler Pulmonalarterien bei smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen nach Exposition mit chronischer Hypoxie [36]. Möglicherweise spielt dabei der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, ein Zielgen von HIF1 mit erhöhter Expression bei Hypoxie, eine wichtige Rolle. NF- $\kappa$ B ist vor allem bei der Regulation der Immunantwort, der Proliferation und der Apoptose von Zellen von Bedeutung [217]. Es konnte gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B für die endothelial-mesenchymale Transition notwendig ist [218]. NF- $\kappa$ B ist außerdem in die Entstehung von Artherosklerose und Tumorerkrankungen involviert. Dies sind Pathologien, bei denen die endothelial-mesenchymale Transition ebenfalls eine Rolle zu spielen scheint [20, 122]. Sobald Endothelzellen bei Hypoxie im Rahmen der endothelial-mesenchymalen Transition typische glattmuskelzellspezifische Marker exprimieren, käme es nach oben genannter Hypothese durch den HIF-KO zu einer reduzierten Expression von NF- $\kappa$ B. Dies ist dann möglicherweise der Grund für eine Aufhebung der endothelial-mesenchymalen-Transition mit daraus resultierendem reduziertem Auftreten  $\alpha$ -sm-actin-positiver Gefäße bei den untersuchten glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mauslinien.

### **5.2.2 HIF1 $\alpha$ und HIF2 $\alpha$ beeinflussen möglicherweise auch die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion**

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -KO in glatten Muskelzellen das Hypoxie-induzierte PVR vermindert. Es ist wahrscheinlich, dass erhöhte glattmuskuläre HIF-Konzentrationen bei den chronischen Remodelingprozessen eine wichtige Rolle spielen. Andererseits könnte HIF in glatten Muskelzellen aber auch an der HPV beteiligt sein, beispielsweise durch die gesteigerte Aktivität und Expression von spannungsabhängigen Kaliumkanälen oder eine HIF1-abhängige Bildung von Sphingosin-1-Phosphat [20, 173]. Dann würde das Remodeling der extrazellulären Matrix die Pulmonalarterien bei geringerer Konstriktion fixieren und somit bei smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in einem geringeren pulmonalvaskulären Widerstand resultieren. Es gibt Hinweise darauf, dass erhöhte HIF-Level die HPV verstärken sollen [150, 151]. Mithilfe von Inhibitoren der NADPH-Oxidoreduktase konnte die pulmonale Vasokonstriktion verringert werden [219]. Während diese Arbeiten HIF mit einer gesteigerten HPV in Verbindung bringen, zeigen andere Arbeiten gegensätzliche Ergebnisse. So konnte gezeigt werden, dass HIF1 $\alpha$  bei Hypoxie über die vermehrte Expression eines Ionenkanals die Vasokonstriktion von Pulmonalarterien abschwächen kann [220]. In Versuchen mit glattmuskelzellenspezifischen HIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen, bei denen hämodynamische Messungen unter Normoxie und Hypoxie durchgeführt wurden, zeigten die KO-Mäuse unter Normoxie und Hypoxie höhere rechtsventrikuläre Drücke als Wildtyp-Mäuse [205]. Das PVR nach chronischer Hypoxie zeigte bei dieser Arbeit keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen. Die erhöhten rechtsventrikulären Drücke in smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen begründen die Autoren durch eine verstärkte HPV aufgrund einer gesteigerten Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung [205]. Diese hämodynamischen Messungen zeigen in entgegengesetzte Richtung und widersprechen in Teilen den Resultaten dieser und anderer Arbeiten, die einen glattmuskulären HIF1 $\alpha$ -KO mit einer verringerten CHPH in Verbindung bringen [48]. Bei unseren Ergebnissen fand sich unter Normoxie kein Unterschied der rechtsventrikulären Druckwerte zwischen Wildtyp- und smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen. Nach chronischer Hypoxie zeigten sich bei smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen dagegen

signifikant geringere rechtsventrikuläre Druckwerte mit einem deutlichen Unterschied im PVR. Anders als in der beschriebenen Arbeit [205] erfolgten die hämodynamischen Messungen der Hypoxiegruppen nach unserem Versuchsprotokoll nicht unter hypoxischen Umgebungsbedingungen, sondern nach 60-minütiger Reoxygenierung unter Normoxie, um akute Hypoxie-induzierte Effekte auf den Gefäßtonus aufzuheben. Die hämodynamischen Messwerte sind daher nur bedingt vergleichbar. Sollte ein HIF1 $\alpha$ -KO in PAGMZ tatsächlich neben einem verminderten PVR eine verstärkte HPV zur Folge haben, könnte dies eine Erklärung zur Entstehung der RVH trotz vermindertem PVR sein (s. Abb. 19). Experimente mit PAGMZ von Patienten mit PAH deuten ebenfalls auf eine inverse Korrelation von HIF1 $\alpha$ -Aktivität und Kontraktilität der PAGMZ hin. Die PAGMZ von Patienten mit PAH zeigen in primären Zellkulturen eine verminderte Expression von HIF1 $\alpha$  und spannungsabhängigen Kaliumkanälen sowie eine erhöhte Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung und Konstriktion [221]. Eine Erklärung für den Effekt von glattmuskulärem HIF1 $\alpha$  auf den verminderten pulmonalarteriellen Gefäßtonus könnte sein, dass eine Erhöhung von HIF1 $\alpha$  bei anhaltender Hypoxie im Sinne einer negativen Rückkoppelung vasodilatatorische Effekte hat, um so eine überschießende Vasokonstriktion mit stark limitiertem Blutfluss zu verhindern [42]. Heterozygote HIF1 $\alpha$ -KO-Mäuse zeigen nach chronischer Hypoxie sowohl unter Hypoxie als auch nach Reoxygenierung reduzierte rechtsventrikuläre Drücke im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen [152]. Zwischen der Messung unter Hypoxie und nach Reoxygenierung bestand bei Wildtyp- und bei KO-Mäusen kein signifikanter Unterschied. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der vasomotorische Anteil an den erhöhten rechtsventrikulären Druckwerten von Wildtyp-Mäusen nach 3 Wochen chronischer Hypoxie unbedeutend ist, und dass ein heterozygoter HIF1 $\alpha$ -KO nicht zu einer relevanten Zunahme der HPV, sondern vor allem zu einem verminderten PVR führt [152]. Die rechtsventrikulären Druckwerte von heterozygoten HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen unterscheiden sich bei akuter Hypoxie nicht. Eine globale Reduktion der HIF2 $\alpha$ -Level führt demnach im Mausmodell bei kurzfristiger Hypoxie nicht zu einer verstärkten oder abgeschwächten HPV. Das verminderte PVR sowie die reduzierte RVH nach chronischer Hypoxie ist daher auch bei heterozygoten HIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen vermutlich nicht auf eine veränderte HPV zurückzuführen

[153]. Welchen Effekt HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in PAGMZ und anderen Zelltypen auf die HPV und den pulmonalarteriellen Gefäßtonus haben, ist aktuell noch nicht ausreichend verstanden und wird kontrovers diskutiert. Unsere Daten zeigen zusammen mit der bestehenden Literatur zu diesem Thema, dass Hypoxie-induzierbare Faktoren insbesondere über die Förderung des PVR zur CHPH führen. Weitere Arbeiten zu den HIF-vermittelten Mechanismen in Endothel und PAGMZ sind für ein umfassenderes Verständnis nötig, um daraus neue therapeutische Strategien zu entwickeln.

### **5.3 Pathogenese der Hypoxie-assoziierten rechtsventrikulären Hypertrophie**

#### **5.3.1 Sowohl Wildtyp- als auch glattmuskelzellspezifische HIF $\alpha$ -Knockout-Mäuse entwickeln eine rechtsventrikuläre Hypertrophie nach Hypoxie**

Neben den Wildtyp-Mäusen entwickeln auch alle drei smHIF $\alpha$ -KO-Mauslinien gleichermaßen eine rechtsventrikulären Hypertrophie (RVH) nach 3 Wochen chronischer Hypoxie. Die Evaluation der RVH erfolgte durch Messung der Masse des rechten Ventrikels, Schichtdickenbestimmung der rechtsventrikulären Muskelschicht sowie Analyse der Durchmesser rechtsventrikulärer Kardiomyozyten. Die Ergebnisse dieser drei untersuchten Merkmale zeigen allesamt in die gleiche Richtung. SmHIF $\alpha$ -KO-Mäuse sind also nicht vor der Entwicklung einer RVH durch Hypoxie geschützt, obwohl sie vor dem PVR und der CHPH geschützt sind. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da die RVH bisher als Folge des erhöhten rechtsventrikulären Widerstands und Drucks betrachtet wird. Unter pathophysiologischen Gesichtspunkten wird eine direkte Korrelation angenommen und erscheint schlüssig. Bei Mäusen mit einem ausgeprägten Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks nach chronischer Hypoxie wäre eine entsprechend stark ausgeprägte RVH naheliegend. Durch das Hypoxie-induzierte PVR steigt der pulmonalvaskuläre Widerstand, weshalb der rechtsventrikuläre Druck wiederum ansteigt, um bei erhöhter Nachlast das Herzzeitvolumen aufrecht zu erhalten. Durch Mehrarbeit des rechten Herzmuskels hypertrophiert dieser und die Masse nimmt zu [222, 223]. Je höher der pulmonalarterielle Druck einer Maus,

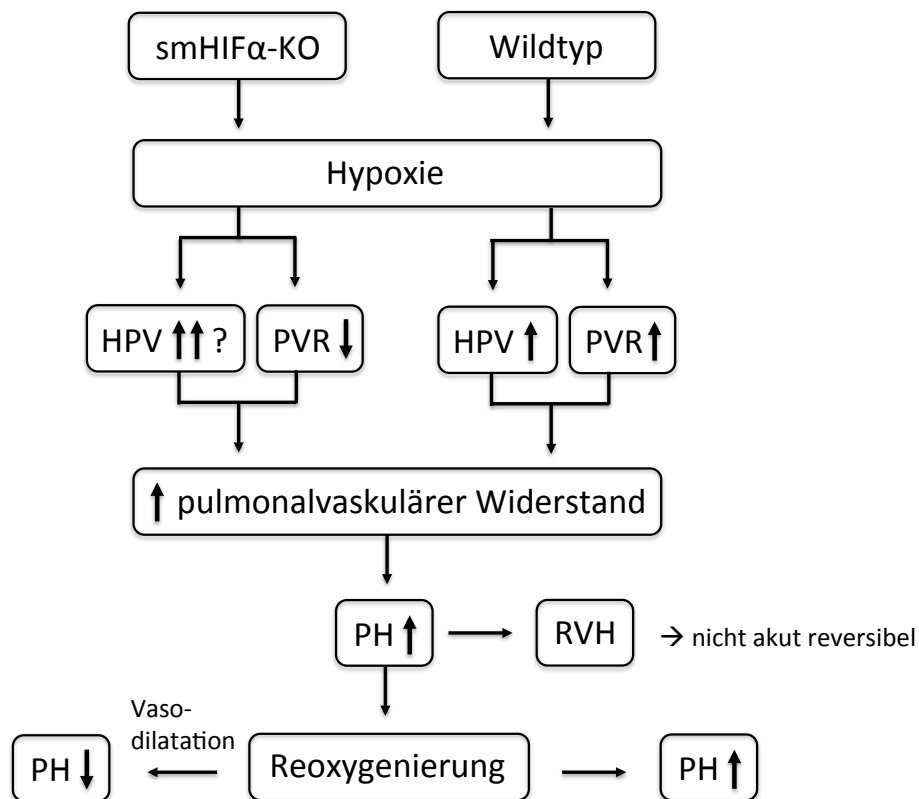


desto stärker ausgeprägt müsste die RVH nach pathophysiologischem Denkmodell sein. Interessanterweise bestätigt sich dieser vermutete Zusammenhang nach Analyse unserer Daten nicht. Eine Korrelationsanalyse zwischen rechtsventrikulärem Druck und rechtsventrikulärer Masse zeigt keinen Zusammenhang bei den Mäusen nach chronischer Hypoxie. Die Entwicklung der RVH scheint möglicherweise von der Ausprägung der PH entkoppelt zu sein und unabhängig davon als Folge chronischer Hypoxie zu entstehen.

### **5.3.2 Rechtsventrikuläre Hypertrophie ist nicht nur auf pulmonalarteriellen Druck zurückzuführen**

Der Zusammenhang zwischen pulmonalvaskulärem Remodeling, PH und der Entwicklung einer RVH scheint komplexer als ursprünglich gedacht. Trotz einer zumindest partiellen Protektion der smHIF $\alpha$ -KO-Mäuse vor der Entwicklung einer CHPH, zeigte sich eine RVH nach Exposition mit chronischer Hypoxie. Eine fehlende Korrelation von PVR, rechtsventrikulärem Druck und rechtsventrikulärer Masse wurde in weiteren Tiermodellen zum PVR oder der PH beschrieben. Daley und Kollegen berichten beispielsweise von einem Mausmodell, bei dem mittels Th2-Immunantwort ein PVR induziert wird. Interessanterweise zeigen diese Mäuse trotz deutlichen pulmonalarteriellen Veränderungen keine PH und keine RVH. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass das PVR in der Maus daher nicht obligat mit erhöhten pulmonalarteriellen Drücken und einer RVH einhergehen muss [224]. Weitere Studien mit Mausmodellen der PH, bei denen die Mäuse durch einen Elastinmangel oder Adenosinrezeptor-KO eine PH entwickeln, sehen ebenfalls eine Entkopplung von pulmonalarteriellen Druck und RVH [63, 225, 226]. Die Auswirkungen eines HIF $\alpha$ -KO in PAGMZ sind aktuell noch nicht verstanden. Inwieweit dieser Knockout auf die HPV oder das PVR wirkt, kann auch mit den vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden. In Experimenten mit smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Mäuse unter hypoxischer Beatmung erhöhte Drücke aufweisen. Die Autoren dieser Studie vermuten eine gesteigerte HPV, welche auf eine übermäßige, HIF1 $\alpha$ -KO-bedingte Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung zurückzuführen ist [205]. Dass

der KO von HIF in PAGMZ zu einer verstärkten HPV und zu einem verminderten chronischen PVR nach Hypoxie führt, ist denkbar. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass alle smHIF $\alpha$ -KO-Mauslinien ein reduziertes PVR nach Hypoxie aufweisen. Die Entstehung einer RVH trotz reduziertem PVR wurde bei smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen bereits beschrieben [48]. Unter chronischer Hypoxie würde eine verstärkte HPV bei smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen trotz vermindertem PVR zu einem erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand führen, was eine RVH als Folge hätte (Abb. 19). Möglicherweise reicht auch eine den Wildtyp-Mäusen vergleichbare HPV zur Entwicklung einer Hypoxie-assoziierten RVH. Da unsere hämodynamischen Messungen nach Reoxygenierung unter Normoxie durchgeführt wurden, wird ein möglicher Effekt des glattmuskulären HIF $\alpha$ -KO auf die HPV in unseren Daten nicht erfasst. Unterschiede sind daher nur auf das PVR zurückzuführen. Im Ergebnis resultiert also möglicherweise bei Wildtyp- und smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen unter Hypoxie ein vergleichbarer pulmonalvaskulärer Widerstand, der zur RVH führt. Im Rahmen der Reoxygenierung würde sich der pulmonalvaskuläre Widerstand bei smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen wieder reduzieren, da bei steigendem O<sub>2</sub> und vermindertem PVR eine stärkere Dilatationsfähigkeit der Pulmonalgefäße gegeben wäre. Eine RVH wäre dagegen nicht so schnell reversibel und im Vergleich zum pulmonalvaskulären Widerstand und pulmonalarteriellen Hochdruck fortbestehend (Abb. 19).



**Abb. 19: Hypothese zur Pathogenese der rechtsventrikulären Hypertrophie bei glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mäusen.**

Das Fehlen von HIF $\alpha$  in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PAGMZ) führt bei Hypoxie möglicherweise zu einer verstärkten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) und einem verminderten pulmonalvaskulären Remodeling (PVR). Daraus würde dann, wie gleichermaßen in Wildtyp-Mäusen, ein erhöhter pulmonalvaskulärer Widerstand resultieren, der eine pulmonale Hypertension (PH) und rechtsventrikuläre Hypertrophie (RVH) zur Folge hat. Bei Reoxygenierung könnte sich aufgrund des Überwiegens der akut-vasokonstriktorischen Komponente gegenüber dem chronischen PVR bei smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen eine bessere Reversibilität der PH zeigen. Bei Normoxie käme es zur Vasodilatation der Pulmonalarterien und der rechtsventrikuläre Druck würde folglich absinken. Da die RVH nicht unmittelbar reversibel ist, würde diese nach Hypoxie in smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen persistieren.

Die Korrelation zwischen pulmonalarteriellem Druck und RVH ist bisher nicht verstanden. In den Experimenten mit dem HIF-Inhibitor Digoxin wurde ebenfalls eine Diskrepanz zwischen rechtsventrikulärem Druck und RVH festgestellt. Die Applikation von Digoxin führt im Mausmodell der CHPH zur Normalisierung der rechtsventrikulären Druckwerte, kann jedoch die Entwicklung einer RVH nicht

verhindern. Da bei Digoxin-Applikation unter Normoxie keine erhöhte rechtsventrikuläre Masse gemessen wurde, beeinflusst Digoxin die RVH vermutlich nicht [169]. Möglicherweise entsteht die RVH bei KO von HIF1 $\alpha$  und/oder HIF2 $\alpha$  in PAGMZ also wie beschrieben aufgrund einer verstärkten HPV, die nach Reoxygenierung nicht mehr detektierbar ist. Die hämodynamischen Messungen von heterozygoten HIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen unter Hypoxie und nach Reoxygenierung zeigen in früheren Arbeiten nur geringe Druckunterschiede [152]. Dabei ist zu beachten, dass ein globaler Mangel von HIF1 $\alpha$  bei einem heterozygoten KO vermutlich andere Auswirkungen auf die HPV, das PVR und die RVH hat als ein selektiver HIF1 $\alpha$ -KO in glatten Muskelzellen. Von einigen Autoren wird weiterhin vermutet, dass Hypoxie einen direkten Effekt auf das rechtsventrikuläre Myokard hat, unabhängig von der pulmonalvaskulären Antwort auf Hypoxie [169]. Darauf deuten auch die Ergebnisse einer Arbeit mit Hämoxygenase-1-KO-Mäusen, denen zur Protektion vor Hypoxie-assoziierten Veränderungen Kohlenstoffmonoxid oder das Antioxidans Biliverdin appliziert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass Biliverdin kardioprotektive Effekte hat und Hämoxygenase-1-KO-Mäuse vor der Entwicklung einer überschießenden RVH mit Fibrose schützt. Die Inhalation von Kohlenstoffmonoxid schützt dagegen sowohl Hämoxygenase-1-KO- als auch Wildtyp-Mäuse vor einer Hypoxie-induzierten PH mit PVR, hat aber keinen Effekt auf die Entstehung von RVH und myokardialer Fibrose. Die Entwicklung der RVH trotz normwertigen rechtsventrikulären Druckwerten spricht dabei für eine Entkopplung von rechtsventrikulärem Druck und RVH im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH [38]. Dass die RVH also sowohl durch eine erhöhte pulmonalarterielle Druckbelastung als auch durch direkte Hypoxie-assoziierte Effekte beeinflusst wird, ist möglich. Welche Rolle dabei HIF in rechtsventrikulären Kardiomyozyten spielt, ist aktuell noch unklar. Ein globaler, heterozygoter KO von HIF1 $\alpha$  oder HIF2 $\alpha$  ist im Mausmodell der CHPH protektiv für das kardiale Remodeling. Die verminderten HIF-Level führen zu einer Abschwächung der RVH [152, 153, 173]. In den in dieser Arbeit eingesetzten Mäusen ist der KO spezifisch für glatte Muskelzellen. HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  sind somit in anderen Zelltypen unbeeinflusst exprimiert, ebenso in Herzmuskelzellen [48]. Da sich bei smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen nach Hypoxie eine verminderte PH zeigt, die RVH jedoch unverändert auftritt, ist es denkbar, dass

HIF in Herzmuskelzellen beim Hypoxie-induzierten kardialen Remodeling entscheidend mitwirkt und so bei Hypoxie über einen direkten Effekt eine RVH begünstigt. Ein möglicher Mechanismus wäre beispielsweise die bei Hypoxie gesteigerte Expression von Endothelin-1 und platelet-derived growth factor B (PDGF-B). Erhöhte Level von Endothelin-1 und PDGF-B werden mit der Hypertrophie von Kardiomyozyten in Zusammenhang gebracht [227, 228]. HIF aktiviert die Transkription von Endothelin-1 direkt, während die Hochregulation von PDGF-B vermutlich indirekt erfolgt [153]. Der Vergleich von verschiedenen Modellen der RVH bei Ratten gibt weitere Hinweise, dass eine chronische rechtsventrikuläre Druckbelastung allein nicht ausreicht, um die Entstehung einer RVH und Rechtsherzinsuffizienz zu erklären. Pulmonalarterielle Banding bei Ratten führt aufgrund der Pulmonalstenose zu einem Anstieg der rechtsventrikulären Druckwerte und einer RVH, jedoch nicht zur Einschränkung der rechtsventrikulären Funktion. Bei Injektion mit dem VEGF-Rezeptor-Inhibitor Sugen 5416, kombiniert mit chronischer Hypoxie, zeigen sich dagegen eine überschießende RVH und Zeichen einer rechtsventrikulären Insuffizienz. Obwohl der Anstieg rechtsventrikulärer Druckwerte bei diesen beiden Modellen vergleichbar ist, unterscheidet sich die kardiale Antwort deutlich. Die Autoren dieser Arbeit kommen zu dem Schluss, dass die erhöhte rechtsventrikuläre Nachlast demnach nicht alleine für das kardiale Remodeling verantwortlich sein kann [222, 229, 230]. Diese Ergebnisse deuten neben klinischen Beobachtungen darauf hin, dass ein gesteigerter pulmonalarterieller Druck nicht die einzige Ursache für eine rechtsventrikuläre Insuffizienz ist, wie sie bei Patienten mit PAH auftritt. Hypoxie per se beeinflusst also möglicherweise das rechtsventrikuläre Remodeling, unabhängig von den Effekten auf die PH. Bei VEGF-Rezeptor-Blockade und Hypoxie zeigen sich im rechtsventrikulären Myokard im Vergleich zum Modell des pulmonalarteriellen Bandings deutlich höhere Level von HIF1 $\alpha$  [48, 222]. Kardiale Hypoxie als Stimulus für die Entwicklung einer RVH ist neben dem pulmonalarteriellen Druck also möglicherweise ein bedeutender Einflussfaktor, der auf transkriptioneller Ebene von HIF beeinflusst werden könnte. Eine im rechten Ventrikel isoliert gesteigerte Expression von VEGF, einem HIF-Zielgen, wurde im Modell der CHPH ebenfalls beobachtet. Dies spricht für eine entscheidende Rolle von HIF beim rechtsventrikulären Remodeling, einer Ventrikel-spezifischen Antwort auf

Hypoxie [231]. Ob Veränderungen der Genexpression dabei durch eine erhöhte Druckbelastung oder durch direkte Hypoxie-assoziierte Effekte ausgelöst werden, ist noch nicht ausreichend verstanden. Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass der rechte und linke Ventrikel unabhängig voneinander mit unterschiedlichen Genexpressionsprofilen auf Hypoxie reagieren. HIF beeinflusst dabei die transkriptionale Regulation im rechten Ventrikel, indem HIF-regulierte Signalwege verstärkt aktiv werden. Somit ist myokardiales HIF wahrscheinlich an der adaptiven Antwort des rechten Ventrikels auf Hypoxie beteiligt [232]. Während physiologische HIF-Level für eine normale kardiovaskuläre Entwicklung und Funktion notwendig und sogar kardioprotektiv sind, kann eine chronische Aktivierung der HIF-regulierten Signalwege im Herzen zu einer kardialen Degeneration mit Progression bis hin zur Herzinsuffizienz führen [233, 234]. Eine verminderte HIF-Aktivität in rechtsventrikulären Kardiomyozyten könnte bei Patienten mit PAH die Progression des kardialen Remodelings möglicherweise positiv beeinflussen und damit bestehende Therapien sinnvoll ergänzen. Die Regulation und Funktion von HIF im Herzen genauer zu verstehen, ist daher von großem Interesse. Die PAH beim Menschen entwickelt sich häufig infolge chronischer Hypoxie und führt zu schweren Einschränkungen der rechtsventrikulären Funktion. Ein besseres Verständnis der direkten Effekte systemischer Hypoxie auf Herzmuskelgewebe könnte zur Entwicklung neuer spezifischer Therapien führen, die das Risiko einer Rechtsherzinsuffizienz senken und damit die Haupttodesursache von Patienten mit PAH bekämpfen könnten. Darüber hinaus zeigen uns die aktuellen Forschungsergebnisse, dass pharmakologische Behandlungskonzepte der PAH, die zu einer Reduktion des pulmonalarteriellen Drucks führen, nicht zwingend kardioprotektiv sind und das Outcome für Patienten mit PAH daher möglicherweise nicht verbessern können. Es ist daher wichtig, neue therapeutische Optionen in beiden Organsystemen zu evaluieren [38].

### 5.3.3 Rechtsventrikuläre Funktion ist durch Hypoxie nicht eingeschränkt

Chronische Hypoxie führte bei den in dieser Arbeit eingesetzten Wildtyp-Mäusen zu keiner signifikanten Veränderung der  $dP/dt_{\max}$ - und  $dP/dt_{\min}$ -Werte. Durch die RVH kann der rechte Ventrikel vermutlich mehr Kraft aufbringen und die rechtsventrikuläre Funktion trotz entstandener PH aufrechterhalten. Die Dilatationsfähigkeit des rechten Ventrikels scheint durch die RVH bei hypoxischen Wildtyp-Mäusen nicht beeinträchtigt zu sein. Wie in der Literatur beschrieben, führt das Tiermodell der CHPH bei Nagetieren nicht zur Rechtsherzinsuffizienz, wie sie beim Menschen im Endstadium der PH auftritt [70, 75]. Bei den Mauslinien smHIF1 $\alpha$  und smHIF2 $\alpha$  zeigte sich dagegen verglichen zwischen Normoxie und Hypoxie eine Reduktion der  $dP/dt_{\max}$ - und  $dP/dt_{\min}$ -Werte, was auf eine Beeinträchtigung der rechtsventrikulären Funktion nach chronischer Hypoxie hindeuten kann. Die Tatsache, dass  $dP/dt_{\max}$  und  $dP/dt_{\min}$  jedoch von Herzfrequenz, myokardialer Hypertrophie sowie Vor- und Nachlast beeinflusst werden, erschwert die Interpretation der Ergebnisse [69, 191]. So ist die Nachlast bei smHIF1 $\alpha$ - und smHIF2 $\alpha$ -Mäusen nach Hypoxie vermutlich geringer als bei Wildtyp-Mäusen, da pulmonalvaskulärer Widerstand und pulmonalarterieller Druck nicht so stark erhöht sind. Da der rechte Ventrikel dann weniger hohe Spitzendrücke aufbringen muss, um das Blutvolumen in den Lungenkreislauf auszuwerfen, ist kein so rascher Druckanstieg wie bei Wildtyp-Mäusen notwendig. Der Grund für eine Reduktion der  $dP/dt_{\max}$ - und  $dP/dt_{\min}$ -Werte zwischen normoxischen und hypoxischen smHIF1 $\alpha$ -KO- und smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen besteht möglicherweise darin, dass die rechtsventrikuläre Blutdruckamplitude geringer ist als bei normoxischen Bedingungen. Daraus resultiert eine geringere Steigung der Blutdruckkurve und damit ein geringerer maximaler Druckanstieg bzw. -abfall. Es ist jedoch auch denkbar, dass die RVH nach Hypoxie die Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit des rechten Ventrikels negativ beeinflusst. In weiteren Arbeiten zu diesem Thema wurde bei smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen nach Hypoxie echokardiographisch trotz RVH keine relevante Beeinträchtigung der rechtsventrikulären Herzfunktion gesehen [48]. Bei heterozygoten HIF2 $\alpha$ -Mäusen findet sich im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach Hypoxie ebenfalls keine Beeinträchtigung von Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit. Diese Mäuse mit globaler Reduktion

von HIF2 $\alpha$  entwickeln nach Hypoxie jedoch auch keine Zeichen einer RVH [153]. Das angewendete Mausmodell der CHPH ist zur Untersuchung einer progredienten Rechtsherzinsuffizienz bei PH nicht geeignet [63, 70, 75]. Dies bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Experimente, bei denen sich zwischen Normoxie- und Hypoxiegruppe der Wildtyp-Mäuse kein relevanter Unterschied in der rechtsventrikulären Funktion zeigt.

## **5.4 Limitationen und mögliche Fehlerquellen**

### **5.4.1 Gewebespezifische Knockout-Mauslinien**

Die größte Herausforderung bei der Erzeugung von gewebespezifischen KO-Mauslinien ist die genaue Bestimmung des Expressions- und Aktivitätsprofils der Rekombinase, um eine korrekte Analyse des Phänotyps der gewebespezifischen Knockout-Maus durchführen zu können. Das in unserer Arbeit verwendete Cre/loxP-System ist dabei das meist-verwendete und best-studierte Rekombinase-System für die Erzeugung von gewebespezifischen Knockouts [185]. Obwohl dieses System in den meisten Fällen effizient und zuverlässig ist, vertraut es auf die richtige Steuerung der Cre-Expression durch einen geeigneten zelltyp-spezifischen Promotor. Der Promotor sm22 soll zwar spezifisch für glatte Muskelzellen sein [188], könnte jedoch theoretisch auch in anderen Zelltypen durch eine unerwartete Cre-Expression zu einem Knockout des Zielgens führen. Neben der Spezifität, kann auch die Effizienz der Rekombination beeinträchtigt sein. Die DNA-Methylierung, transkriptionale Aktivität und Chromatinstruktur am Ort des geflochten Zielgens im Genom scheinen die Effizienz der Rekombination zu beeinflussen [185]. Es gibt Hinweise dafür, dass der sm22-Promotor möglicherweise während der Embryogenese auch in Herzmuskelzellen des rechten Ventrikels vorübergehend Aktivität zeigt [188]. Sollte es während dieser Periode zu einer Expression der Cre-Rekombinase kommen, würde das zu einer Exzision und damit zu einem Fehlen von HIF in diesen Zellen führen. In einer bereits veröffentlichten Arbeit, bei der ebenfalls smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäuse eingesetzt wurden, konnte im Herzmuskelgewebe jedoch kein Unterschied der HIF1 $\alpha$ -Expression zwischen Wildtyp- und smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen detektiert werden. Bei



dieser Arbeit erfolgte die Herstellung von smHIF1 $\alpha$ -KO-Mäusen ebenfalls durch Verpaarung von geflochten HIF1 $\alpha$ -Mäusen mit einer Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des sm22-Promotors exprimiert [205]. Ein denkbarer Nebeneffekt bei den verwendeten Mauslinien ist also, dass HIF möglicherweise nicht ausschließlich in glatten Muskelzellen ausgeschaltet wurde, sondern auch in anderen Zelltypen. Dies könnte den Phänotyp der Mäuse beeinflusst haben. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass der Knockout aufgrund einer beschränkten Effizienz der Rekombination nicht so zuverlässig stattfindet wie angenommen. Der Knockout ist bei den in dieser Arbeit eingesetzten Tieren dauerhaft aktiv und wurde nicht später induziert. Daher ist nicht auszuschließen, dass der Knockout die kardiopulmonale Entwicklung der Mäuse während der Embryogenese beeinflusst hat, was zu unerwünschten Effekten auf das pulmonalvaskuläre Gefäßbett der Mäuse mit Auswirkung auf die vorliegenden Ergebnisse geführt haben könnte [140]. Weiterhin kann der genetische Background der Knockout-Mäuse Einfluss auf Spezifität und Effizienz haben [185]. Und schließlich gibt es noch Beobachtungen über unspezifische toxische Effekte von Cre bei manchen Cre-Mauslinien, unabhängig von der eigentlichen genetischen Modifikation. Diese sind möglicherweise Folge endogener loxP-Sequenzen im Genom, die bei Aktivierung zu zytotoxischen, chromosomalen Abberationen führen können [235].

#### **5.4.2 Versuchsaufbau und -bedingungen**

Das Mausmodell der CHPH führt zum PVR, einem erhöhten rechtsventrikulären Druck und einer RVH. Eine Messung der linksatrialen Druckwerte oder des pulmonalkapillären Verschlussdrucks ist aufgrund der anatomischen Gegebenheiten in der Maus technisch schwierig. Eine Bestimmung des rechtsventrikulären Widerstands in-vivo war daher leider nicht möglich. Es ist bei Betrachtung der Daten jedoch davon auszugehen, dass eine Erhöhung der rechtsventrikulären Drücke mit einem erhöhten rechtsventrikulären Widerstand einhergeht. Dieser steht im direkten Zusammenhang mit dem PVR, das durch die Vasokonstriktion und Obliteration der Lungengefäße charakterisiert wird [48,

63, 70]. Eine Veränderung der intrakardialen Druckwerte aufgrund von Schmerzreizen, die durch die transthorakale Punktion hervorgerufen werden, ist möglich, jedoch bei ausreichender Narkosetiefe mit engmaschigem Monitoring unwahrscheinlich. Die hämodynamischen Messungen erfolgten sowohl bei der Normoxie- als auch der Hypoxiegruppe unter normoxischen Versuchsbedingungen, um akute Hypoxie-induzierte vasokonstriktorische Effekte aufzuheben. Aufgrund der schnellen Degradation von HIF $\alpha$  unter Normoxie ist davon auszugehen, dass eine 60-minütige Reoxygenierung nach Exposition mit chronischer Hypoxie ausreicht, um die HIF $\alpha$ -Level im Gewebe zu verändern. Eine direkte immunhistochemische Detektion von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  im Lungengewebe der Versuchstiere war nicht möglich. Proteinbestimmungen in kompletten Lungengewebe-Homogenisaten sind nicht repräsentativ für die Protein-Level in PAGMZ. Eine Isolation der PAGMZ wäre daher notwendig, um gewebespezifische HIF $\alpha$ -Level in PAGMZ bestimmen zu können. Da eine Degradation von HIF $\alpha$  bei Normoxie jedoch bereits innerhalb von Minuten stattfindet, sind die HIF $\alpha$ -Level nach Reoxygenierung nicht repräsentativ und lassen keine validen Rückschlüsse auf die HIF $\alpha$ -Konzentrationen unter hypoxischen Bedingungen zu. In normoxischen Geweben ist HIF $\alpha$ -Protein nur sehr schwierig und in geringen Konzentrationen nachweisbar. In Arbeiten mit Versuchsmodellen isolierter Lungen, die perfundiert und mit unterschiedlichen O<sub>2</sub>-Konzentrationen ventiliert wurden, konnte HIF1 $\alpha$  bei einer inspiratorischen O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 0% und 4% detektiert werden. Bereits bei einer Ventilation mit 7% O<sub>2</sub>-Anteil konnte kein HIF1 $\alpha$  mehr im Lungengewebe nachgewiesen werden [158]. Auch bei Mäusen, die nach chronischer Hypoxie mit 10% O<sub>2</sub> unter hypoxischen Bedingungen hämodynamisch untersucht wurden, konnte HIF1 $\alpha$  im Lungengewebe post mortem nicht detektiert werden [152]. Über die tatsächlichen HIF $\alpha$ -Level in den Geweben der eingesetzten Mäuse lässt sich daher keine genaue Aussage treffen. In Vorversuchen mit smHIF1 $\alpha$ -KO- und smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen konnte der KO von HIF1 $\alpha$  bzw. HIF2 $\alpha$  in primären Zellkulturen glatter Muskelzellen bestätigt werden. Aufgrund dieser Daten und der bestehenden Literatur zu dem Thema ist davon auszugehen, dass HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in PAGMZ der jeweiligen glattmuskelspezifischen KO-Mauslinien nicht exprimiert ist und dass die glattmuskuläre Expression von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in Wildtyp-Mäusen bei chronischer Hypoxie erhöht ist.

## **5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick**

### **5.5.1 Vergleichbarkeit des Mausmodells der chronisch-hypoxischen pulmonalen Hypertension mit der pulmonalen Hypertension im Menschen**

Die pulmonale Hypertension ist unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache eine komplexe Erkrankung des Menschen. Bisher existiert kein Mausmodell einer schweren angioproliferativen PH, wie sie im Menschen auftritt. In welchem Ausmaß die in den Mausmodellen der PH gewonnenen Informationen auf die humane PH übertragbar sind, ist unklar. Inwieweit die existierenden Tiermodelle der PH für die Testung von neuen pharmakologischen Therapien sinnvoll sind, wird ebenfalls kontrovers diskutiert [63]. Während bei der Entwicklung neuer Modelle zwar Fortschritte gemacht wurden, repräsentiert bisher kein experimentelles Modell die humane Form der PH umfassend in ihrer Komplexität. Es ist daher von großem Interesse, die experimentellen Modelle so weiterzuentwickeln, damit die PH möglichst genau abgebildet und untersucht werden kann. Im Hinblick auf das Verständnis des PVR können wir noch viel über die molekularen Mechanismen von Proliferation, Migration, Hypertrophie und Apoptose lernen. Dass ein einzelner Transkriptionsfaktor oder ein einzelnes Gen diese hochkomplexen Prozesse, an denen viele verschiedene Zelltypen beteiligt sind, umfassend erklärt, scheint unwahrscheinlich [6, 63]. Die Sekretion entzündlicher Mediatoren beispielsweise, die bei der Pathogenese der PH ebenfalls eine Rolle spielt und mit HIF in Verbindung gebracht wird, steht vermutlich vor allem im Zusammenhang mit der Reaktion des Endothels auf chronische Hypoxie. Chronische Inflammation ist im Mausmodell der CHPH jedoch nicht relevant ausgeprägt und spielt daher in der vorliegenden Arbeit eine untergeordnete Rolle [20, 42]. Bei der Entstehung und Progression der RVH sind ebenfalls noch viele Mechanismen ungeklärt. Die Entwicklung neuer Tiermodelle zur Rechtsherzinsuffizienz bei PH mit der Erforschung des rechtsventrikulären Remodelings ist wichtig, um bessere therapeutische Optionen für diese häufig letal verlaufende Erkrankung zu bekommen.

### 5.5.2 Klinische Relevanz

Derzeit existiert kein kurativer Ansatz zur Behandlung der PH beim Menschen. Die derzeit verfügbaren Therapien sind zudem häufig mit starken Nebenwirkungen assoziiert. Aus den Experimenten mit Tiermodellen der PH konnten bereits einige neue und vielversprechende therapeutische Ansätze entwickelt werden. Dazu gehören Hemmstoffe des Rho-Kinase-, NFAT- und HIF-Signaltransduktionsweges, sowie Dichloressigsäure, einem Inhibitor der mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase-Kinase. Weitere Forschung ist notwendig, um weitere Mechanismen und damit neue pharmakologische Angriffspunkte zu entwickeln [6]. Ein genaues Verständnis der Remodelingprozesse ist dafür Voraussetzung, um möglichst zielgerichtete Therapien entwickeln zu können. Die Rolle von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in der Entwicklung der CHPH könnte von bedeutender klinischer Relevanz sein. Glattmuskelzellspezifische HIF $\alpha$ -KO-Mauslinien tolerieren hypoxischen Stress besser als Wildtyp-Mäuse und entwickeln eine signifikant geringere PH mit vermindertem PVR. Die vorliegenden Daten verdeutlichen, dass eine Evaluation über das mögliche therapeutische Potenzial von HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -Inhibitoren von großem Interesse sein könnte. In Anbetracht der aktuell eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten und -erfolge, ist die zielgerichtete Inhibition von HIF möglicherweise ein vielversprechender Ansatz, um eine CHPH zu verhindern oder zu reduzieren. Die Daten von Experimenten mit dem HIF1 $\alpha$ -Inhibitor Digoxin untermauern diese Annahme. Im Mausmodell der CHPH konnte durch gleichzeitige Applikation von Digoxin die Entwicklung einer PH mit PVR verhindert werden [169]. Bei Patienten mit PH und Rechtsherzinsuffizienz konnte mit Digoxin eine leichte Steigerung der Herzleistung sowie eine Senkung des Noradrenalin-Spiegels erreicht werden. Aufgrund der engen therapeutischen Breite, Problemen einer möglichen Toxizität vor allem bei COPD-Patienten und fehlenden Daten, die einen Nutzen von Digoxin zeigen, wird der Einsatz von Herzglykosiden in der Therapie der PH mit Rechtsherzinsuffizienz kontrovers diskutiert [236, 237]. Die Erforschung von weiteren, nebenwirkungsärmeren HIF-Inhibitoren oder pharmakologischen Angriffspunkten in den HIF-Signalwegen ist daher für die Behandlung der PH von großem Interesse. Dies gilt vermutlich nicht nur für die Therapie der

Hypoxie-assoziierten PH. Erstaunlicherweise wurde eine erhöhte Expression von HIF1 $\alpha$  auch in plexiformen Läsionen von Patienten mit schwerer PH beobachtet, die nicht auf chronische Hypoxie zurückzuführen ist [181]. Obwohl die Mechanismen dahinter noch nicht ausreichend verstanden sind, zeigen die vorliegenden Erkenntnisse, dass eine zellspezifische Modulation der Aktivität oder Konzentration von HIF sogar bei der nicht-Hypoxie-assoziierten PH eine erfolgsversprechende therapeutische Option sein könnte [130, 205]. Obwohl die meisten Patienten mit idiopathischer PAH keine Hypoxämie aufweisen, beeinflusst Hypoxie wahrscheinlich die Progression und kontinuierliche Verschlechterung der Erkrankungen. Der partielle oder totale Verschluss von peripheren Lungenarterien und die Rarefizierung pulmonaler Gefäße bei der PAH führen in den distal der Obliteration gelegenen Bereichen zu Ischämien und Hypoxie. Verstärkt wird dieser Effekt durch die pulmonalen Vasokonstriktion [7, 19]. Die Pathobiologie der hypoxischen Areale erinnert dabei an die malignen Erkrankungen. Die regionalen Effekte von Hypoxie führen in Tumoren und vermutlich auch bei der PAH zu einem pathologischen Zellwachstum. Hypoxie reguliert in Tumoren die Apoptose, Zellproliferation, Angiogenese und verändert metabolische Prozesse sowie DNA-Reparaturmechanismen. Damit ist Hypoxie entscheidend an der Progression malignen Erkrankungen beteiligt. Es wurden einige Signalwege und molekulare Mechanismen identifiziert, die sowohl bei der PAH als auch in Tumoren eine wichtige Bedeutung haben [20, 238]. Daher ist es von großem Interesse, die Reaktionen von Zellen, Geweben und ganzen Organismen auf Hypoxie besser zu verstehen. Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft vielversprechende therapeutische Optionen mit sich bringen, um Tumorerkrankungen und Gefäßerkrankungen der Lunge besser kurieren zu können.

## 6. Zusammenfassung

Chronische Hypoxie induziert pulmonale Hypertension, pulmonalvaskuläres Remodeling und rechtsventrikuläre Hypertrophie. Die Pathomechanismen sind bis heute unvollständig verstanden. Hypoxie-induzierbare Faktoren sind wichtige Regulatoren der Transkription in hypoxischen Zellen. Im Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertension vermindert ein systemischer Knockout eines HIF1 $\alpha$ - oder HIF2 $\alpha$ -Allels die pulmonale Hypertension. Obwohl glatte Muskelzellen in der Pathogenese der pulmonalen Hypertension eine wichtige Rolle spielen, wurde die spezifische Rolle von glattmuskulärem HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in diesem Kontext noch nicht ausreichend untersucht. Ziel der Arbeit war es daher, den Beitrag von glattmuskulärem HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  zur Entwicklung der pulmonalen Hypertension als Antwort auf chronische Hypoxie zu evaluieren. Hierfür wurden transgene Mäuse mit gewebespezifischem HIF1 $\alpha$ -, HIF2 $\alpha$ - und HIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Knockout in glatten Muskelzellen generiert, für drei Wochen Hypoxie (10% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxie ausgesetzt, und anschließend durch hämodynamische Messungen und histologische Untersuchungen analysiert. Dabei zeigte sich, dass glattmuskelspezifische HIF1 $\alpha$ -, HIF2 $\alpha$ - und HIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$ -Knockout-Mäuse vor der Entwicklung eines pulmonalvaskulären Remodelings und einer pulmonalen Hypertension durch Hypoxie geschützt waren. Interessanterweise war trotz signifikant niedrigeren rechtsventrikulären Drücken in hypoxischen HIF $\alpha$ -Knockout-Mäusen verglichen mit Kontrollmäusen die rechtsventrikuläre Hypertrophie nicht vermindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen für die Pathogenese des Hypoxie-induzierten pulmonalvaskulären Remodelings und der pulmonalen Hypertension essenziell ist, und deuten auf einen möglicherweise direkten Effekt von Hypoxie auf das rechtsventrikuläre Myokard hin.

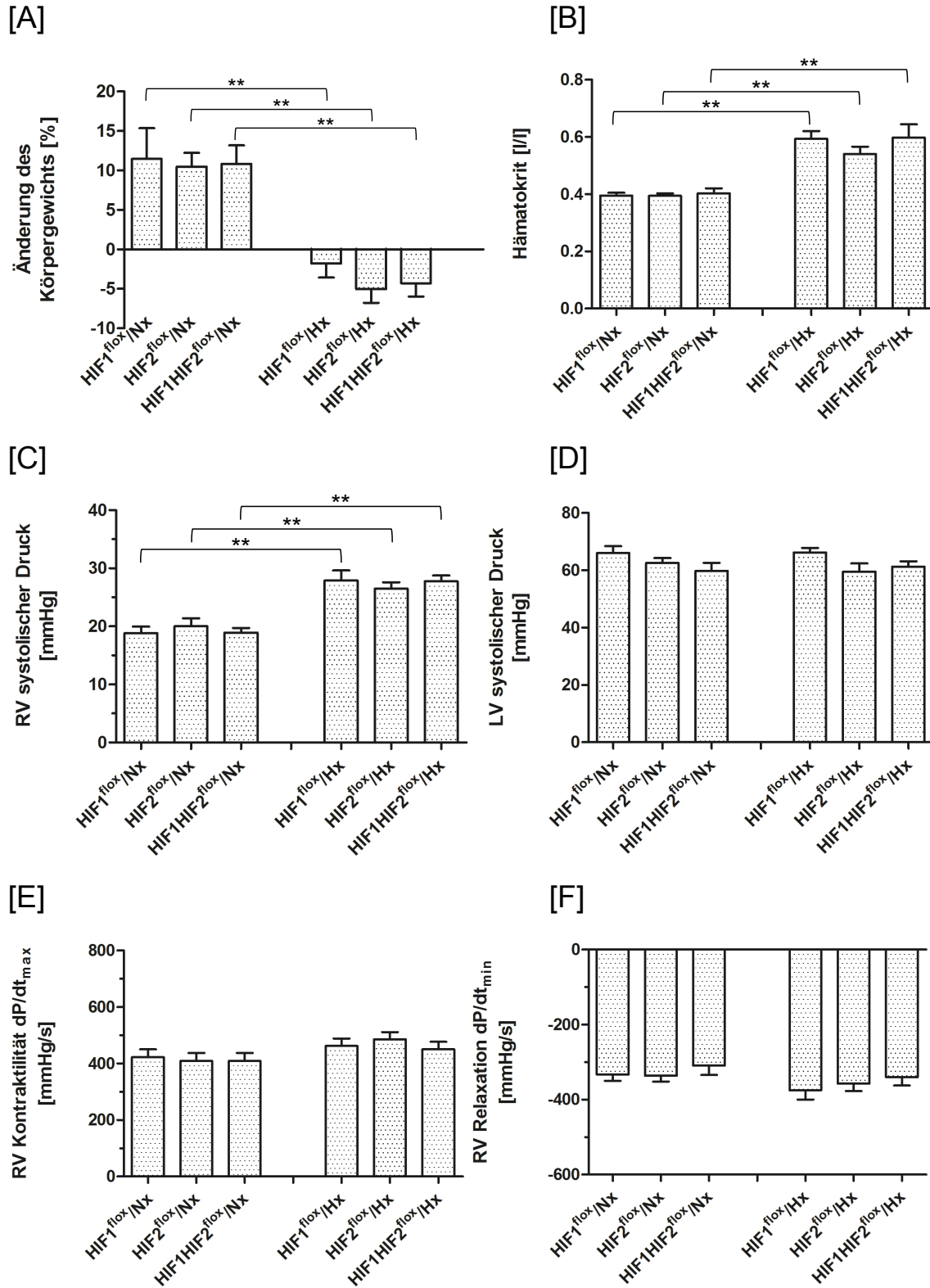
## 6.1 Abstract

Role of smooth muscle HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  in hypoxia-induced pulmonary hypertension

Chronic hypoxia induces pulmonary hypertension, pulmonary vascular remodeling and right ventricular hypertrophy. So far, the mechanisms driving these responses are incompletely understood. Hypoxia-inducible factors are master regulators of transcription in hypoxic cells. Systemic loss of a single HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$  allele has been shown to attenuate pulmonary hypertension in the animal model of hypoxia-induced pulmonary hypertension. Although smooth muscle cells play an important role in the pathogenesis of pulmonary hypertension, the specific role of smooth muscle HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  in this context has not been sufficiently evaluated. The aim of this study was therefore to determine the contribution of smooth muscle HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  to the development of pulmonary hypertension in response to chronic hypoxia. Therefore transgenic mice with conditional knockout of HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  and HIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  in smooth muscle cells were generated and exposed to normoxia or hypoxia (10% O<sub>2</sub>) for three weeks. Mice were analyzed by hemodynamic measurements and histological studies. Smooth muscle HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  and HIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  knockout mouse models were protected against the development of pulmonary vascular remodeling and pulmonary hypertension by hypoxia. However, although right ventricular pressure was significantly lower in hypoxic HIF $\alpha$  knockout mice compared to control mice, the development of right ventricular hypertrophy was not compromised. These findings demonstrate that the presence of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  in pulmonary vascular smooth muscle cells is essential for the pathogenesis of hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling and subsequently of pulmonary hypertension, and suggest a potential direct effect of hypoxia on the right ventricular myocardium.

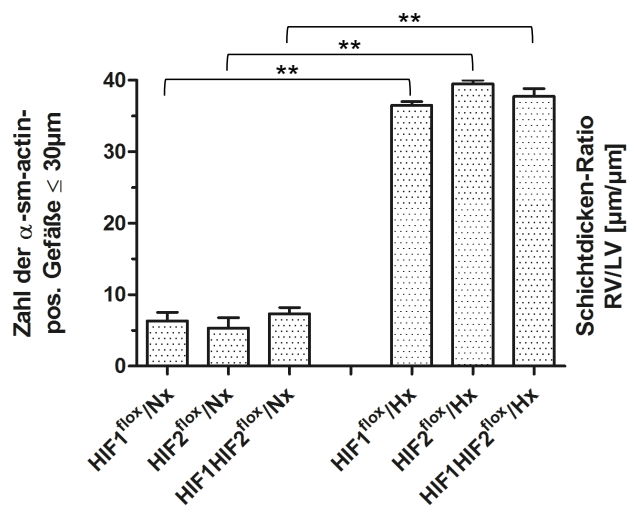
## 7. Ergänzende Daten

### 7.1 Vergleich der Cre-negativen Kontrollmauslinien

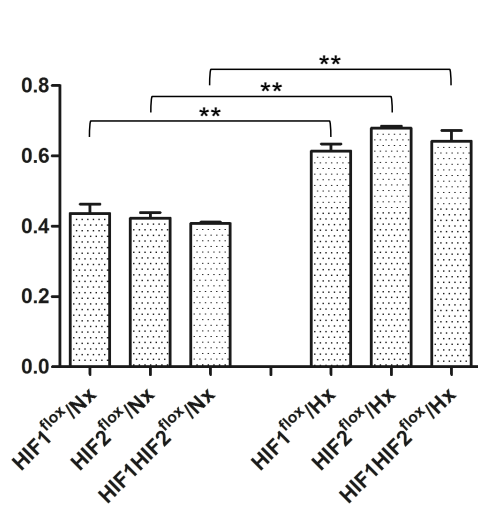




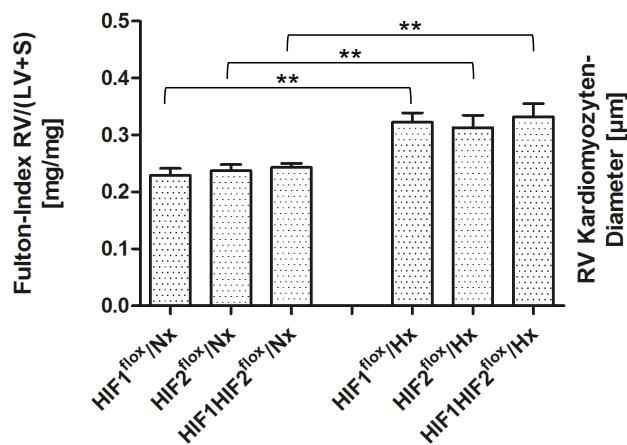
[G]



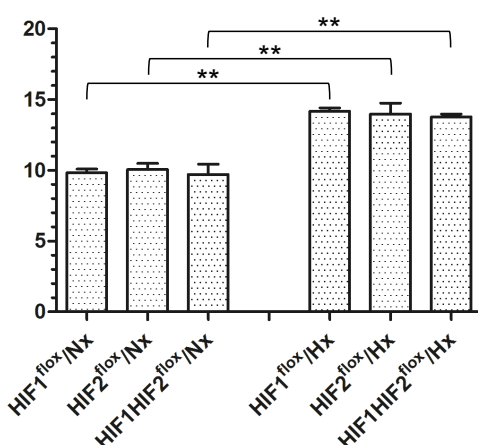
[H]



[I]



[J]



**Abb. 20: Cre-negative, gefloخته Kontrollmäuse zeigen keinen Unterschied in den untersuchten phänotypischen Merkmalen unter Normoxie und nach Hypoxie.**

[A] Körpergewichtsänderung nach 3 Wochen Normoxie oder chronischer Hypoxie (10% O<sub>2</sub>) in Prozent. [B] Hämatokrit-Werte unter Normoxie und nach 3 Wochen Hypoxie in Liter pro Liter (l/l). [C] Invasiv gemessene rechtsventrikuläre und [D] linksventrikuläre systolische Druckwerte. [E] Maximale rechtsventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dP/dt_{\text{max}}$  und [F] Druckabfallsgeschwindigkeit  $dP/dt_{\text{min}}$  in mmHg/s. [G] Quantitative Darstellung der kleinen,  $\alpha$ -smooth-muscle-actin-positiven Gefäße. [H] Ratio zwischen rechtsventrikulärer und linksventrikulärer Schichtdicke und [I] Masse (Fulton-Index). [J] Mittlerer Durchmesser rechtsventrikulärer Kardiomyozyten. HIF1<sup>flox</sup>/Nx: n=3-8, HIF2<sup>flox</sup>/Nx: n=3-8, HIF1HIF2<sup>flox</sup>/Nx: n=3-8, HIF1<sup>flox</sup>/Hx: n=3-8, HIF2<sup>flox</sup>/Hx: n=3-8, HIF1HIF2<sup>flox</sup>/Hx: n=3-8. Verglichen wurden die Normoxie- vs. Hypoxiegruppen derselben Mauslinie sowie die verschiedene Cre-negative, gefloخته Mauslinien unter Normoxie bzw. Hypoxie, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 7.2 Tabelle 2: Hämodynamische Messungen

Die Tabelle zeigt die Werte der hämodynamischen Messungen nach 3 Wochen Normoxie (Nx) oder Hypoxie (Hx). Die Messungen erfolgten unter Allgemeinanästhesie mittels linksventrikulärer (LV) und rechtsventrikulärer (RV) Punktion. Zum Zeitpunkt des Experiments waren alle Mäuse 11 Wochen alt. dP, Druckdifferenz; dt, Zeitdifferenz. dP/dt-max beschreibt die maximale Druckzunahme pro Sekunde und dient als Maß für die kardiale Kontraktilität während der Systole. dP/dt-min beschreibt die maximale Druckabnahme pro Sekunde und dient als Maß für die Relaxationsfähigkeit während der Diastole. Wt/Nx: n=31, smHIF1/Nx: n=7, smHIF2/Nx: n=13, smHIF1HIF2/Nx: n=9, Wt/Hx: n=25, smHIF1/Hx: n=7, smHIF2/Hx: n=8, smHIF1HIF2/Hx: n=9. \*p<0,05 vs. Wildtyp/Nx, \*\*p<0,05 vs. KO/Nx, #p<0,05 vs. Wildtyp/Hx, Mittelwert ± SEM.

	Hypoxie							
	Wildtyp	smHIF1α	smHIF2α	smHIF1α HIF2α	Wildtyp	smHIF1α	smHIF2α	smHIF1α HIF2α
Herzfrequenz (Schläge/min)	488,6 ± 8,2	545,0 ± 19,3 *	469,2 ± 12,1	505,3 ± 10,2	527,6 ± 7,3 *	525,5 ± 21,3	482,1 ± 16,7 #	530,4 ± 18,7
RV-Parameter:								
RV syst. Druck (mmHg)	19,27 ± 0,64	20,82 ± 1,15	20,70 ± 0,84	19,43 ± 0,64	27,44 ± 0,72 *	23,39 ± 1,52 #	23,15 ± 1,30 #	21,35 ± 1,18 #
RV diast. Druck (mmHg)	9,77 ± 0,72	10,85 ± 1,42	10,17 ± 1,14	11,61 ± 1,05	15,59 ± 0,93 *	15,21 ± 1,92	13,28 ± 1,84	14,59 ± 0,77 **
RV dP/dt-max (mmHg/s)	412,9 ± 15,9	457,1 ± 29,7	538,5 ± 48,8 *	322,2 ± 22,2 *	452,0 ± 15,4	357,1 ± 29,7 # **	412,5 ± 39,8 **	344,4 ± 24,2 #
RV dP/dt-min (mmHg/s)	-325,8 ± 11,3	-371,4 ± 28,6	-423,1 ± 20,1 *	-288,9 ± 20,0	-356,0 ± 13,0	-271,4 ± 18,4 # **	-337,5 ± 32,4 **	-266,7 ± 23,6 #
LV-Parameter:								
LV syst. Druck (mmHg)	61,73 ± 1,50	67,74 ± 1,73	68,76 ± 2,08 *	54,81 ± 2,73 *	62,20 ± 1,31	57,12 ± 2,53 **	63,00 ± 1,98	57,88 ± 2,56
LV diast. Druck (mmHg)	32,54 ± 1,18	38,47 ± 3,39	33,69 ± 1,66	33,24 ± 2,11	42,67 ± 1,47 *	40,63 ± 2,80	44,63 ± 2,22 **	41,88 ± 2,12 **
LV dP/dt-max (mmHg/s)	1031,0 ± 52,8	1117,0 ± 83,3	1172,0 ± 97,6	725,0 ± 72,6 *	664,0 ± 29,9 *	585,7 ± 45,9 **	577,8 ± 61,9 **	560,0 ± 34,0 **
LV dP/dt-min (mmHg/s)	-734,4 ± 34,7	-866,7 ± 66,7	-861,1 ± 51,2 *	-575,0 ± 55,9 *	-528,0 ± 21,2 *	-485,7 ± 40,4 **	-477,8 ± 40,1 **	-490,0 ± 27,7

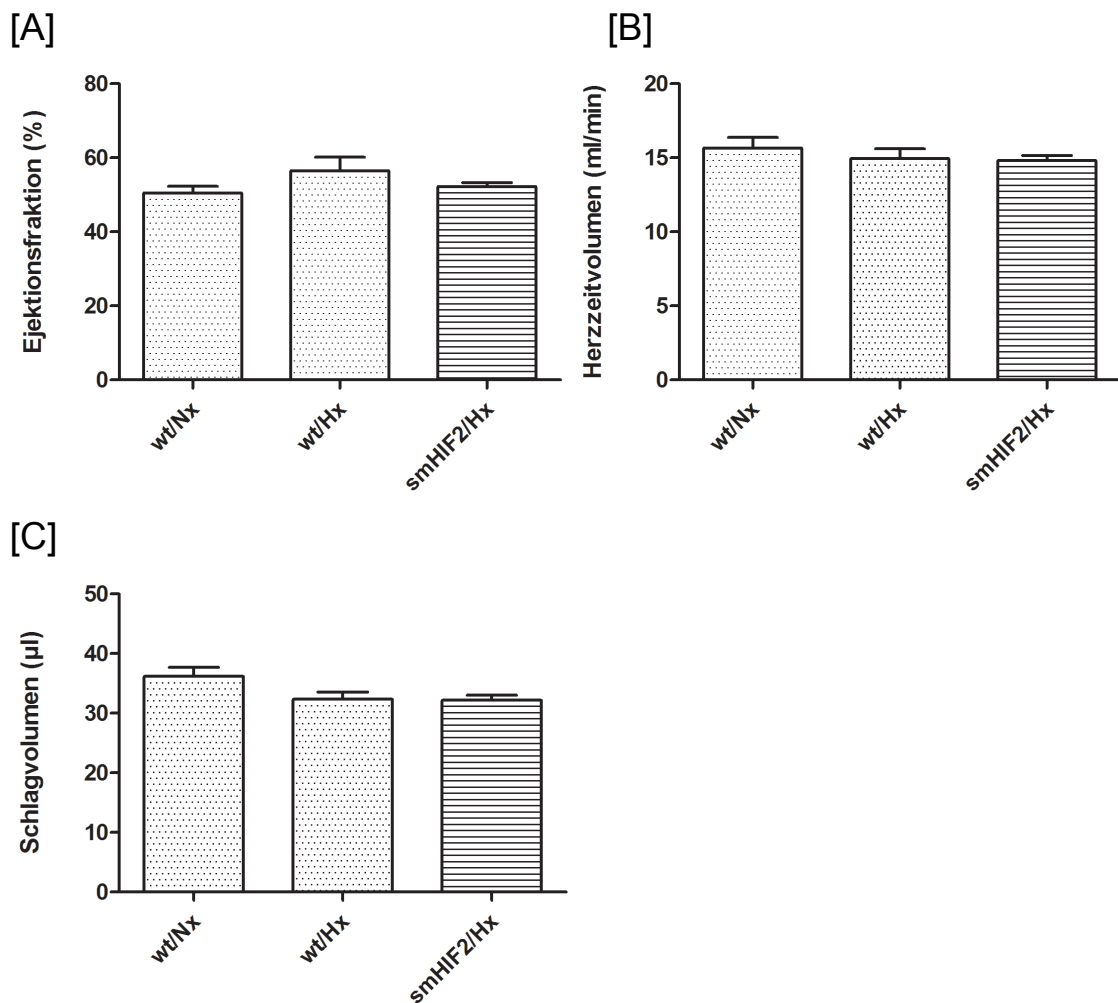
### 7.3 Tabelle 3: Körpergewicht und Herzmasse

Die Tabelle zeigt das Körpergewicht und die Herzmasse der Mäuse nach 3 Wochen Normoxie (Nx) oder Hypoxie (Hx). Die Änderung des Körpergewichts (KG) ist in Prozent (%) des Startgewichts dargestellt. Die Messung der Herzmasse erfolgte post-mortem durch separate Präparation des rechten Ventrikels (RV) und des linken Ventrikels inklusive Septum (LV+S). Wt/Nx: n=25, smHIF1/Nx: n=7, smHIF2/Nx: n=22, smHIF1HIF2/Nx: n=5, Wt/Hx: n=22, smHIF1/Hx: n=6, smHIF2/Hx: n=10, smHIF1HIF2/Hx: n=11. \*p<0,05 vs. Wildtyp/Nx, \*\*p<0,05 vs. KO/Nx, #p<0,05 vs. Wildtyp/Hx, Mittelwert ± SEM.

	Hypoxie							
	Wildtyp	smHIF1α	smHIF2α	smHIF1α HIF2α	Wildtyp	smHIF1α	smHIF2α	smHIF1α HIF2α
Änderung des KG (%)	+10,8 ± 1,6	+11,8 ± 1,5	+9,4 ± 1,3	+9,9 ± 1,4	-3,2 ± 1,1 *	+2,6 ± 1,7 # **	+1,1 ± 1,9 # **	-1,0 ± 2,3 **
Herzmassen- Ratios:								
RV/(LV+S) (mg/mg)	0,237 ± 0,006	0,256 ± 0,006	0,241 ± 0,010	0,250 ± 0,022	0,322 ± 0,012 *	0,372 ± 0,026 **	0,315 ± 0,008 **	0,321 ± 0,027
RV/KG (mg/g)	0,816 ± 0,020	0,808 ± 0,023	0,786 ± 0,029	0,937 ± 0,077 *	1,103 ± 0,038 *	1,224 ± 0,098 **	1,060 ± 0,031 **	1,142 ± 0,072
(LV+S)/KG (mg/g)	3,458 ± 0,050	3,156 ± 0,065 *	3,288 ± 0,076	3,769 ± 0,196 *	3,444 ± 0,074	3,287 ± 0,098	3,368 ± 0,075	3,617 ± 0,146
(RV+LV)/KG (mg/g)	4,274 ± 0,059	3,964 ± 0,081 *	4,073 ± 0,088	4,706 ± 0,234 *	4,547 ± 0,093 *	4,510 ± 0,166 **	4,428 ± 0,094 **	4,759 ± 0,168

## 7.4 Echokardiographische Untersuchung der linksventrikulären Funktion

Inwieweit die CHPH eine Auswirkung auf die linksventrikuläre Herzfunktion hat, wurde mittels Pulsed-wave-Doppler Echokardiographie analysiert. Hierfür wurden 11 Wochen alte Mäuse nach Normoxie und 3 Wochen chronischer Hypoxie mittels Hochfrequenz-Ultraschallsystem (Visualsonics) untersucht. Vor den Messungen der Versuchstiere des Hypoxieexperiments erfolgte eine 60-minütige Reoxygenierung in normoxischer Umgebung. Nach Einleitung einer Isofluran-Narkose wurden die Mäuse thorakal enthaart und anschließend echokardiographisch untersucht. Gemessen wurden die Ejektionsfraktion, das Herzzeitvolumen sowie das Schlagvolumen. Dies sind Parameter der Herzfunktion, die bei einer relevanten Insuffizienz vermindert sind. Die Ergebnisse der echokardiographischen Messungen zeigen, dass sich Ejektionsfraktion, Herzzeitvolumen und Schlagvolumen von Wildtyp-Mäusen unter Normoxie und nach chronischer Hypoxie nicht signifikant unterscheiden (Abb. 21). Weiterhin lässt sich kein relevanter Unterschied zwischen Wildtyp- und smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäusen nach 3 Wochen Hypoxie feststellen (Abb. 21). Aufgrund der Negativergebnisse wurde auf eine Untersuchung der KO-Mauslinien smHIF1 $\alpha$  und smHIF1 $\alpha$ HIF2 $\alpha$  verzichtet. Die echokardiographischen Messungen erfolgten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München.



**Abb. 21: Sowohl Wildtyp- als auch smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse zeigen nach Hypoxie keine signifikante Beeinträchtigung der linksventrikulären Herzfunktion.**

Die Abbildung zeigt die mittels Pulsed-wave-Doppler Echokardiographie ermittelten Funktionsparameter: [A] Ejektionsfraktion, [B] Herzzeitvolumen und [C] Schlagvolumen. Untersucht wurden 11 Wochen alten Mäusen unter Normoxie (Nx) und nach 3 Wochen Hypoxie (Hx). Wt/Nx: n=7, Wt/Hx: n=6, smHIF2/Hx: n=7. Verglichen wurden die Normoxie- vs. Hypoxie-Wildtyp-Mäuse sowie die Wildtyp- vs. smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse nach Hypoxie, \*p<0.05, \*\*p<0.01, Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] A. Zaiman, I. Fijalkowska, P. M. Hassoun, and R. M. Tuder, "One hundred years of research in the pathogenesis of pulmonary hypertension," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 33, pp. 425-31, Nov 2005.
- [2] N. Galie, A. Torbicki, R. Barst, P. Darteville, S. Haworth, T. Higenbottam, *et al.*, "Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology," *Eur Heart J*, vol. 25, pp. 2243-78, Dec 2004.
- [3] G. Simonneau, M. A. Gatzoulis, I. Adatia, D. Celermajer, C. Denton, A. Ghofrani, *et al.*, "Updated clinical classification of pulmonary hypertension," *J Am Coll Cardiol*, vol. 62, pp. D34-41, Dec 24 2013.
- [4] M. Humbert, O. Sitbon, A. Chaouat, M. Bertocchi, G. Habib, V. Gressin, *et al.*, "Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era," *Circulation*, vol. 122, pp. 156-63, Jul 13 2010.
- [5] E. D. Austin, J. D. Cogan, J. D. West, L. K. Hedges, R. Hamid, E. P. Dawson, *et al.*, "Alterations in oestrogen metabolism: implications for higher penetrance of familial pulmonary arterial hypertension in females," *Eur Respir J*, vol. 34, pp. 1093-9, Nov 2009.
- [6] L. A. Shimoda and S. S. Laurie, "Vascular remodeling in pulmonary hypertension," *J Mol Med (Berl)*, vol. 91, pp. 297-309, Mar 2013.
- [7] K. R. Stenmark and I. F. McMurtry, "Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension: a time for reappraisal?," *Circ Res*, vol. 97, pp. 95-8, Jul 22 2005.
- [8] N. F. Voelkel and R. M. Tuder, "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease?," *J Clin Invest*, vol. 106, pp. 733-8, Sep 2000.
- [9] K. R. Stenmark, B. Meyrick, N. Galie, W. J. Mooi, and I. F. McMurtry, "Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 297, pp. L1013-32, Dec 2009.
- [10] P. Smith and D. Heath, "Electron microscopy of the plexiform lesion," *Thorax*, vol. 34, pp. 177-86, Apr 1979.
- [11] E. S. Yi, H. Kim, H. Ahn, J. Strother, T. Morris, E. Masliah, *et al.*, "Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 162, pp. 1577-86, Oct 2000.
- [12] R. M. Tuder, J. C. Marecki, A. Richter, I. Fijalkowska, and S. Flores, "Pathology of pulmonary hypertension," *Clin Chest Med*, vol. 28, pp. 23-42, vii, Mar 2007.
- [13] F. Perros, P. Dorfmüller, R. Souza, I. Durand-Gasselin, S. Mussot, M. Mazmanian, *et al.*, "Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension," *Eur Respir J*, vol. 29, pp. 462-8, Mar 2007.

- [14] K. Asosingh, M. A. Aldred, A. VasANJI, J. Drazba, J. Sharp, C. Farver, *et al.*, "Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension," *Am J Pathol*, vol. 172, pp. 615-27, Mar 2008.
- [15] S. M. Majka, M. Skokan, L. Wheeler, J. Harral, S. Gladson, E. Burnham, *et al.*, "Evidence for cell fusion is absent in vascular lesions associated with pulmonary arterial hypertension," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 295, pp. L1028-39, Dec 2008.
- [16] B. Meyrick, "The pathology of pulmonary artery hypertension," *Clin Chest Med*, vol. 22, pp. 393-404, vii, Sep 2001.
- [17] G. G. Pietra, F. Capron, S. Stewart, O. Leone, M. Humbert, I. M. Robbins, *et al.*, "Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension," *J Am Coll Cardiol*, vol. 43, pp. 25S-32S, Jun 16 2004.
- [18] C. A. Wagenvoort, "Plexogenic arteriopathy," *Thorax*, vol. 49 Suppl, pp. S39-45, 1994.
- [19] B. Meyrick and L. Reid, "The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study," *Lab Invest*, vol. 38, pp. 188-200, Feb 1978.
- [20] N. F. Voelkel, S. Mizuno, and H. J. Bogaard, "The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 304, pp. L457-65, Apr 01 2013.
- [21] S. S. Sobin, H. M. Tremer, J. D. Hardy, and H. P. Chiodi, "Changes in arteriole in acute and chronic hypoxic pulmonary hypertension and recovery in rat," *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, vol. 55, pp. 1445-55, Nov 1983.
- [22] S. Y. Chan and J. Loscalzo, "Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 44, pp. 14-30, Jan 2008.
- [23] M. Humbert, N. W. Morrell, S. L. Archer, K. R. Stenmark, M. R. MacLean, I. M. Lang, *et al.*, "Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension," *J Am Coll Cardiol*, vol. 43, pp. 13S-24S, Jun 16 2004.
- [24] S. Yamaki and C. A. Wagenvoort, "Comparison of primary plexogenic arteriopathy in adults and children. A morphometric study in 40 patients," *Br Heart J*, vol. 54, pp. 428-34, Oct 1985.
- [25] D. Heath, P. Smith, J. Gosney, D. Mulcahy, K. Fox, M. Yacoub, *et al.*, "The pathology of the early and late stages of primary pulmonary hypertension," *Br Heart J*, vol. 58, pp. 204-13, Sep 1987.
- [26] G. G. Pietra, W. D. Edwards, J. M. Kay, S. Rich, J. Kernis, B. Schloo, *et al.*, "Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry," *Circulation*, vol. 80, pp. 1198-206, Nov 1989.
- [27] M. J. Overbeek, M. C. Vonk, A. Boonstra, A. E. Voskuyl, A. Vonk-Noordegraaf, E. F. Smit, *et al.*, "Pulmonary arterial hypertension in limited cutaneous systemic sclerosis: a distinctive vasculopathy," *Eur Respir J*, vol. 34, pp. 371-9, Aug 2009.
- [28] M. Levy, C. Maurey, D. S. Celermajer, P. R. Vouhe, C. Danel, D. Bonnet, *et al.*, "Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease," *J Am Coll Cardiol*, vol. 49, pp. 803-10, Feb 20 2007.

- [29] O. Sitbon, M. Humbert, X. Jais, V. Ioos, A. M. Hamid, S. Provencher, *et al.*, "Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension," *Circulation*, vol. 111, pp. 3105-11, Jun 14 2005.
- [30] H. I. Palevsky, B. L. Schloo, G. G. Pietra, K. T. Weber, J. S. Janicki, E. Rubin, *et al.*, "Primary pulmonary hypertension. Vascular structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents," *Circulation*, vol. 80, pp. 1207-21, Nov 1989.
- [31] R. M. Tuder, "Pathology of pulmonary arterial hypertension," *Semin Respir Crit Care Med*, vol. 30, pp. 376-85, Aug 2009.
- [32] R. R. Vanderpool, A. R. Kim, R. Molthen, and N. C. Chesler, "Effects of acute Rho kinase inhibition on chronic hypoxia-induced changes in proximal and distal pulmonary arterial structure and function," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 110, pp. 188-98, Jan 2011.
- [33] S. Mahapatra, R. A. Nishimura, P. Sorajja, S. Cha, and M. D. McGoon, "Relationship of pulmonary arterial capacitance and mortality in idiopathic pulmonary arterial hypertension," *J Am Coll Cardiol*, vol. 47, pp. 799-803, Feb 21 2006.
- [34] Y. X. Wang and R. M. Fitch, "Vascular stiffness: measurements, mechanisms and implications," *Curr Vasc Pharmacol*, vol. 2, pp. 379-84, Oct 2004.
- [35] S. J. Zieman, V. Melenovsky, and D. A. Kass, "Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 25, pp. 932-43, May 2005.
- [36] J. A. Leopold and B. A. Maron, "Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension," *Int J Mol Sci*, vol. 17, May 18 2016.
- [37] G. H. Glover and I. E. Newsom, "Brisket disease: dropsy of high altitudes," *Colo Agric Exp Station*, vol. 204, pp. 3-24, 1915.
- [38] S. H. Vitali, S. A. Mitsialis, O. D. Liang, X. Liu, A. Fernandez-Gonzalez, H. Christou, *et al.*, "Divergent cardiopulmonary actions of heme oxygenase enzymatic products in chronic hypoxia," *PLoS One*, vol. 4, p. e5978, Jun 19 2009.
- [39] N. R. Prabhakar, G. K. Kumar, and Y. J. Peng, "Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 113, pp. 1304-10, Oct 15 2012.
- [40] U. S. v. Euler and G. Liljestrand, "Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat," *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 12, pp. 301-320, 1946.
- [41] N. Sommer, A. Dietrich, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, T. Gudermann, R. Schulz, *et al.*, "Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms," *Eur Respir J*, vol. 32, pp. 1639-51, Dec 2008.
- [42] L. A. Shimoda and S. S. Laurie, "HIF and pulmonary vascular responses to hypoxia," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 116, pp. 867-74, Apr 01 2014.
- [43] J. T. Sylvester, L. A. Shimoda, P. I. Aaronson, and J. P. Ward, "Hypoxic pulmonary vasoconstriction," *Physiol Rev*, vol. 92, pp. 367-520, Jan 2012.
- [44] E. Cahill, S. C. Rowan, M. Sands, M. Banahan, D. Ryan, K. Howell, *et al.*, "The pathophysiological basis of chronic hypoxic pulmonary hypertension in the mouse: vasoconstrictor and structural mechanisms contribute equally," *Exp Physiol*, vol. 97, pp. 796-806, Jun 2012.



- [45] J. P. Wrobel, B. R. Thompson, and T. J. Williams, "Mechanisms of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: a pathophysiologic review," *J Heart Lung Transplant*, vol. 31, pp. 557-64, Jun 2012.
- [46] T. M. Bull, B. Clark, K. McFann, M. Moss, L. National Institutes of Health/National Heart, and A. N. Blood Institute, "Pulmonary vascular dysfunction is associated with poor outcomes in patients with acute lung injury," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 182, pp. 1123-8, Nov 01 2010.
- [47] L. Farkas, J. Gauldie, N. F. Voelkel, and M. Kolb, "Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: a tale of angiogenesis, apoptosis, and growth factors," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 45, pp. 1-15, Jul 2011.
- [48] M. K. Ball, G. B. Waypa, P. T. Mungai, J. M. Nielsen, L. Czech, V. J. Dudley, *et al.*, "Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1alpha," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 189, pp. 314-24, Feb 01 2014.
- [49] D. Penaloza, J. Arias-Stella, F. Sime, S. Recavarren, and E. Marticorena, "The Heart and Pulmonary Circulation in Children at High Altitudes: Physiological, Anatomical, and Clinical Observations," *Pediatrics*, vol. 34, pp. 568-82, Oct 1964.
- [50] R. Pryor, W. F. Weaver, and S. G. Blount, Jr., "Electrocardiographic observation of 493 residents living at high altitude (10,150 feet)," *Am J Cardiol*, vol. 16, pp. 494-9, Oct 1965.
- [51] A. Canepa, R. Chavez, A. Hurtado, A. Rotta, and T. Velasquez, "Pulmonary circulation at sea level and at high altitudes," *J Appl Physiol*, vol. 9, pp. 328-36, Nov 1956.
- [52] D. Heath, P. Smith, J. Rios Dalenz, D. Williams, and P. Harris, "Small pulmonary arteries in some natives of La Paz, Bolivia," *Thorax*, vol. 36, pp. 599-604, Aug 1981.
- [53] J. Arias-Stella and M. Saldana, "The Terminal Portion of the Pulmonary Arterial Tree in People Native to High Altitudes," *Circulation*, vol. 28, pp. 915-25, Nov 1963.
- [54] M. L. Gupta, K. S. Rao, I. S. Anand, A. K. Banerjee, and M. S. Boparai, "Lack of smooth muscle in the small pulmonary arteries of the native Ladakhi. Is the Himalayan highlander adapted?," *Am Rev Respir Dis*, vol. 145, pp. 1201-4, May 1992.
- [55] B. M. Groves, T. Droma, J. R. Sutton, R. G. McCullough, R. E. McCullough, J. Zhuang, *et al.*, "Minimal hypoxic pulmonary hypertension in normal Tibetans at 3,658 m," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 74, pp. 312-8, Jan 1993.
- [56] D. L. Burke, M. G. Frid, C. L. Kunrath, V. Karoor, A. Anwar, B. D. Wagner, *et al.*, "Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 297, pp. L238-50, Aug 2009.
- [57] S. Frohlich, J. Boylan, and P. McLoughlin, "Hypoxia-induced inflammation in the lung: a potential therapeutic target in acute lung injury?," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 48, pp. 271-9, Mar 2013.
- [58] M. R. Nicolls and N. F. Voelkel, "Hypoxia and the lung: beyond hypoxic vasoconstriction," *Antioxid Redox Signal*, vol. 9, pp. 741-3, Jun 2007.
- [59] S. Ono, J. Y. Westcott, and N. F. Voelkel, "PAF antagonists inhibit pulmonary vascular remodeling induced by hypobaric hypoxia in rats," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 73, pp. 1084-92, Sep 1992.

- [60] R. F. Grover, "Pulmonary circulation in animals and man at high altitude," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 127, pp. 632-9, Sep 08 1965.
- [61] Y. Hoshikawa, P. Nana-Sinkam, M. D. Moore, S. Sotto-Santiago, T. Phang, R. L. Keith, *et al.*, "Hypoxia induces different genes in the lungs of rats compared with mice," *Physiol Genomics*, vol. 12, pp. 209-19, Feb 06 2003.
- [62] L. S. He, S. W. Chang, and N. F. Voelkel, "Pulmonary vascular reactivity in Fischer rats," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 70, pp. 1861-6, Apr 1991.
- [63] J. Gomez-Arroyo, S. J. Saleem, S. Mizuno, A. A. Syed, H. J. Bogaard, A. Abbate, *et al.*, "A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 302, pp. L977-91, May 15 2012.
- [64] J. M. Hyvelin, K. Howell, A. Nichol, C. M. Costello, R. J. Preston, and P. McLoughlin, "Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation," *Circ Res*, vol. 97, pp. 185-91, Jul 22 2005.
- [65] K. R. Stenmark, K. A. Fagan, and M. G. Frid, "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms," *Circ Res*, vol. 99, pp. 675-91, Sep 29 2006.
- [66] J. Rhodes, "Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 98, pp. 1092-100, Mar 2005.
- [67] O. Pak, A. Aldashev, D. Welsh, and A. Peacock, "The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature," *Eur Respir J*, vol. 30, pp. 364-72, Aug 2007.
- [68] E. S. Drexler, J. E. Bischoff, A. J. Slifka, C. N. McCowan, T. P. Quinn, R. Shandas, *et al.*, "Stiffening of the Extrapulmonary Arteries From Rats in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension," *J Res Natl Inst Stand Technol*, vol. 113, pp. 239-49, Jul-Aug 2008.
- [69] D. M. Tabima, T. A. Hacker, and N. C. Chesler, "Measuring right ventricular function in the normal and hypertensive mouse hearts using admittance-derived pressure-volume loops," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 299, pp. H2069-75, Dec 2010.
- [70] L. Ciucan, O. Bonneau, M. Hussey, N. Duggan, A. M. Holmes, R. Good, *et al.*, "A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 184, pp. 1171-82, Nov 15 2011.
- [71] T. M. Bull, C. D. Coldren, M. W. Geraci, and N. F. Voelkel, "Gene expression profiling in pulmonary hypertension," *Proc Am Thorac Soc*, vol. 4, pp. 117-20, Jan 2007.
- [72] Y. Tada, S. Laudi, J. Harral, M. Carr, C. Ivester, N. Tanabe, *et al.*, "Murine pulmonary response to chronic hypoxia is strain specific," *Exp Lung Res*, vol. 34, pp. 313-23, Aug 2008.
- [73] N. R. Bauer, T. M. Moore, and I. F. McMurtry, "Rodent models of PAH: are we there yet?," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 293, pp. L580-2, Sep 2007.
- [74] B. Meyrick, W. Gamble, and L. Reid, "Development of *Crotalaria* pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study," *Am J Physiol*, vol. 239, pp. H692-702, Nov 1980.
- [75] M. R. Nicolls, S. Mizuno, L. Taraseviciene-Stewart, L. Farkas, J. I. Drake, A. Al Hussein, *et al.*, "New models of pulmonary hypertension based on VEGF

- receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis," *Pulm Circ*, vol. 2, pp. 434-42, Oct 2012.
- [76] M. K. Steiner, O. L. Syrkina, N. Kolliputi, E. J. Mark, C. A. Hales, and A. B. Waxman, "Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension," *Circ Res*, vol. 104, pp. 236-44, 28p following 244, Jan 30 2009.
- [77] S. Majka, M. Hagen, T. Blackwell, J. Harral, J. A. Johnson, R. Gendron, *et al.*, "Physiologic and molecular consequences of endothelial Bmpr2 mutation," *Respir Res*, vol. 12, p. 84, Jun 22 2011.
- [78] M. W. Geraci, M. Moore, T. Gesell, M. E. Yeager, L. Alger, H. Golpon, *et al.*, "Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: a gene microarray analysis," *Circ Res*, vol. 88, pp. 555-62, Mar 30 2001.
- [79] E. D. Burg, C. V. Remillard, and J. X. Yuan, "Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications," *Br J Pharmacol*, vol. 153 Suppl 1, pp. S99-S111, Mar 2008.
- [80] X. J. Yuan, J. Wang, M. Juhaszova, S. P. Gaine, and L. J. Rubin, "Attenuated K<sup>+</sup> channel gene transcription in primary pulmonary hypertension," *Lancet*, vol. 351, pp. 726-7, Mar 07 1998.
- [81] O. Platoshyn, V. A. Golovina, C. L. Bailey, A. Limsuwan, S. Krick, M. Juhaszova, *et al.*, "Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 279, pp. C1540-9, Nov 2000.
- [82] J. X. Yuan, A. M. Aldinger, M. Juhaszova, J. Wang, J. V. Conte, Jr., S. P. Gaine, *et al.*, "Dysfunctional voltage-gated K<sup>+</sup> channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension," *Circulation*, vol. 98, pp. 1400-6, Oct 06 1998.
- [83] Z. I. Pozeg, E. D. Michelakis, M. S. McMurtry, B. Thebaud, X. C. Wu, J. R. Dyck, *et al.*, "In vivo gene transfer of the O<sub>2</sub>-sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats," *Circulation*, vol. 107, pp. 2037-44, Apr 22 2003.
- [84] S. Bonnet, E. Dumas-de-La-Roque, H. Begueret, R. Marthan, M. Fayon, P. Dos Santos, *et al.*, "Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 9488-93, Aug 05 2003.
- [85] S. Bonnet, G. Rochefort, G. Sutendra, S. L. Archer, A. Haromy, L. Webster, *et al.*, "The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 11418-23, Jul 03 2007.
- [86] M. S. McMurtry, S. Bonnet, X. Wu, J. R. Dyck, A. Haromy, K. Hashimoto, *et al.*, "Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis," *Circ Res*, vol. 95, pp. 830-40, Oct 15 2004.
- [87] E. D. Michelakis, M. S. McMurtry, X. C. Wu, J. R. Dyck, R. Moudgil, T. A. Hopkins, *et al.*, "Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels," *Circulation*, vol. 105, pp. 244-50, Jan 15 2002.

- [88] E. D. Michelakis, V. Hampl, A. Nsair, X. Wu, G. Harry, A. Haromy, *et al.*, "Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing," *Circ Res*, vol. 90, pp. 1307-15, Jun 28 2002.
- [89] J. Meloche, A. Pflieger, M. Vaillancourt, R. Paulin, F. Potus, S. Zervopoulos, *et al.*, "Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension," *Circulation*, vol. 129, pp. 786-97, Feb 18 2014.
- [90] L. Zhao, E. Oliver, K. Maratou, S. S. Atanur, O. D. Dubois, E. Cotroneo, *et al.*, "The zinc transporter ZIP12 regulates the pulmonary vascular response to chronic hypoxia," *Nature*, vol. 524, pp. 356-60, Aug 20 2015.
- [91] E. Cotroneo, A. Ashek, L. Wang, J. Wharton, O. Dubois, S. Bozorgi, *et al.*, "Iron homeostasis and pulmonary hypertension: iron deficiency leads to pulmonary vascular remodeling in the rat," *Circ Res*, vol. 116, pp. 1680-90, May 08 2015.
- [92] V. A. Golovina, O. Platoshyn, C. L. Bailey, J. Wang, A. Limsuwan, M. Sweeney, *et al.*, "Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 280, pp. H746-55, Feb 2001.
- [93] L. Hadri, R. G. Kratlian, L. Benard, B. A. Maron, P. Dorfmueller, D. Ladage, *et al.*, "Therapeutic efficacy of AAV1.SERCA2a in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension," *Circulation*, vol. 128, pp. 512-23, Jul 30 2013.
- [94] S. Archer and S. Rich, "Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress"," *Circulation*, vol. 102, pp. 2781-91, Nov 28 2000.
- [95] T. Luke, J. Maylor, C. Udem, J. T. Sylvester, and L. A. Shimoda, "Kinase-dependent activation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels by ET-1 in pulmonary arterial myocytes during chronic hypoxia," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 302, pp. L1128-39, May 15 2012.
- [96] D. M. Rodman, K. Reese, J. Harral, B. Fouty, S. Wu, J. West, *et al.*, "Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes," *Circ Res*, vol. 96, pp. 864-72, Apr 29 2005.
- [97] J. Wang, L. Weigand, W. Lu, J. T. Sylvester, G. L. Semenza, and L. A. Shimoda, "Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> in pulmonary arterial smooth muscle cells," *Circ Res*, vol. 98, pp. 1528-37, Jun 23 2006.
- [98] M. J. Lin, G. P. Leung, W. M. Zhang, X. R. Yang, K. P. Yip, C. M. Tse, *et al.*, "Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca<sup>2+</sup> channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension," *Circ Res*, vol. 95, pp. 496-505, Sep 03 2004.
- [99] Y. Yu, I. Fantozzi, C. V. Remillard, J. W. Landsberg, N. Kunichika, O. Platoshyn, *et al.*, "Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 13861-6, Sep 21 2004.
- [100] Y. Yu, S. H. Keller, C. V. Remillard, O. Safrina, A. Nicholson, S. L. Zhang, *et al.*, "A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension," *Circulation*, vol. 119, pp. 2313-22, May 05 2009.

- [101] E. J. Rios, M. Fallon, J. Wang, and L. A. Shimoda, "Chronic hypoxia elevates intracellular pH and activates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in pulmonary arterial smooth muscle cells," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 289, pp. L867-74, Nov 2005.
- [102] L. Yu and C. A. Hales, "Silencing of sodium-hydrogen exchanger 1 attenuates the proliferation, hypertrophy, and migration of pulmonary artery smooth muscle cells via E2F1," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 45, pp. 923-30, Nov 2011.
- [103] L. Yu, D. A. Quinn, H. G. Garg, and C. A. Hales, "Deficiency of the NHE1 gene prevents hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 177, pp. 1276-84, Jun 01 2008.
- [104] D. A. Quinn, C. G. Dahlberg, J. P. Bonventre, C. R. Scheid, T. Honeyman, P. M. Joseph, *et al.*, "The role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and growth factors in pulmonary artery smooth muscle cell proliferation," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 14, pp. 139-45, Feb 1996.
- [105] A. L. Firth, I. W. Choi, and W. S. Park, "Animal models of pulmonary hypertension: Rho kinase inhibition," *Prog Biophys Mol Biol*, vol. 109, pp. 67-75, Aug 2012.
- [106] K. Ishikura, N. Yamada, M. Ito, S. Ota, M. Nakamura, N. Isaka, *et al.*, "Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension," *Circ J*, vol. 70, pp. 174-8, Feb 2006.
- [107] E. M. Whitman, S. Pisarcik, T. Luke, M. Fallon, J. Wang, J. T. Sylvester, *et al.*, "Endothelin-1 mediates hypoxia-induced inhibition of voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression in pulmonary arterial myocytes," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 294, pp. L309-18, Feb 2008.
- [108] C. Udem, E. J. Rios, J. Maylor, and L. A. Shimoda, "Endothelin-1 augments Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange activity in murine pulmonary arterial smooth muscle cells via Rho kinase," *PLoS One*, vol. 7, p. e46303, 2012.
- [109] L. A. Shimoda, J. S. Sham, Q. Liu, and J. T. Sylvester, "Acute and chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction: a central role for endothelin-1?," *Respir Physiol Neurobiol*, vol. 132, pp. 93-106, Aug 22 2002.
- [110] D. Shao, J. E. Park, and S. J. Wort, "The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension," *Pharmacol Res*, vol. 63, pp. 504-11, Jun 2011.
- [111] N. J. Davie, R. T. Schermuly, N. Weissmann, F. Grimminger, and H. A. Ghofrani, "The science of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in the management of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future studies," *Eur J Clin Invest*, vol. 39 Suppl 2, pp. 38-49, Jun 2009.
- [112] M. R. Maclean and Y. Dempsie, "The serotonin hypothesis of pulmonary hypertension revisited," *Adv Exp Med Biol*, vol. 661, pp. 309-22, 2010.
- [113] N. W. Morrell, X. Yang, P. D. Upton, K. B. Jourdan, N. Morgan, K. K. Sheares, *et al.*, "Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins," *Circulation*, vol. 104, pp. 790-5, Aug 14 2001.
- [114] W. Lu, P. Ran, D. Zhang, N. Lai, N. Zhong, and J. Wang, "Bone morphogenetic protein 4 enhances canonical transient receptor potential expression, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat distal pulmonary arterial

- smooth muscle cells," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 299, pp. C1370-8, Dec 2010.
- [115] D. B. Frank, A. Abtahi, D. J. Yamaguchi, S. Manning, Y. Shyr, A. Pozzi, *et al.*, "Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension," *Circ Res*, vol. 97, pp. 496-504, Sep 02 2005.
- [116] L. Anderson, J. W. Lowery, D. B. Frank, T. Novitskaya, M. Jones, D. P. Mortlock, *et al.*, "Bmp2 and Bmp4 exert opposing effects in hypoxic pulmonary hypertension," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 298, pp. R833-42, Mar 2010.
- [117] R. J. Davies and N. W. Morrell, "Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor," *Chest*, vol. 134, pp. 1271-7, Dec 2008.
- [118] S. Zhang, I. Fantozzi, D. D. Tigno, E. S. Yi, O. Platoshyn, P. A. Thistlethwaite, *et al.*, "Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 285, pp. L740-54, Sep 2003.
- [119] M. Brock, M. Trenkmann, R. E. Gay, B. A. Michel, S. Gay, M. Fischler, *et al.*, "Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenetic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway," *Circ Res*, vol. 104, pp. 1184-91, May 22 2009.
- [120] H. Takahashi, N. Goto, Y. Kojima, Y. Tsuda, Y. Morio, M. Muramatsu, *et al.*, "Downregulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 290, pp. L450-8, Mar 2006.
- [121] M. G. Frid, V. A. Kale, and K. R. Stenmark, "Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis," *Circ Res*, vol. 90, pp. 1189-96, Jun 14 2002.
- [122] E. Arciniegas, M. G. Frid, I. S. Douglas, and K. R. Stenmark, "Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 293, pp. L1-8, Jul 2007.
- [123] B. Ranchoux, F. Antigny, C. Rucker-Martin, A. Hautefort, C. Pechoux, H. J. Bogaard, *et al.*, "Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension," *Circulation*, vol. 131, pp. 1006-18, Mar 17 2015.
- [124] G. Krenning, V. G. Barauna, J. E. Krieger, M. C. Harmsen, and J. R. Moonen, "Endothelial Plasticity: Shifting Phenotypes through Force Feedback," *Stem Cells Int*, vol. 2016, p. 9762959, 2016.
- [125] A. Q. Sheikh, J. K. Lighthouse, and D. M. Greif, "Recapitulation of developing artery muscularization in pulmonary hypertension," *Cell Rep*, vol. 6, pp. 809-17, Mar 13 2014.
- [126] A. Q. Sheikh, A. Misra, I. O. Rosas, R. H. Adams, and D. M. Greif, "Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension," *Sci Transl Med*, vol. 7, p. 308ra159, Oct 07 2015.
- [127] K. Leggett, J. Maylor, C. Undem, N. Lai, W. Lu, K. Schweitzer, *et al.*, "Hypoxia-induced migration in pulmonary arterial smooth muscle cells requires calcium-dependent upregulation of aquaporin 1," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 303, pp. L343-53, Aug 15 2012.

- [128] E. Monzani, R. Bazzotti, C. Perego, and C. A. La Porta, "AQP1 is not only a water channel: it contributes to cell migration through Lin7/beta-catenin," *PLoS One*, vol. 4, p. e6167, Jul 08 2009.
- [129] J. E. Shay and M. Celeste Simon, "Hypoxia-inducible factors: crosstalk between inflammation and metabolism," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 23, pp. 389-94, Jun 2012.
- [130] L. A. Shimoda and G. L. Semenza, "HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 183, pp. 152-6, Jan 15 2011.
- [131] Y. Z. Gu, S. M. Moran, J. B. Hogenesch, L. Wartman, and C. A. Bradfield, "Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha," *Gene Expr*, vol. 7, pp. 205-13, 1998.
- [132] M. Ema, S. Taya, N. Yokotani, K. Sogawa, Y. Matsuda, and Y. Fujii-Kuriyama, "A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, pp. 4273-8, Apr 29 1997.
- [133] P. Jaakkola, D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, *et al.*, "Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation," *Science*, vol. 292, pp. 468-72, Apr 20 2001.
- [134] P. H. Maxwell, M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, *et al.*, "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis," *Nature*, vol. 399, pp. 271-5, May 20 1999.
- [135] G. L. Semenza, "Life with oxygen," *Science*, vol. 318, pp. 62-4, Oct 05 2007.
- [136] P. J. Ratcliffe, B. L. Ebert, J. D. Firth, J. M. Gleadle, P. H. Maxwell, M. Nagao, *et al.*, "Oxygen regulated gene expression: erythropoietin as a model system," *Kidney Int*, vol. 51, pp. 514-26, Feb 1997.
- [137] J. Hu, D. J. Discher, N. H. Bishopric, and K. A. Webster, "Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 245, pp. 894-9, Apr 28 1998.
- [138] L. A. Palmer, G. L. Semenza, M. H. Stoler, and R. A. Johns, "Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1," *Am J Physiol*, vol. 274, pp. L212-9, Feb 1998.
- [139] R. H. Wenger, "Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression," *FASEB J*, vol. 16, pp. 1151-62, Aug 2002.
- [140] N. V. Iyer, L. E. Kotch, F. Agani, S. W. Leung, E. Laughner, R. H. Wenger, *et al.*, "Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha," *Genes Dev*, vol. 12, pp. 149-62, Jan 15 1998.
- [141] C. J. Hu, L. Y. Wang, L. A. Chodosh, B. Keith, and M. C. Simon, "Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation," *Mol Cell Biol*, vol. 23, pp. 9361-74, Dec 2003.
- [142] M. S. Wiesener, J. S. Jurgensen, C. Rosenberger, C. K. Scholze, J. H. Horstrup, C. Warnecke, *et al.*, "Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-

- 2alpha in distinct cell populations of different organs," *FASEB J*, vol. 17, pp. 271-3, Feb 2003.
- [143] N. R. Prabhakar and G. L. Semenza, "Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2," *Physiol Rev*, vol. 92, pp. 967-1003, Jul 2012.
- [144] M. S. Wiesener, H. Turley, W. E. Allen, C. Willam, K. U. Eckardt, K. L. Talks, *et al.*, "Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha," *Blood*, vol. 92, pp. 2260-8, Oct 01 1998.
- [145] I. Flamme, T. Frohlich, M. von Reutern, A. Kappel, A. Damert, and W. Risau, "HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels," *Mech Dev*, vol. 63, pp. 51-60, Apr 1997.
- [146] H. Tian, S. L. McKnight, and D. W. Russell, "Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells," *Genes Dev*, vol. 11, pp. 72-82, Jan 01 1997.
- [147] T. N. Seagroves, H. E. Ryan, H. Lu, B. G. Wouters, M. Knapp, P. Thibault, *et al.*, "Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells," *Mol Cell Biol*, vol. 21, pp. 3436-44, May 2001.
- [148] J. Peng, L. Zhang, L. Drysdale, and G. H. Fong, "The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, pp. 8386-91, Jul 18 2000.
- [149] H. E. Ryan, J. Lo, and R. S. Johnson, "HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization," *EMBO J*, vol. 17, pp. 3005-15, Jun 01 1998.
- [150] T. G. Smith, J. T. Brooks, G. M. Balanos, T. R. Lappin, D. M. Layton, D. L. Leedham, *et al.*, "Mutation of von Hippel-Lindau tumour suppressor and human cardiopulmonary physiology," *PLoS Med*, vol. 3, p. e290, Jul 2006.
- [151] F. Formenti, P. A. Beer, Q. P. Croft, K. L. Dorrington, D. P. Gale, T. R. Lappin, *et al.*, "Cardiopulmonary function in two human disorders of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway: von Hippel-Lindau disease and HIF-2alpha gain-of-function mutation," *FASEB J*, vol. 25, pp. 2001-11, Jun 2011.
- [152] A. Y. Yu, L. A. Shimoda, N. V. Iyer, D. L. Huso, X. Sun, R. McWilliams, *et al.*, "Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha," *J Clin Invest*, vol. 103, pp. 691-6, Mar 1999.
- [153] K. Brusselmans, V. Compennolle, M. Tjwa, M. S. Wiesener, P. H. Maxwell, D. Collen, *et al.*, "Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia," *J Clin Invest*, vol. 111, pp. 1519-27, May 2003.
- [154] L. C. Ou, S. Salceda, S. J. Schuster, L. M. Dunnack, T. Brink-Johnsen, J. Chen, *et al.*, "Polycythemic responses to hypoxia: molecular and genetic mechanisms of chronic mountain sickness," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 84, pp. 1242-51, Apr 1998.
- [155] S. Kourembanas, T. Morita, Y. Liu, and H. Christou, "Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature," *Kidney Int*, vol. 51, pp. 438-43, Feb 1997.



- [156] T. D. Le Cras, C. Xue, A. Rengasamy, and R. A. Johns, "Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung," *Am J Physiol*, vol. 270, pp. L164-70, Jan 1996.
- [157] V. S. DiCarlo, S. J. Chen, Q. C. Meng, J. Durand, M. Yano, Y. F. Chen, *et al.*, "ETA-receptor antagonist prevents and reverses chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat," *Am J Physiol*, vol. 269, pp. L690-7, Nov 1995.
- [158] A. Y. Yu, M. G. Frid, L. A. Shimoda, C. M. Wiener, K. Stenmark, and G. L. Semenza, "Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung," *Am J Physiol*, vol. 275, pp. L818-26, Oct 1998.
- [159] C. Martin, A. Y. Yu, B. H. Jiang, L. Davis, D. Kimberly, A. R. Hohimer, *et al.*, "Cardiac hypertrophy in chronically anemic fetal sheep: Increased vascularization is associated with increased myocardial expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 178, pp. 527-34, Mar 1998.
- [160] M. C. van Patot and M. Gassmann, "Hypoxia: adapting to high altitude by mutating EPAS-1, the gene encoding HIF-2alpha," *High Alt Med Biol*, vol. 12, pp. 157-67, Summer 2011.
- [161] Q. Tan, H. Kerestes, M. J. Percy, R. Pietrofesa, L. Chen, T. S. Khurana, *et al.*, "Erythrocytosis and pulmonary hypertension in a mouse model of human HIF2A gain of function mutation," *J Biol Chem*, vol. 288, pp. 17134-44, Jun 14 2013.
- [162] Y. F. Chen and S. Oparil, "Endothelin and pulmonary hypertension," *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 35, pp. S49-53, 2000.
- [163] S. J. Wort, M. Woods, T. D. Warner, T. W. Evans, and J. A. Mitchell, "Endogenously released endothelin-1 from human pulmonary artery smooth muscle promotes cellular proliferation: relevance to pathogenesis of pulmonary hypertension and vascular remodeling," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 25, pp. 104-10, Jul 2001.
- [164] H. Tian, R. E. Hammer, A. M. Matsumoto, D. W. Russell, and S. L. McKnight, "The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development," *Genes Dev*, vol. 12, pp. 3320-4, Nov 01 1998.
- [165] N. Jin, C. S. Packer, D. English, and R. A. Rhoades, "Inositol trisphosphate is involved in norepinephrine- but not in hypoxia-induced pulmonary arterial contraction," *Am J Physiol*, vol. 264, pp. L160-4, Feb 1993.
- [166] T. Nakaki, M. Nakayama, S. Yamamoto, and R. Kato, "Alpha 1-adrenergic stimulation and beta 2-adrenergic inhibition of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells," *Mol Pharmacol*, vol. 37, pp. 30-6, Jan 1990.
- [167] H. K. Eltzschig and P. Carmeliet, "Hypoxia and inflammation," *N Engl J Med*, vol. 364, pp. 656-65, Feb 17 2011.
- [168] N. F. Voelkel, R. W. Vandivier, and R. M. Tuder, "Vascular endothelial growth factor in the lung," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 290, pp. L209-21, Feb 2006.
- [169] E. M. Abud, J. Maylor, C. Undem, A. Punjabi, A. L. Zaiman, A. C. Myers, *et al.*, "Digoxin inhibits development of hypoxic pulmonary hypertension in mice," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, pp. 1239-44, Jan 24 2012.

- [170] K. Lee, H. Zhang, D. Z. Qian, S. Rey, J. O. Liu, and G. L. Semenza, "Acridine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, pp. 17910-5, Oct 20 2009.
- [171] T. G. Smith, N. P. Talbot, C. Privat, M. Rivera-Ch, A. H. Nickol, P. J. Ratcliffe, *et al.*, "Effects of iron supplementation and depletion on hypoxic pulmonary hypertension: two randomized controlled trials," *JAMA*, vol. 302, pp. 1444-50, Oct 07 2009.
- [172] M. Malczyk, C. Veith, B. Fuchs, K. Hofmann, U. Storch, R. T. Schermuly, *et al.*, "Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 188, pp. 1451-9, Dec 15 2013.
- [173] L. A. Shimoda, D. J. Manalo, J. S. Sham, G. L. Semenza, and J. T. Sylvester, "Partial HIF-1 $\alpha$  deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 281, pp. L202-8, Jul 2001.
- [174] L. A. Shimoda, M. Fallon, S. Pisarcik, J. Wang, and G. L. Semenza, "HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 291, pp. L941-9, Nov 2006.
- [175] C. V. Remillard and J. X. Yuan, "Activation of K<sup>+</sup> channels: an essential pathway in programmed cell death," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 286, pp. L49-67, Jan 2004.
- [176] N. Galie, A. Manes, and A. Branzi, "The endothelin system in pulmonary arterial hypertension," *Cardiovasc Res*, vol. 61, pp. 227-37, Feb 01 2004.
- [177] M. Li, Y. Liu, F. Jin, X. Sun, Z. Li, Y. Liu, *et al.*, "Endothelin-1 induces hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  expression in pulmonary artery smooth muscle cells," *FEBS Lett*, vol. 586, pp. 3888-93, Nov 02 2012.
- [178] X. J. Yuan, W. F. Goldman, M. L. Tod, L. J. Rubin, and M. P. Blaustein, "Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes," *Am J Physiol*, vol. 264, pp. L116-23, Feb 1993.
- [179] M. S. Vadula, J. G. Kleinman, and J. A. Madden, "Effect of hypoxia and norepinephrine on cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in pulmonary and cerebral arterial myocytes," *Am J Physiol*, vol. 265, pp. L591-7, Dec 1993.
- [180] K. Schultz, B. L. Fanburg, and D. Beasley, "Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 290, pp. H2528-34, Jun 2006.
- [181] R. M. Tuder, M. Chacon, L. Alger, J. Wang, L. Taraseviciene-Stewart, Y. Kasahara, *et al.*, "Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis," *J Pathol*, vol. 195, pp. 367-74, Oct 2001.
- [182] N. W. Morrell, S. Adnot, S. L. Archer, J. Dupuis, P. L. Jones, M. R. MacLean, *et al.*, "Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension," *J Am Coll Cardiol*, vol. 54, pp. S20-31, Jun 30 2009.
- [183] C. S. Branda and S. M. Dymecki, "Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice," *Dev Cell*, vol. 6, pp. 7-28, Jan 2004.
- [184] M. Lewandoski, "Conditional control of gene expression in the mouse," *Nat Rev Genet*, vol. 2, pp. 743-55, Oct 2001.

- [185] M. C. Birling, F. Gofflot, and X. Warot, "Site-specific recombinases for manipulation of the mouse genome," *Methods Mol Biol*, vol. 561, pp. 245-63, 2009.
- [186] D. Metzger and P. Chambon, "Site- and time-specific gene targeting in the mouse," *Methods*, vol. 24, pp. 71-80, May 2001.
- [187] K. Rajewsky, H. Gu, R. Kuhn, U. A. Betz, W. Muller, J. Roes, *et al.*, "Conditional gene targeting," *J Clin Invest*, vol. 98, pp. 600-3, Aug 01 1996.
- [188] H. Moessler, M. Mericskay, Z. Li, S. Nagl, D. Paulin, and J. V. Small, "The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice," *Development*, vol. 122, pp. 2415-25, Aug 1996.
- [189] P. Pacher, T. Nagayama, P. Mukhopadhyay, S. Batkai, and D. A. Kass, "Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats," *Nat Protoc*, vol. 3, pp. 1422-34, 2008.
- [190] A. Nagy, "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring," *Genesis*, vol. 26, pp. 99-109, Feb 2000.
- [191] D. T. Mason, E. Braunwald, J. W. Covell, E. H. Sonnenblick, and J. Ross, Jr., "Assessment of cardiac contractility. The relation between the rate of pressure rise and ventricular pressure during isovolumic systole," *Circulation*, vol. 44, pp. 47-58, Jul 1971.
- [192] P. Carmeliet, Y. Dor, J. M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, *et al.*, "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis," *Nature*, vol. 394, pp. 485-90, Jul 30 1998.
- [193] K. Brusselmans, F. Bono, P. Maxwell, Y. Dor, M. Dewerchin, D. Collen, *et al.*, "Hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 39192-6, Oct 19 2001.
- [194] A. G. Vij, "Effect of prolonged stay at high altitude on platelet aggregation and fibrinogen levels," *Platelets*, vol. 20, pp. 421-7, Sep 2009.
- [195] S. Lei, Z. Sun, X. He, C. Li, Y. Zhang, X. Luo, *et al.*, "Clinical characteristics of pulmonary hypertension patients living in plain and high-altitude regions," *Clin Respir J*, May 16 2019.
- [196] C. Shang, T. Wuren, Q. Ga, Z. Bai, L. Guo, A. S. Eustes, *et al.*, "The human platelet transcriptome and proteome is altered and pro-thrombotic functional responses are increased during prolonged hypoxia exposure at high altitude," *Platelets*, pp. 1-10, Feb 5 2019.
- [197] N. Gupta and M. Z. Ashraf, "Exposure to high altitude: a risk factor for venous thromboembolism?," *Semin Thromb Hemost*, vol. 38, pp. 156-63, Mar 2012.
- [198] M. M. Hickey, T. Richardson, T. Wang, M. Mosqueira, E. Arguiri, H. Yu, *et al.*, "The von Hippel-Lindau Chuvash mutation promotes pulmonary hypertension and fibrosis in mice," *J Clin Invest*, vol. 120, pp. 827-39, Mar 2010.
- [199] L. Taraseviciene-Stewart, M. R. Nicolls, D. Kraskauskas, R. Scerbavicius, N. Burns, C. Cool, *et al.*, "Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 175, pp. 1280-9, Jun 15 2007.

- [200] J. C. McKenzie, J. Clancy, Jr., and R. M. Klein, "Autoradiographic analysis of cell proliferation and protein synthesis in the pulmonary trunk of rats during the early development of hypoxia-induced pulmonary hypertension," *Blood Vessels*, vol. 21, pp. 80-9, 1984.
- [201] K. R. Stenmark, E. Gerasimovskaya, R. A. Nemenoff, and M. Das, "Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling," *Chest*, vol. 122, pp. 326S-334S, Dec 2002.
- [202] F. Rose, F. Grimminger, J. Appel, M. Heller, V. Pies, N. Weissmann, *et al.*, "Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors," *FASEB J*, vol. 16, pp. 1660-1, Oct 2002.
- [203] K. Hayashida, J. Fujita, Y. Miyake, H. Kawada, K. Ando, S. Ogawa, *et al.*, "Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension," *Chest*, vol. 127, pp. 1793-8, May 2005.
- [204] D. P. Gale, S. K. Harten, C. D. Reid, E. G. Tuddenham, and P. H. Maxwell, "Autosomal dominant erythrocytosis and pulmonary arterial hypertension associated with an activating HIF2 alpha mutation," *Blood*, vol. 112, pp. 919-21, Aug 1 2008.
- [205] Y. M. Kim, E. A. Barnes, C. M. Alvira, L. Ying, S. Reddy, and D. N. Cornfield, "Hypoxia-inducible factor-1alpha in pulmonary artery smooth muscle cells lowers vascular tone by decreasing myosin light chain phosphorylation," *Circ Res*, vol. 112, pp. 1230-3, Apr 26 2013.
- [206] T. Nagaoka, Y. Morio, N. Casanova, N. Bauer, S. Gebb, I. McMurtry, *et al.*, "Rho/Rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 287, pp. L665-72, Oct 2004.
- [207] S. L. Archer, M. Gomberg-Maitland, M. L. Maitland, S. Rich, J. G. Garcia, and E. K. Weir, "Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1alpha-Kv1.5 O<sub>2</sub>-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 294, pp. H570-8, Feb 2008.
- [208] E. A. Goncharova, "mTOR and vascular remodeling in lung diseases: current challenges and therapeutic prospects," *FASEB J*, vol. 27, pp. 1796-807, May 2013.
- [209] M. Imanishi, S. Tomita, K. Ishizawa, Y. Kihira, M. Ueno, Y. Izawa-Ishizawa, *et al.*, "Smooth muscle cell-specific Hif-1alpha deficiency suppresses angiotensin II-induced vascular remodeling in mice," *Cardiovasc Res*, vol. 102, pp. 460-8, Jun 01 2014.
- [210] K. Yamashita, D. J. Discher, J. Hu, N. H. Bishopric, and K. A. Webster, "Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 12645-53, Apr 20 2001.
- [211] T. Bertero, Y. Lu, S. Annis, A. Hale, B. Bhat, R. Saggari, *et al.*, "Systems-level regulation of microRNA networks by miR-130/301 promotes pulmonary hypertension," *J Clin Invest*, vol. 124, pp. 3514-28, Aug 2014.
- [212] C. Veith, L. M. Marsh, M. Wygrecka, K. Rutschmann, W. Seeger, N. Weissmann, *et al.*, "Paxillin regulates pulmonary arterial smooth muscle cell

- function in pulmonary hypertension," *Am J Pathol*, vol. 181, pp. 1621-33, Nov 2012.
- [213] C. Veith, S. Schmitt, F. Veit, B. K. Dahal, J. Wilhelm, W. Klepetko, *et al.*, "Cofilin, a hypoxia-regulated protein in murine lungs identified by 2DE: role of the cytoskeletal protein cofilin in pulmonary hypertension," *Proteomics*, vol. 13, pp. 75-88, Jan 2013.
- [214] G. Kwapiszewska, M. Wygrecka, L. M. Marsh, S. Schmitt, R. Trosser, J. Wilhelm, *et al.*, "Fhl-1, a new key protein in pulmonary hypertension," *Circulation*, vol. 118, pp. 1183-94, Sep 9 2008.
- [215] A. M. Zimnicka, H. Tang, Q. Guo, F. K. Kuhr, M. J. Oh, J. Wan, *et al.*, "Upregulated copper transporters in hypoxia-induced pulmonary hypertension," *PLoS One*, vol. 9, p. e90544, 2014.
- [216] C. Veith, R. T. Schermuly, R. P. Brandes, and N. Weissmann, "Molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor-induced pulmonary arterial smooth muscle cell alterations in pulmonary hypertension," *J Physiol*, vol. 594, pp. 1167-77, Mar 01 2016.
- [217] J. P. Mitchell and R. J. Carmody, "NF-kappaB and the Transcriptional Control of Inflammation," *Int Rev Cell Mol Biol*, vol. 335, pp. 41-84, 2018.
- [218] M. A. Huber, N. Azoitei, B. Baumann, S. Grunert, A. Sommer, H. Pehamberger, *et al.*, "NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression," *J Clin Invest*, vol. 114, pp. 569-81, Aug 2004.
- [219] R. D. Jones, J. S. Thompson, and A. H. Morice, "The NADPH oxidase inhibitors iodonium diphenyl and cadmium sulphate inhibit hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat pulmonary arteries," *Physiol Res*, vol. 49, pp. 587-96, 2000.
- [220] Y. T. Ahn, Y. M. Kim, E. Adams, S. C. Lyu, C. M. Alvira, and D. N. Cornfield, "Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates KCNMB1 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 302, pp. L352-9, Feb 01 2012.
- [221] E. A. Barnes, C. H. Chen, O. Sedan, and D. N. Cornfield, "Loss of smooth muscle cell hypoxia inducible factor-1alpha underlies increased vascular contractility in pulmonary hypertension," *FASEB J*, vol. 31, pp. 650-662, Feb 2017.
- [222] H. J. Bogaard, R. Natarajan, S. C. Henderson, C. S. Long, D. Kraskauskas, L. Smithson, *et al.*, "Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure," *Circulation*, vol. 120, pp. 1951-60, Nov 17 2009.
- [223] J. Aguero, K. Ishikawa, L. Hadri, C. Santos-Gallego, K. Fish, N. Hammoudi, *et al.*, "Characterization of right ventricular remodeling and failure in a chronic pulmonary hypertension model," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 307, pp. H1204-15, Oct 15 2014.
- [224] E. Daley, C. Emson, C. Guignabert, R. de Waal Malefyt, J. Louten, V. P. Kurup, *et al.*, "Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response," *J Exp Med*, vol. 205, pp. 361-72, Feb 18 2008.
- [225] M. H. Xu, Y. S. Gong, M. S. Su, Z. Y. Dai, S. S. Dai, S. Z. Bao, *et al.*, "Absence of the adenosine A2A receptor confers pulmonary arterial hypertension and increased pulmonary vascular remodeling in mice," *J Vasc Res*, vol. 48, pp. 171-83, 2011.

- [226] A. Shifren, A. G. Durmowicz, R. H. Knutsen, G. Faury, and R. P. Mecham, "Elastin insufficiency predisposes to elevated pulmonary circulatory pressures through changes in elastic artery structure," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 105, pp. 1610-9, Nov 2008.
- [227] H. Ito, Y. Hirata, M. Hiroe, M. Tsujino, S. Adachi, T. Takamoto, *et al.*, "Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes," *Circ Res*, vol. 69, pp. 209-15, Jul 1991.
- [228] J. Suzuki, S. Baba, I. Ohno, M. Endoh, J. Nawata, S. Miura, *et al.*, "Immunohistochemical analysis of platelet-derived growth factor-B expression in myocardial tissues in hypertrophic cardiomyopathy," *Cardiovasc Pathol*, vol. 8, pp. 223-31, Jul-Aug 1999.
- [229] M. J. Faber, M. Dalinghaus, I. M. Lankhuizen, P. Steendijk, W. C. Hop, R. G. Schoemaker, *et al.*, "Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 291, pp. H1580-6, Oct 2006.
- [230] L. Taraseviciene-Stewart, Y. Kasahara, L. Alger, P. Hirth, G. Mc Mahon, J. Waltenberger, *et al.*, "Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension," *FASEB J*, vol. 15, pp. 427-38, Feb 2001.
- [231] C. Partovian, S. Adnot, S. Eddahibi, E. Teiger, M. Levame, P. Dreyfus, *et al.*, "Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension," *Am J Physiol*, vol. 275, pp. H1948-56, Dec 1998.
- [232] R. Bohuslavova, F. Kolar, L. Kuthanova, J. Neckar, A. Tichopad, and G. Pavlinkova, "Gene expression profiling of sex differences in HIF1-dependent adaptive cardiac responses to chronic hypoxia," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 109, pp. 1195-202, Oct 2010.
- [233] T. Eckle, D. Kohler, R. Lehmann, K. El Kasmi, and H. K. Eltzschig, "Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning," *Circulation*, vol. 118, pp. 166-75, Jul 08 2008.
- [234] L. Lei, S. Mason, D. Liu, Y. Huang, C. Marks, R. Hickey, *et al.*, "Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein," *Mol Cell Biol*, vol. 28, pp. 3790-803, Jun 2008.
- [235] E. L. Rawlins and A. K. Perl, "The a"MAZE"ing world of lung-specific transgenic mice," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 46, pp. 269-82, Mar 2012.
- [236] L. H. Green and T. W. Smith, "The use of digitalis in patients with pulmonary disease," *Ann Intern Med*, vol. 87, pp. 459-65, Oct 1977.
- [237] S. Rich, M. Seidlitz, E. Dodin, D. Osimani, D. Judd, D. Genthner, *et al.*, "The short-term effects of digoxin in patients with right ventricular dysfunction from pulmonary hypertension," *Chest*, vol. 114, pp. 787-92, Sep 1998.
- [238] P. R. Rai, C. D. Cool, J. A. King, T. Stevens, N. Burns, R. A. Winn, *et al.*, "The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 178, pp. 558-64, Sep 15 2008.

## 9. Anhang

### 9.1 Abkürzungen

5-Hydroxytryptamin	5-HT
Aquaporin-1	AQP1
Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein	ARNT
Bone morphogenic protein	BMP
Bone morphogenic protein receptor type 2	BMPR-2
Calciumpumpe des sarco- und endoplasmatischen Reticulums	SERCA
Chronisch-hypoxische pulmonale Hypertension	CHPH
Cluster of Differentiation 31	CD31
Cu-uptake transporter 1	CTR 1
Deoxyribonucleic acid	DNA
Desoxy-Ribonukleosidtriphosphate	dNTP's
Endothelial PAS domain-containing protein 1	EPAS1
Extracellular-signal regulated kinases	ERK
Fibroblast Growth Factor 2	FGF-2
Four and a half LIM domain protein 1	FHL-1
Hypoxia response element	HRE
Hypoxie induzierter Faktor 1 $\alpha$	HIF1 $\alpha$
Hypoxie induzierter Faktor 2 $\alpha$	HIF2 $\alpha$
Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion	HPV
Interleukin 6	IL-6
Knockout	KO
Kruppel-like factor	KLF
Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen	MAPKs
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> - Austauscher	NHA
NADPH-Oxidase	NOX
Nuclear factor of activated T cells c2	NFAT c2
Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells	NF- $\kappa$ B
P38-mitogen-aktivierte Proteinkinasen	p38MAPK
Platelet-derived growth factor	PDGF

Platelet-derived growth factor receptor	PDGFR
Platelet-derived growth factor	PDGF
Plättchenaktivierender Faktor	PAF
Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1	PARP-1
Polymerase-Kettenreaktion	PCR
Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen	PAGMZ
Pulmonalarterielle Hypertension	PAH
Pulmonale Hypertension	PH
Pulmonal-vaskuläres Remodeling	PVR
Prolyl hydroxylase domain protein	PHD
Reaktive Sauerstoffspezies	ROS
Rechtsventrikuläre Hypertrophie	RVH
Ribonucleic acid	RNA
Sauerstoff	O <sub>2</sub>
Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3
Transforming growth factor $\beta$	TGF- $\beta$
Transient receptor potential channels	TRP-Kanäle
Vascular endothelial growth factor	VEGF
Von-Hippel-Lindau-Protein	pVHL

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pathobiologie der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertension	S. 13
Abb. 2: HIF1-vermittelte Effekte auf pulmonalarterielle glatte Muskelzellen	S. 34
Abb. 3: Generierung glattmuskelspezifischer HIF-Knockout-Mäuse	S. 45
Abb. 4: Beispielhafte Darstellung der links- und rechtsventrikulären Druckwerte	S. 50
Abb. 5: Beispielhafte Darstellung einer Herzmuskel-Färbung mit Hämatoxylin und Eosin	S. 53



Abb. 6: Beispiel für die Genotypisierung der glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -Mauslinien	S. 58
Abb. 7: Änderung des Körpergewichts unter Normoxie und Hypoxie	S. 60
Abb. 8: Hämatokritanstieg nach 3 Wochen Hypoxie	S. 61
Abb. 9: Glattmuskelzellspezifischer HIF $\alpha$ -Knockout schützt partiell vor pulmonalvaskulärem Remodeling nach chronischer Hypoxie	S. 65
Abb. 10: Glattmuskelzellspezifische HIF $\alpha$ -Knockout-Mäuse zeigen reduzierte Muskularisierung kleiner Pulmonalarterien nach Hypoxie	S. 66
Abb. 11: Hypoxie und glattmuskulärer HIF2 $\alpha$ -Knockout haben keinen Einfluss auf die Bildung von Kollagen und elastischen Fasern in der Lunge	S. 68
Abb. 12: Glattmuskelzellspezifischer HIF $\alpha$ -KO schützt partiell vor Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie nach chronischer Hypoxie	S. 70
Abb. 13: Linksventrikulärer systolischer Druck zeigt nach Hypoxie keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und smHIF $\alpha$ -KO-Mäusen	S. 71
Abb. 14: Sowohl Wildtyp- als auch glattmuskelzellspezifische HIF $\alpha$ -KO-Mäuse entwickeln rechtsventrikuläre Hypertrophie nach chronischer Hypoxie	S. 73
Abb. 15: Hypertrophie rechtsventrikulärer Kardiomyozyten bei Wildtyp- und glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mäusen nach chronischer Hypoxie	S. 75
Abb. 16: Rechtsventrikuläres Myokard zeigt keine relevante Zunahme an kollagenösem Bindegewebe nach chronischer Hypoxie	S. 76
Abb. 17: Fulton-Index korreliert nicht mit rechtsventrikulärem Druck nach Hypoxie	S. 77
Abb. 18: Rechtsventrikuläre Funktion bei Normoxie und nach 3 Wochen Hypoxie	S. 79

Abb. 19: Hypothese zur Pathogenese der rechtsventrikulären Hypertrophie bei glattmuskelzellspezifischen HIF $\alpha$ -KO-Mäusen	S. 93
Abb. 20: Cre-negative, geflochte Kontrollmäuse zeigen keinen Unterschied in den untersuchten phänotypischen Merkmalen unter Normoxie und nach Hypoxie	S. 106-107
Abb. 21: Sowohl Wildtyp- als auch smHIF2 $\alpha$ -KO-Mäuse zeigen nach Hypoxie keine signifikante Beeinträchtigung der linksventrikulären Herzfunktion	S. 111
Tabelle 1: Hämatologische Laborwerte	S. 63
Tabelle 2: Hämodynamische Messungen	S. 108
Tabelle 3: Körpergewicht und Herzmasse	S. 109

### 9.3 Publikationen und Poster

Z. Zhang, B. Trautz, D. Kracun, **F. Vogel**, M. Weitnauer, K. Hochkogler, et al., "Stabilization of p22phox by Hypoxia Promotes Pulmonary Hypertension," Antioxid Redox Signal, vol. 30, pp. 56-73, Jan 1 2019.

**Vogel F**, Petry A, Zhang Z, Görlach A: "Loss of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  in smooth muscle cells prevents hypoxia-induced pulmonary hypertension", Poster und Präsentation, Munich Heart Alliance Meeting, Munich Feb 2018.

Chaudhari SM, Sluimer JC, Koch M, Theelen TL, Manthey HD, Busch M, Caballero-Franco C, **Vogel F**, et al., "Deficiency of HIF1 $\alpha$  in Antigen-Presenting Cells Aggravates Atherosclerosis and Type 1 T-Helper Cell Responses in Mice", Arterioscler Thromb Vasc Biol, vol. 35, pp. 2316-25, Nov 2015.

**Vogel F** et al.: "The role of HIF transcription factors in hypoxia-induced pulmonary hypertension and in the fetal adaption to excess hypoxia", Poster und Präsentation, Doctoriales de l'Ecole Polytechnique, Paris Oct 2013.

## 9.4 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. Agnes Görlach bedanken, für die Möglichkeit der Promotion über dieses spannende Thema in ihrem Labor am Deutschen Herzzentrum München. Herzlichen Dank für die vielen Diskussionen und die Gelegenheiten, im Rahmen der Promotion an wissenschaftlichen Kongressen teilzunehmen. Ein besonderer Dank geht an Dr. Andreas Petry und Dr. Zuwen Zhang für die gute Betreuung, Unterstützung und die wertvollen Hilfestellungen bei den Experimenten.

Außerdem möchte ich mich bei den weiteren aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Labors bedanken, für die Hilfe und all die interessanten Diskussionen und Gespräche: Benjamin Trautz, Damir Kračun, Anna Knirsch, Linda Li, Katharina Bertram, Karim Sabrane und Ioannis Vouldis. Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Stefan Engelhardt und seine Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meiner gesamten Familie für die große Unterstützung während der letzten Jahre bedanken.