

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

**Auto- und parakrine Modulationsmechanismen von
Apelin in der Pathogenese der Pulmonalen
Arteriellen Hypertonie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Antonia Katharina Glatzel

Hamburg, Juni 2018

Mai 2014 - Dezember 2017

Datum der Disputation: 31. August 2018

Datum der Zulassung zur Veröffentlichung: 31. August 2018

1. Gutachterin: Prof. Dr. Elke Oetjen
2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Böger
3. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Wicha

Es gibt nichts Schöneres als das Mysteriöse. Aus ihm entspringt
wahre Kunst und Wissenschaft.

Albert Einstein

Meinen Eltern.

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis.....	V
III	Abbildungsverzeichnis.....	XI
IV	Tabellenverzeichnis.....	XV
1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Einleitung	3
3.1	Pulmonale Arterielle Hypertonie	3
3.1.1	Definition und Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie.....	3
3.1.2	Epidemiologie.....	6
3.1.3	Diagnostik und Therapie.....	7
3.1.4	Pathogenese der PAH.....	9
3.1.4.1	Proliferation und vaskuläres Remodeling.....	9
3.1.4.2	Inflammatorische Prozesse	10
3.2	L-Arginin-NO-Stoffwechselweg	11
3.2.1	Stickstoffmonoxid und dessen endogene Regulation.....	11
3.2.2	Methylarginine	12
3.2.3	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolasen	14
3.2.4	Pathologische Bedeutung bei der PAH	16
3.3	Apelin und der Apelin-Rezeptor	17
3.3.1	Charakterisierung und Regulation.....	17
3.3.2	Pathophysiologische Bedeutung.....	19
3.4	Hypoxie als Modell einer PAH	20
3.5	Zielsetzung der Arbeit.....	22
4	Ergebnisse.....	23
4.1	Untersuchungen des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges.....	24
4.1.1	Untersuchungen zum Einfluss von Apelin auf den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg in Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen	24
4.1.1.1	Einfluss von Hypoxie in HPMEC	24
4.1.1.1.1	Regulation von Apelin und dem Apelin-Rezeptor	24
4.1.1.1.2	Expression NO-modulierender Enzyme.....	25

4.1.1.1.3	Konzentrationen der Dimethylarginine im Zellkulturüberstand von HPMEC.....	27
4.1.1.1.4	Bestimmung der Nitrit-Konzentration im Überstand von HPMEC	28
4.1.1.2	Einfluss von Apelin in Pulmonalen Endothelzellen.....	28
4.1.1.2.1	Regulation von Apelin und dem Apelin-Rezeptor	28
4.1.1.2.2	Expression NO-modulierender Enzyme.....	29
4.1.1.2.3	Konzentration der Dimethylarginine im Überstand von HPMEC	31
4.1.1.2.4	Bestimmung der Nitritkonzentration im Überstand von HPMEC	32
4.1.2	Tierexperimentelle Untersuchungen zur Analyse des Einflusses von Apelin auf den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg.....	33
4.1.2.1	Global <i>Ddah1</i> -defiziente Mäuse	34
4.1.2.2	Validierung des PAH-ähnlichen Phänotyps.....	35
4.1.2.2.1	Expression NO-modulierender Enzyme.....	37
4.1.2.2.3	Regulation von Apelin und dem Apelin-Rezeptor	40
4.1.2.2.4	Hämatokrit, hämodynamische Parameter und Rechtsherzhypertrophie	41
4.1.2.2.5	Pulmonale Gefäß- und Alveolarveränderungen.....	45
4.1.2.3	Einfluss von Apelin auf den PAH-ähnlichen Phänotyp	49
4.1.2.3.1	Konzentrationsfindung.....	50
4.1.2.3.2	Gewichtsveränderungen.....	51
4.1.2.3.3	Apelin-Plasmakonzentrationen	52
4.1.2.3.5	Plasma-Konzentrationen der L-Arginin-Derivate nach Apelin-Supplementation ..	55
4.1.2.3.6	Regulation des Apelin-Rezeptors	56
4.1.2.3.7	Hämatokrit, hämodynamische Parameter und Rechtsherzhypertrophie	57
4.1.2.4	Pulmonale Gefäß- und Alveolarveränderungen.....	62
4.2	Untersuchungen des PI3K/AKT-Signalweges.....	67
4.2.1	Beeinflussung des PI3K/AKT-Signalweges durch Hypoxie.....	67
4.2.1.1	Beeinflussung des PI3K/AKT-Signalweges durch Apelin.....	68
4.3	Apelinabhängige Immunmodulation in M2-Makrophagen	71
4.3.1	Regulation des Apelin-Rezeptors	71
4.3.2	Zytokin-Expression.....	73
4.3.3	Kollagen-Metabolismus	75
4.3.4	Analyse von Makrophagen im Tiermodell	76
4.3.5	Involvierung des PI3K/AKT-Stoffwechselweges	78
5	Diskussion	79
5.1	Hypoxie als Modell einer Pulmonalen Arteriellen Hypertonie	80
5.1.1	Regulation von Apelin und dem Apelin-Rezeptor	81
5.1.2	Regulation des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges.....	83
5.1.3	Hämatokrit, hämodynamische Parameter und Rechtsherzhypertrophie im Tiermodell	86
5.1.4	Pulmonale Gefäß- und Alveolarveränderungen im Tiermodell	89

5.2	Apelin als Modulator autokriner Mechanismen	91
5.2.1	Regulation von APLNR.....	92
5.2.2	Regulation des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges.....	94
5.2.3	Hämatokrit, hämodynamische Parameter und Rechtsherzhypertrophie im Tiermodell	96
5.2.4	Pulmonale Gefäß- und Alveolarveränderungen im Tiermodell	97
5.3	Apelin als Modulator parakriner Mechanismen	99
5.3.1	Regulation des Apelin-Rezeptors	100
5.3.2	Zytokinexpression	100
5.3.3	Kollagen-Metabolismus	101
6	Material und Methoden	103
6.1	Material.....	103
6.1.1	Substanzen	103
6.1.2	Geräte	108
6.1.3	Software	112
6.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	113
6.1.5	Kits.....	116
6.1.6	Lösungen und Puffer	117
6.1.7	Antikörper	120
6.1.7.1	Primäre Antikörper	120
6.1.7.2	Sekundäre Antikörper.....	121
6.1.8	DNA- und Proteinmolekulargewichtsmarker.....	121
6.1.9	Biologisches Material	122
6.1.9.1	Endotheliales Zellkulturmodell.....	122
6.1.9.2	Patientendaten	123
6.1.9.3	Tiermodell	123
6.2	Methoden	125
6.2.1	Proteinanalytische Methoden.....	125
6.2.1.1	Zelllyse zur Proteinanalytik	125
6.2.1.2	Bradford-Proteinbestimmung	125
6.2.1.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	126
6.2.1.4	Immunoblot.....	127
6.2.1.5	Apelin-ELISA	129
6.2.1.6	Pathscan® Akt Signaling Antibody Array Kit	129
6.2.1.7	Human Cytokine Array® Panel A.....	130
6.2.2	DNA-Analysen	130
6.2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	130
6.2.2.2	Klassische Polymerase-Kettenreaktion.....	130
6.2.2.3	DNA-Gelelektrophorese.....	131

6.2.3	RNA-Analysen	133
6.2.3.1	RNA-Isolation	133
6.2.3.2	Quantitative Nukleinsäureanalyse.....	134
6.2.3.3	RNA-Gelelektrophorese.....	134
6.2.3.4	Reverse Transkription.....	135
6.2.3.5	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	136
6.2.4	Fluorimetrische Bestimmung der Nitritkonzentration im Überstand von HPMEC	138
6.2.5	Bestimmung der Kollagen-Konzentration im Überstand.....	139
6.2.6	Instrumentelle Analytik.....	140
6.2.6.1	Bestimmung der ADMA-, SDMA- und L-Arginin-Konzentrationen	140
6.2.6.2	Analytik von ex vivo generierten M2 Makrophagen	142
6.2.6.2.2	Durchflusszytometrie	143
6.2.7	<i>In vivo</i> Untersuchungen im Tiermodell	144
6.2.7.1	Implantation osmotischer Minipumpen.....	145
6.2.7.2	Blutentnahme	146
6.2.7.3	Hämatokritmessung.....	146
6.2.7.4	Rechtsherzkatheteruntersuchung	147
6.2.7.5	Auswiegen des rechten Herzens	148
6.2.7.6	Histologische Analyse.....	148
6.2.8	Statistische Auswertung	150
7	Literaturverzeichnis	151
8	Anhang.....	165
8.1	Ergänzende Daten	165
8.2	Lebenslauf	169
8.3	Veröffentlichungen.....	170
8.4	Gefahrenstoffe nach GHS (H- und P-Sätze)	171
9	Danksagung.....	181
10	Eidesstattliche Erklärung	183

II Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchschnittszeichen
±	Plusminuszeichen
=, >, <	Vergleichszeichen; Gleichheitszeichen, Größer-als-, Kleiner-als-Zeichen
6-MWT	<i>Six-minutes walk test</i> , 6-Minuten-Gehtest
A	Alanin
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i> , Angiotensin-spaltendes Enzym
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGXT2	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2
AKT	Proteinkinase B
ALK-1	<i>Activin receptor-like kinase</i>
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APAH	Assoziierte PAH
APC	Allophycocyanin
APLNR	Apelin-Rezeptor
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
α-SMA	<i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i>
BA	Bronchialarterie
Bad	<i>B-cell lymphoma 2-associated death promoter</i>
BMPR2	<i>Bone morphogenetic protein receptor type II</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
c	Konzentration
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CAT	<i>Cationic Amino Acid Transporter</i> , kationischer Aminosäuretransporter
CAV-1	Caveolin-1
CCL	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> , CC-Chemokinligand
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA

cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> , zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL4A1	Kollagen Typ IV, alpha 1
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CXCL	<i>CXC motif chemokine ligand</i> , CXC-Chemokinligand
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
dH ₂ O	Demineralisiertes, autoklaviertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDRF	<i>Endothelium derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4e	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i> , eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ENG	Endoglin
ERA	Endothelin-Rezeptor-Antagonist
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
ESI	<i>Electrospray ionisation</i> , Elektrospray-Ionisation
Et al.	<i>Et alii</i> , und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GSK	Glykogensynthase-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Human
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin

HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i> , Hypoxie-induzierter Faktor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPAH	Hereditäre PAH
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPMEC	Humane Pulmonale Mikrovaskuläre Endothelzellen
HRE	<i>Hypoxia-responsive element</i> , Hypoxie-empfindlicher Bereich
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
hr(s)	<i>Hour(s)</i> , Stunde(n)
Hz	Hertz
HZV	Herzzeitvolumen
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPAH	Idiopathische PAH
kb	Kilobase
KCNK	<i>Potassium channel subfamily K</i>
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
LC	<i>Liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
L-NMMA	L-N ^ω -Monomethylarginin
m	Murin
mA	Milliampère
MCP	Makrophagen-Chemoattraktorprotein
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i> , Makrophagen-Migrations- Inhibitions-Faktor
min	Minuten
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulation Factor</i> , Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µL	Mikroliter
mL	Milliliter

µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
µmol	Mikromol
mmol	Millimol
mPAP	<i>Mean pulmonary arterial pressure</i> , mittlerer pulmonalarterielle Druck
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i> , Ziel des Rapamycins im Säugetier
m/v	Masse/Volumen
MW	Arithmetisches Mittel, Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaN ₃	Natriumazid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NO	<i>Nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOHA	N ^ω -Hydroxy- L-Arginin
NOS	NO-Synthase
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OH	Hydroxylgruppe
p	Signifikanzwert
p70S6K	Ribosomales Protein S6 Kinase
Pa	Pascal
PA	Pulmonalarterie
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH	Pulmonale Arterielle Hypertonie
PAWP	<i>pulmonary arterial wedge pressure</i> , pulmonal-arterieller Verschlussdruck

PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , mononukleäre Zellen des periphären Blutes
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphatgepuffertes Salz
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDK	PI3-abhängige Proteinkinase
PE	Phycoerythrin
PGI ₂	<i>Prostaglandin I₂</i> , Prostazyklin
PH	Pulmonale Hypertonie
PI3(K)	Phosphoinositid-3 (Kinase)
pmol	Pikomol
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPHN	Persistierende Pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
PRAS	Prolin-reiches AKT-Substrat
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PVR	<i>Pulmonary Vascular Resistance</i> , Pulmonaler Gefäßwiderstand
Pyr-	Pyroglutamyl-
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	Bestimmtheitsmaß
RAC	<i>Radial Alveolar Count</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpS6	Ribosomales Protein S6
RPL13A	Ribosomales Protein L13A
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RSK	Ribosomale S6 Kinase
RT	Reverse Transkription
RVSP	<i>Right ventricular systolic pressure</i> , Rechtsventrikulärer systolischer Druck
S	Svedberg-Einheit
s	Sekunden
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes

sGC	<i>Soluble Guanylate cyclase</i> , lösliche Guanylylcyclase
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
T	Thymin
TBS(-T) 20)	<i>Tris-Buffered Saline (with Tween 20)</i> , Tris-gepufferte Salzlösung (mit Tween 20)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i> , Transformierender Wachstumsfaktor
TH	T-Helfer-Zelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
U	Umdrehungen
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
WU	<i>Wood Unit</i>

Drei-Buchstaben-Code verwendeter Aminosäuren:

Ala	Alanin	Met	Methionin
Arg	Arginin	Phe	Phenylalanin
Gln	Glutamin	Pro	Prolin
Glu	Glutaminsäure	Ser	Serin
Gly	Glycin	Thr	Threonin
His	Histidin	Trp	Tryptophan
Leu	Leucin	Val	Valin
Lys	Lysin		

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1:	Katalyse der NO-Synthasen	11
Abbildung 3.2:	Chemische Strukturen der Aminosäure L-Arginin sowie der Metabolite ADMA, SDMA und L-NMMA.	13
Abbildung 3.3:	Enzymatische Katalyse der DDAH am Beispiel des Abbaus von ADMA zu L-Citrullin und Dimethylamin.	14
Abbildung 3.4:	Vereinfachte Übersicht der Regulation des L-Arginin-NO-Metabolismus.	16
Abbildung 3.5:	Darstellung von Apelin.	18
Abbildung 3.6:	Vaskulärer Effekt auf eine akute alveoläre oder chronische Hypoxie.	20
Abbildung 4.1:	Apelin-Plasmakonzentrationen in Patienten mit einer Idiopathischen Pulmonalen Arteriellen Hypertonie im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv.	23
Abbildung 4.2:	Apelin-Freisetzung und Expression des Apelin-Rezeptors in HPMEC durch Hypoxie-Exposition.	25
Abbildung 4.3:	DDAH1 und DDAH2 Expression sowie NOS3 mRNA Expression unter Hypoxie-Exposition in HPMEC.	26
Abbildung 4.4:	ADMA- und SDMA-Konzentrationen im Überstand Normoxie- und Hypoxie-behandelter HPMEC.	27
Abbildung 4.5:	Nitritkonzentration im Überstand Hypoxie-exponierter HPMEC.	28
Abbildung 4.6:	Veränderte Expression des Apelin-Rezeptors durch Apelin-Behandlung unter Hypoxie kultivierter Zellen.	29
Abbildung 4.7:	Veränderte Expression der NO-modulierenden Enzyme durch Apelin-Behandlung in HPMEC.	30
Abbildung 4.8:	Konzentrationen der Dimethylarginine ADMA und SDMA im Zellkulturüberstand von HPMEC.	31
Abbildung 4.9:	Einfluss von Apelin auf die Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand von unter Normoxie und Hypoxie kultivierten HPMEC.	32
Abbildung 4.10:	Einfluss einer Apelin-Behandlung von Ebselen-vorinkubierten Zellen auf die Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand von HPMEC.	33
Abbildung 4.11:	<i>Ddah1</i> und <i>Ddah2</i> mRNA Expression im pulmonalen Gewebe von Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen.	34
Abbildung 4.12:	mRNA Expression der <i>Ddah1</i> , <i>Ddah2</i> und <i>Aplnr</i> in unterschiedlichen Gewebearten.	35
Abbildung 4.13:	Gewichtsveränderungen der Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit.	36
Abbildung 4.14:	Pulmonale <i>Ddah1</i> und <i>Ddah2</i> mRNA Expression unter Normoxie und Hypoxie gehaltener Versuchstiere.	37
Abbildung 4.15:	Immunoblots aus Lungenhomogenaten normoxisch- und hypoxisch-behandelter Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienter Mäuse.	38

Abbildung 4.16:	Hypoxie-induzierte Regulation von L-Arginin und den Dimethylargininen ADMA und SDMA in Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen.	39
Abbildung 4.17:	Einfluss von Hypoxie auf die Apelin-Plasmakonzentration sowie auf die pulmonale Expression seines G-Protein-gekoppelten Rezeptors <i>Ap1nr</i> in Mäusen.	40
Abbildung 4.18:	Hämatokrit von Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen unter Hypoxie-Exposition.	41
Abbildung 4.19:	Mittlerer rechtsventrikulärer systolischer Druck von Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen unter normobaren, normoxischen und hypoxischen Bedingungen.	42
Abbildung 4.20:	Veränderungen der Rechtsherzhypertrophie-Indices durch Hypoxie-Exposition in Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen.	43
Abbildung 4.21:	Kardiomyoztenfläche von Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen nach Hypoxie-Exposition.	44
Abbildung 4.22:	Beispielhafte histologische Elastica-van-Gieson-Färbung der pulmonalen Gefäße.	45
Abbildung 4.23:	Veränderung der Intima-Media- und Adventitiadicke der Pulmonal- und Bronchialarterien durch Hypoxie-Exposition.	46
Abbildung 4.24:	Histologische Färbungen zur Ermittlung pulmonaler Gefäß- und Strukturveränderungen durch Hypoxie-Exposition in Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen.	47
Abbildung 4.25:	Pulmonale Gefäßmuskularisierung und -rarifizierung in Hypoxie-behandelten Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen.	48
Abbildung 4.26:	Pulmonale <i>Col4a1</i> mRNA Expression in normoxischen und hypoxischen Mäusen.	49
Abbildung 4.27:	Apelin-Plasmakonzentrationen von Apelin- und NaCl-supplemetierten Wildtyp-Mäusen innerhalb eines Versuchszeitraumes von vier Wochen.	50
Abbildung 4.28:	Gewichtsveränderungen der Apelin- und NaCl-supplementierten Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit.	51
Abbildung 4.29:	Änderung der Apelin-Plasmakonzentrationen durch Apelin- oder NaCl-Supplementation in unter Hypoxie gehaltenen Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen.	52
Abbildung 4.30:	Pulmonale <i>Ddah1</i> und <i>Ddah2</i> mRNA Expression Apelin- und NaCl-supplementierter Mäuse.	53
Abbildung 4.31:	Immunoblot-Analyse von Apelin- und NaCl-supplementierten Mäusen.	54
Abbildung 4.32:	Plasma-Konzentrationen der Methylarginine nach Apelin-Supplementation in <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistern.	55
Abbildung 4.33:	Apelin-Rezeptor Expression in Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen nach Apelin- oder NaCl-Verabreichung unter Hypoxie-Exposition.	57
Abbildung 4.34:	Hämatokrit der Apelin- oder NaCl-supplementierten Mäuse nach vierwöchiger Hypoxie-Exposition.	58

Abbildung 4.35:	Änderung des mittleren rechtsventrikulären systolischen Druckes nach Apelin-Supplementation von Mäusen unter Hypoxie-Exposition.	58
Abbildung 4.36:	Rechtsherzhypertrophie-Indices in Apelin- und NaCl-supplementation Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen unter Hypoxie-Exposition.	59
Abbildung 4.37:	Kardiomyoztengröße im rechten Ventrikel von Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen nach vierwöchiger Apelin- oder NaCl-Supplementation.	61
Abbildung 4.38:	Histologische Färbung von pulmonalen Gefäßen hypoxischer Apelin- und NaCl-supplementierter Tiere mittels Elastika-van-Gieson-Färbung.	62
Abbildung 4.39:	Intima-Media- und Adventitiadicke der Pulmonal- und Bronchialarterien in Apelin- und NaCl- supplementierten Tieren.	63
Abbildung 4.40:	Histologische Färbungen zur Ermittlung pulmonaler Gefäß- und Strukturveränderungen durch Supplementation von Apelin in hypoxischen Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen.	64
Abbildung 4.41:	Pulmonale Gefäßmuskularisierung und -rarifizierung in Apelin- und NaCl-behandelten Mäusen unter Hypoxie-Exposition.	65
Abbildung 4.42:	Pulmonale <i>Col4a1</i> mRNA Expression in Apelin-supplementierten Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Tieren.	66
Abbildung 4.43:	Hypoxie-bedingte veränderte Phosphorylierung einzelner Proteine des PI3K/AKT-Signalweges in HPMEC.	67
Abbildung 4.44:	Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/AKT-Signalweges nach Apelin-Inkubation von HPMEC unter Normoxie- und Hypoxie-Exposition.	69
Abbildung 4.45:	DDAH mRNA Expression und ADMA-Konzentrationen im Zellkultur-Überstand von HPMEC nach GSK3-Inhibition.	70
Abbildung 4.46:	Expression des Apelin-Rezeptors auf der Oberfläche von M2-Makrophagen von PAH-Patienten und gesunden Probanden.	72
Abbildung 4.47:	Profil von sezernierten Zytokinen, gemessen im Zellkulturüberstand <i>ex vivo</i> generierter M2-Makrophagen.	74
Abbildung 4.48:	IL-13, IL-16 und CXCL1 mRNA Expression von Apelin-behandelten <i>ex vivo</i> generierten M2-Makrophagen.	75
Abbildung 4.49:	Kollagen-Konzentrationen im Zellkulturüberstand <i>ex vivo</i> generierter M2-Makrophagen nach Apelin-Behandlung.	76
Abbildung 4.50:	Immunhistochemische F4/80-Färbung im pulmonalen Gewebe von genetisch unveränderten Mäusen	77
Abbildung 4.51:	Relative Phosphorylierung von Proteinen unbehandelter und Apelin-behandelter Zellkulturüberstände von M2-Makrophagen, isoliert aus dem Blut von PAH-Patienten.	78
Abbildung 5.1:	Graphische Darstellung der Ergebnisse.	102
Abbildung 6.1:	Modifizierte Hypoxie-Käfige mit integrierten Sauerstoffmessgeräten.	124
Abbildung 6.2:	Chemilumineszenz-Film des Pathscan® Akt Signaling Antibody Array Kit.	129

Abbildung 6.3:	Analyse des Genotyps von Wildtyp-Mäusen, <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen sowie heterozygoten Tieren.	132
Abbildung 6.4:	RNA-Gelelektrophorese zur Analyse der RNA-Integrität.	135
Abbildung 6.5:	Beispielhafte Analyse des mittleren rechtsventrikulären systolischen Druckes.	147
Abbildung 8.1:	DDAH1-Immunoblots von Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen.	165
Abbildung 8.2:	DDAH1-Immunoblot aus Lungen-Proteinlysaten von unter Normoxie und Hypoxie gehaltenen Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen.	165
Abbildung 8.3:	DDAH1 und DDAH2 Proteinexpression aus Lungen-Proteinlysaten von Apelin- und NaCl-supplementierten Mäusen.	166
Abbildung 8.4:	Apelin-Plasmakonzentration in arteriellem und venösem Blut von Wildtyp-Mäusen.	166
Abbildung 8.5:	Relative Expression von CC-Chemokinligand 22 und Transglutaminase 2 zur Analyse des Makrophagen-Subtyps vor und nach der Polarisierung von M0-Makrophagen zu M2-Makrophagen.	167

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie.	5
Tabelle 6.1:	Zusammensetzung <i>Endothelial Cell Growth Medium</i> MV-Komplettmedium, 500 mL.	122
Tabelle 6.2:	Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele einer SDS-PAGE.	126
Tabelle 6.3:	Anordnung der Membranen und Filter zwischen den Elektroden für den Proteintransfer.	127
Tabelle 6.4:	Im Immunoblot verwendete Primär- und Sekundärantikörper, Verdünnungen und erwartete Proteingröße.	128
Tabelle 6.5:	Temperaturprogramm für die PCR zur Genotypisierung von Wildtyp- und <i>Ddah1</i> -defizienten Mäusen.	131
Tabelle 6.6:	Verwendete Primer für die PCR zur Genotypisierung.	131
Tabelle 6.7:	Zusammensetzung des Master Mixes zur Reversen Transkription mittels High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®.	135
Tabelle 6.8:	Temperaturprogramm zur Reversen Transkription.	136
Tabelle 6.9:	Sequenzen und Fragmentgrößen der zur quantitativen PCR verwendeten Primer.	137
Tabelle 6.10:	Amplifikationsbedingungen für die qPCR zur quantitativen Genanalyse.	138
Tabelle 6.11:	Chromatographische Parameter zur Analyse von L-Arginin, Asymmetrischem Dimethylarginin und Symmetrischem Dimethylarginin mittels LC-MS/MS.	141
Tabelle 6.12:	Massenspektrometrische Parameter zur Analyse von L-Arginin, Asymmetrischem Dimethylarginin und Symmetrischem Dimethylarginin mittels LC-MS/MS-Analyse.	141
Tabelle 6.13:	Zusammensetzung RPMI-Komplettmedium, 500 mL.	142
Tabelle 6.14:	Verwendete Antikörper zur APLNR-Detektion mittels FACS-Analyse.	144
Tabelle 6.15:	Schematische Darstellung der Versuchsabläufe.	145

1 Zusammenfassung

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) bezeichnet eine seltene Erkrankung multifaktorieller Ätiologie, die durch eine Zunahme des mittleren pulmonal-arteriellen Druckes ≥ 25 mmHg sowie eine endotheliale Dysfunktion, strukturelle Umbauprozesse sowie inflammatorische Prozesse charakterisiert wird. Es resultiert eine chronische Rechtsherzbelastung, die zum Rechtsherzversagen führen kann. Die aktuellen Möglichkeiten der Pharmakotherapie zielen auf eine NO-vermittelte Vasodilatation, um den mittleren pulmonal-arteriellen Druck zu reduzieren und die Gefäßhomöostase zu verbessern. Ein viel diskutiertes Zielmolekül stellt Apelin in diesem Zusammenhang dar, da es durch Interaktion mit seinem Rezeptor neben vasodilatativen Eigenschaften auch positiv inotrope Wirkungen zeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein möglicher Zusammenhang zwischen Apelin und dem L-Arginin-NO-Stoffwechselweg untersucht werden und der Einfluss von Apelin auf hämodynamische und inflammatorische Parameter, assoziiert mit einer PAH, analysiert werden. Weiterhin soll im Rahmen eines tierexperimentellen Ansatzes untersucht werden, ob der Effekt von Apelin auf die Entwicklung des PAH-Phänotyps durch die Ausschaltung der *Ddah1* moduliert werden kann.

Apelin konnte als Induktor der DDAH1 Expression im Zellkultur- und Tiermodell identifiziert werden, der mit einer reduzierten Bioverfügbarkeit des kardiovaskulären Risikofaktors ADMA einhergeht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine PAH, induziert durch eine Hypoxie-Exposition, den rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSP) in Mäusen *Ddah1*-unabhängig steigert und eine Rechtsherzhypertrophie sowie pulmonale Gefäßveränderungen begünstigt. Eine Apelin-Behandlung konnte diesen Veränderungen entgegenwirken, da die Apelin-Verabreichung, abhängig von der *Ddah1*, in einer Verminderung des Druckes sowie in einer Reduktion pulmonaler Gefäßveränderungen resultierte. *Ddah1*-unabhängig resultierte eine Apelin-Behandlung in einem verminderten Auftreten rechtsherzhypertropher Prozesse.

Weiterhin konnte eine Apelin-Behandlung mit einer Reduktion proinflammatorischer Zytokine im Zellkulturüberstand von ex vivo generierten PAH-Makrophagen und einer reduzierten Makrophagenanzahl im pulmonalen Gewebe von Wildtyp-Mäusen assoziiert werden.

Diese Daten zeigen, dass Apelin einen Modulator des L-Arginin-NO-Metabolismus darstellt und die Entwicklung einer PAH beeinflussen kann. Insgesamt stellt diese Arbeit Apelin als mögliches Zielmolekül für weiterführende Forschung zur Entwicklung von PAH-Pharmakotherapeutika dar.

2 Summary

Pulmonary hypertension is known as a disease of multifactorial etiology characterized by an increase in average pulmonary arterial pressure ≥ 25 mmHg, endothelial dysfunction, vascular remodeling processes and inflammatory processes. This results in a chronic right-heart overload and ultimately leads to right-heart failure.

The goal of pharmacotherapy is to modulate the NO-metabolism, in order to reduce the mean pulmonary-arterial pressure and to improve the vascular homeostasis. A much discussed target represents Apelin, as it shows positive inotropic effects and vasodilating properties by interaction with its receptor.

The aim of this study was to identify a possible link between Apelin and the L-arginine-NO metabolic pathway and to investigate the influence of Apelin on hemodynamic and inflammatory parameters associated with a PAH.

Apelin was identified as an inducer of DDAH1 expression in the cell culture and animal model, along with a reduced bioavailability of the cardiovascular risk factor ADMA. Furthermore, it was shown that PAH, induced by hypoxia exposure, increases the mean pulmonary arterial pressure regardless of the *Ddah1* in mice and favours a right heart hypertrophy as well as pulmonary vascular changes. Apelin treatment was able to prevent these changes reducing the average pulmonary arterial pressure as well as pulmonary vascular changes. A participation of the DDAH1 could be established in this context. DDAH1 independently Apelin treatment resulted in a diminished incidence of right-heart hypertrophic processes.

Furthermore, Apelin treatment was associated with a reduction of proinflammatory cytokines in the cell culture supernatant of PAH-macrophages and a reduced number of macrophages in the pulmonary tissue of wild-type mice.

The data show that Apelin represents a modulator of the L-arginine-NO metabolism and shows protective properties to influence the emergence of PAH. Overall, this work demonstrates Apelin as a potential target for further research in the development of PAH pharmacotherapy.

3 Einleitung

3.1 Pulmonale Arterielle Hypertonie

Vor über einem Jahrhundert wurden erstmalig die Veränderungen der Lungengefäße, die laut heutigem Wissensstand das Krankheitsbild der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie (PAH) beschreiben, als Mitteilung im österreichischen Wochenblatt der königlich-kaiserlichen Gesellschaft der Ärzte in Wien veröffentlicht. Der Pathologe Julius Klob betitelte das pathologische Erscheinungsbild als „*Endarteriitis pulmonalis deformans*“ (Klob 1865).

1891 wurde diese Symptomatik von dem deutschen Internisten Ernst von Romberg als „Isolierte Sklerose der Lungenarterien“ dargestellt (Romberg 1891). Erst mit der Möglichkeit, eine Rechtsherzkatheteruntersuchung durchzuführen, konnten Symptome und Ursachen aufgeklärt werden. Werner Forßmann, André Frédéric Cournand und Dickinson Woodruff Richards erhielten 1956 für die Etablierung dieser Methode gemeinsam den Nobelpreis für Medizin (Forssmann 1929; Cournand et al. 1945; Richards 1947). Bis in die 1940er Jahre folgten Darstellungen der klinischen Symptomatik und Ätiologie der PAH, bis 1946 Gilmour und Evens das Krankheitsbild erstmalig als „Pulmonale Hypertonie“ (PH) bezeichneten, indem sie die klinische Symptomatik einer 44-jährigen Patientin beschrieben (Gilmour und Evans 1946). Nachdem in den 1960er Jahren die Einnahme des Appetitzüglers Aminorex mit dem Auftreten einer PAH assoziiert wurde, rückte die Erkrankung aufgrund der steigenden Prävalenz wieder in den Fokus der Wissenschaftler. Daraufhin wurden 1973 von der *World Health Organization* (WHO) erstmals klinische und pathologische Standards definiert sowie eine ätiologische und morphologische Klassifikation festgelegt (Hatano und Strasser 1975).

3.1.1 Definition und Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie

Die PAH ist heute als eine sehr seltene und schwere, chronisch-progressive Gefäßerkrankung bekannt, die durch einen erhöhten Druck in den pulmonalen Gefäßen charakterisiert ist. Die Druckveränderungen führen zu einer Elevation des pulmonalvaskulären Widerstandes (PVR). Im Rahmen der vierten PH Weltkonferenz in Dana Point, USA, im Jahre 2008 wurde die manifeste PAH als eine Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (mPAP) über 25 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) in Ruhe definiert (Badesch *et al.* 2009). Die Druckerhöhung führt zu einer chronischen Rechtsherzbelastung, die unbehandelt zur Ausbildung eines *Cor pulmonale*, einer Rechtsherzhypertrophie als Folge einer PAH, bis hin zu einem Rechtsherzversagen führen kann (Hoepfer *et al.* 2013). Eine PH geht einher mit einer hohen Letalität sowie einer reduzierten Lebenserwartung von durchschnittlich 2,8 Jahren nach Diagnosestellung (D'Alonzo 1991). Betroffene Patienten zeigen oft unspezifische Symptome

wie Fatigue, abnehmende Leistungsfähigkeit, thorakale Schmerzen, Belastungsdyspnoe und teilweise eine leichte Zyanose, was häufig eine Diagnosestellung in einem schon fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zur Folge hat (Rubin 1997; Humbert *et al.* 2006). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer zunehmenden Belastungsintoleranz, welche die Lebensqualität der Betroffenen stark einschränkt.

Während der ersten Weltkonferenz zum Thema Pulmonale Hypertonie, die 1973 in Genf stattfand, wurde erstmalig eine Einteilung der PH aufgrund histopathologischer Kriterien in die primäre und sekundäre PH vorgenommen (Hatano und Strasser 1975). Während der folgenden Weltkonferenzen wurde diese Klassifizierung mehrfach überarbeitet, wobei pathologische und hämodynamische Charakteristika mehr in den Vordergrund rückten, aber auch mögliche Ursachen und Risikofaktoren der Erkrankung definiert wurden. Aufgrund fortschreitender wissenschaftlicher Erkenntnisse, verbunden mit der Entwicklung wirksamer Möglichkeiten der Pharmakotherapie, konnten auf der dritten Weltkonferenz in Venedig erstmals Therapieempfehlungen definiert werden (Simonneau *et al.* 2004).

Die PAH tritt in den meisten Fällen idiopathisch auf. Weitere Formen sind hereditäre oder assoziiert mit Medikamenteneinnahme, Bindegewebserkrankungen, angeborenen Herzfehlern, HIV, Schistosomiasis oder portaler Hypertonie. Die aktuelle Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie, die die Erkrankung entsprechend ihrer Ursachen und klinischen Merkmale in fünf Gruppen unterteilt, wurde 2013 in Nizza festgelegt und umfasst auch die häufigen Formen der PH aufgrund von Linksherz- oder Lungenerkrankungen (Tabelle 3.1; Simonneau *et al.* 2013).

Tabelle 3.1: Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie. ALK, *activin receptor-like kinase*; BMPR, Bone morphogenetic protein receptor; CAV, Caveolin; ENG, Endoglin; KCNK, *Potassium channel subfamily K*; SMAD, *mothers against decapentaplegic homolog*; HIV, humanes Immundefizienz-Virus (Simmoneau et al. 2013).

1 Pulmonale Arterielle Hypertonie

- 1.1 Idiopathische Pulmonale Arterielle Hypertonie (IPAH)
- 1.2 Hereditäre Pulmonale Arterielle Hypertonie (HPAH)
 - 1.2.1 BMPR2-Fehlfunktion
 - 1.2.2 ALK-1-, ENG-, SMAD9-, CAV-1-, KCNK-3-Fehlfunktion
 - 1.2.3 unbekannt
- 1.3 Arzneimittel- und Toxininduziert
- 1.4 Assoziierte Pulmonale Arterielle Hypertonie (APAH), assoziiert mit:
 - 1.4.1 Bindegewebserkrankungen
 - 1.4.2 HIV-Infektion
 - 1.4.3 Portale Hypertonie
 - 1.4.4 kogenitale Herzerkrankung
 - 1.4.5 Schistosomiasis
- 1' Pulmonale venookklusive Verkrankung und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose
- 1'' Persistierende Pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPNH)

2 Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen

- 2.1 Systolische Dysfunktion
- 2.2 Diastolische Dysfunktion
- 2.3 Herzklappenerkrankungen

3 Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie

- 3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
- 3.2 Interstitielle Lungenerkrankung
- 3.3 andere restriktiv und obstruktiv gemischte pulmonale Erkrankungen
- 3.4 Schlafapnoe Syndrom
- 3.5 Alveoläre Hyperventilation
- 3.6 Chronische Höhenkrankheit
- 3.7 Anlagebedingte Fehlbildungen

4 Chronisch Thromboembolische Pulmonale Hypertonie

5 Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen

- 5.1 Hämatologische Erkrankungen: Chronisch hämatolytische Anämie, Myelo-proliferative Erkrankungen
- 5.2 Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, Pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose, Neurofibromatose, Vaskulitis, Lymphangiomeiomyomatose
- 5.3 Metabolische Erkrankungen: Schilddrüsenerkrankungen, Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher
- 5.4 Andere: Obstruktion durch Tumore, chronisches Nierenversagen, fibrosierende Mediastinitis

Im Rahmen dieser Arbeit soll insbesondere auf die Pulmonale Arterielle Hypertonie (PAH) fokussiert werden, die die Idiopathische PAH (IPAH), eine Form unbekannter Genese, die genetisch-assoziierte Hereditäre PAH (HPAH) und die Assoziierte PAH (APAH) umfasst, die im Zusammenhang mit anderen Grunderkrankungen unterschiedlicher Ätiologie steht. Weiterhin umfasst die PAH solche Formen, die mit venöser oder kapillärer Beteiligung einhergehen. Die PAH ist definiert als eine Zunahme des mPAP $\geq$ 25 mmHg sowie einem PVR $\geq$ 3 Wood Units bei unverändertem pulmonal-arteriellen Verschlussdruck (PAWP; Wu, Hoeper *et al.* 2013). Neben der Einteilung der PAH gemäß der Ursachen und der klinischen Analogie wird die Erkrankung weiterhin entsprechend des funktionellen Schweregrades des Krankheitsverlaufes unterteilt. Diese Einteilung wurde gemäß der *World Health Organization* erstellt. WHO Klasse I umfasst Patienten mit einer Pulmonalen Hypertonie, die keine körperlichen Beeinträchtigungen aufweisen. WHO Klasse II schließt solche Patienten ein, die bei körperlicher Belastung leicht eingeschränkt sind, in Ruhe aber keine Beschwerden aufzeigen, während die Patienten, die der WHO Klasse III angehören, schon bei leichter körperlicher Aktivität deutliche Einschränkungen wie vermehrte Dyspnoe oder Fatigue, thorakale Schmerzen oder Präsynkopen zeigen. Die WHO Klasse IV ist mit den stärksten körperlichen Beeinträchtigungen verbunden, die bereits in Ruhe auftreten und schon bei geringer körperlicher Belastung verstärkt werden. Diese Patienten zeigen häufig Anzeichen einer manifesten Rechtsherzinsuffizienz (Barst *et al.* 2004).

3.1.2 Epidemiologie

Die PAH gehört zu den seltenen Erkrankungen, die weniger als fünf von 10.000 Menschen betreffen. Nationale Register aus Frankreich, Großbritannien und den USA erlauben die Schätzung einer Prävalenz in der erwachsenen Bevölkerung von fünfzehn bis sechzig Fällen pro eine Million Einwohner, die kumulative Inzidenz liegt jährlich bei 0,001-0,01% (Peacock *et al.* 2007). Laut Daten des internationalen Registers für Patienten mit Lungenhochdruck konnte die PAH-Prävalenz in Deutschland 2014 bei 38 Fällen pro eine Million Bürger eingeordnet

werden (Hoepfer *et al.* 2016). Die Erhebung der Geschlechterverteilung ergab eine Prävalenz von 2-4:1, bei der der Anteil erkrankter Frauen im Vergleich zu Männern überwog (Humbert *et al.* 2006; Badesch *et al.* 2010).

3.1.3 Diagnostik und Therapie

Aufgrund der uncharakteristischen Symptomatik ist die frühzeitige Diagnose einer PAH häufig erschwert, sodass eine zielgerichtete Therapie oft erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung erfolgt. Als erstes Frühsymptom tritt meistens eine Dyspnoe auf, weitere Symptome sind Schwächeanfälle, Fatigue, Ödeme, Synkopen sowie thorakale Schmerzen (Rich und Brundage 1987; Barst *et al.* 2004). Eine Diagnostik, dessen Ziel es ist, eine PAH auszuschließen beziehungsweise assoziierte Erkrankungen zu erfassen, ist sowohl mithilfe von nicht-invasiven als auch mit invasiven Verfahren möglich (Gaine und Rubin 1998). Richtungsweisend kann neben einer gründlichen Anamnese die Durchführung einer transthorakalen Echokardiographie sein, da eine Hypertrophie des rechten Ventrikels, welche mit einer rechtsatrialen Dilatation sowie einer eingeschränkten Funktion des rechten Ventrikels und einer Trikuspidalklappeninsuffizienz einhergeht, erste Hinweise auf das Vorliegen einer PAH geben kann. Weiterhin werden bei belastungsinduzierten Beschwerden im Rahmen einer Basisdiagnostik Lungenfunktionstests, Röntgenaufnahmen, Blutgasanalysen oder elektrokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Belastungstests, wie beispielsweise der 6-Minuten-Gehtest (6-MWT) oder eine Spiroergometrie werden bei einem begründeten Verdacht auf das Vorliegen einer PAH eingesetzt, um die pulmonale Belastungskapazität der Patienten zu überprüfen. Zusätzliche Methoden zur Diagnostik einer PAH umfassen eine Ventilations-Perfusions-Szintigraphie, Lungen-Computertomographie und, um die Befunde eindeutig zu sichern, eine Rechtsherzkatheteruntersuchung, die als Goldstandard in der Diagnostik der PAH gilt. Die Durchführung dieser invasiven Methode erlaubt unter anderem die Erfassung des systolischen, diastolischen und des mittleren pulmonalarteriellen Drucks, des PAWP, des PVR sowie des Herzzeitvolumens (HZV, Chemla *et al.* 2002). Patienten, die an einer PAH erkrankt sind, zeigen häufig abnormal hohe rechtsatriale und pulmonalarterielle Drücke sowie ein reduziertes HZV. Erkrankte Personen weisen außerdem einen $PVR \geq 3$ WU bei unverändertem $PAWP \leq 15$ mmHg auf.

Aufgrund einer Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit behandelter Patienten von nur 65% rückte das Bestreben, neue Möglichkeiten der Pharmakotherapie zu etablieren, in den letzten Jahren in den wissenschaftlichen Vordergrund (Benza *et al.* 2012). Die Pathogenese der PAH ist multifaktoriell bedingt, bei der neben genetischen Prädispositionen auch Dysfunktionen bestimmter zellulärer Signalwege diskutiert werden. Insbesondere Endothelin-1-, Stickstoffmonoxid (NO)- und Prostazyklin (PGI_2)-vermittelte Signalwege sollen in diesem

Zusammenhang involviert sein und dienen als Grundlage aktueller zugelassener Therapiemöglichkeiten. In mehreren Studien konnte bisher gezeigt werden, dass verfügbare Therapien zwar keine kurative Wirkung zeigen, aber Verbesserungen der Symptomatik, eine stärker ausgeprägte Leistungsfähigkeit der Patienten sowie eine Herauszögerung der klinischen Verschlechterung herbeiführen (Channick *et al.* 2001; Blumberg *et al.* 2002; Rubin *et al.* 2002). Derzeit stehen zur gezielten Therapie der PAH vier unterschiedliche Arzneistoffklassen zur Verfügung, die je nach Schweregrad der Erkrankung allein oder in Kombination eingesetzt werden können: Die Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ERA), die Phosphodiesterase (PDE)-5-Inhibitoren, der 2014 zugelassene Stimulator der löslichen Guanylylcyclase (sGC) Riociguat sowie PGI₂-Derivate. Zu den ERA gehören Bosentan, Macitentan und Ambrisentan, welche durch Blockade des Rezeptors die vasokonstriktorische Wirkung von Endothelin reduzieren. Studien konnten eine Verbesserung der Hämodynamik und Belastungskapazität sowie eine Verlängerung der Zeit bis zur klinischen Verschlechterung zeigen (Channick *et al.* 2001; Rubin und Roux 2002). Die PDE-5-Inhibitoren Sildenafil und Tadalafil hemmen die PDE-5, welche am Abbau vom zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) beteiligt ist. Durch eine gesteigerte Bioverfügbarkeit des cGMP, welches als *second messenger* des NO dient, kann dessen vasodilativer Effekt erhöht werden. cGMP aktiviert die Proteinkinase G, die durch Regulation des intrazellulären Calciumspiegels eine Gefäßerweiterung bewirkt. Studien haben gezeigt, dass eine Therapie mit PDE-5-Inhibitoren die pulmonale Leistungsfähigkeit verbessert und den mPAP senkt (Ghofrani *et al.* 2004; Sastry *et al.* 2004). Riociguat ist ein Arzneistoff, der die sGC stimuliert und so die Bildung von cGMP induziert. Erste Langzeitstudien zeigen, dass mit Riociguat behandelte Patienten eine verbesserte pulmonale Leistungsfähigkeit, einen reduzierten pulmonalen Gefäßwiderstand sowie eine Zeitverlängerung bis zur klinischen Verschlechterung aufweisen (Ghofrani *et al.* 2013; Halank *et al.* 2017). Zu der Klasse der PGI₂-Derivate gehören die Wirkstoffe Epoprostenol, Iloprost und Treprostenil, welche durch Interaktion mit ihrem Rezeptor eine gesteigerte cAMP-Produktion und damit eine Dilatation der pulmonalen Gefäße hervorrufen, sowie Selexipag, einen Agonisten des Prostazyklin-Rezeptors. Durch eine PGI₂-Behandlung konnte bei PAH-Patienten die Hämodynamik und die Belastungsfähigkeit verbessert und der PVR reduziert werden (Rubin *et al.* 1990; McLaughlin *et al.* 1998). Diese unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten zielen vor allem auf eine Verbesserung der Vasoreaktivität und der Lebensqualität sowie die Herauszögerung klinischer Verschlechterungen. Abgesehen von der medikamentösen Therapie sind körperliches Training, Nikotinverzicht und die Normalisierung eines Übergewichtes als unterstützende Maßnahme unabdingbar (Mereles *et al.* 2006).

3.1.4 Pathogenese der PAH

Die Pathogenese der PAH ist komplex und multifaktoriell bedingt, die genauen Pathomechanismen, die zur Ausbildung einer PAH führen, konnten bis heute noch nicht ausreichend identifiziert werden. Die Elevation des mPAP sowie des PVR sind pathophysiologisch auf chronisch-proliferative Umbauprozesse (*Remodeling*) der Gefäßwände von Arteriolen und Kapillaren zurückzuführen (Humbert *et al.* 2004; Pietra *et al.* 2004). Weiterhin spielen inflammatorische und thrombotische Prozesse sowie eine endotheliale Dysfunktion eine übergeordnete Rolle. Als prädisponierende Faktoren werden außerdem Mutationen in der Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren β (TGF- β) diskutiert. Insbesondere Veränderungen des *Bone morphologic protein receptor type II* (BMPR2), der *activin receptor-like kinase type1* (ALK-1) sowie Mutationen von *Mothers against decapentaplegic homolog* (SMAD) und Endoglin sollen als mögliche Ursachen einer PAH-Entstehung eine Rolle spielen (Newman *et al.* 2004).

3.1.4.1 Proliferation und vaskuläres Remodeling

Durch die Proliferation und Migration von Endothel- sowie glatten Muskelzellen, inflammatorischen Zellen und Fibroblasten kommt es zu strukturellen Veränderungen im Aufbau der Gefäßwand. Die Arteriolen zeigen als Folge einer Imbalance proliferativer und anti-proliferativer Stoffe eine Intimafibrose, eine Hypertrophie der Media und eine Hyperplasie der Adventitia sowie eine *de novo* Muskularisierung, die eine Muskularisierung ursprünglich nicht oder nur partiell muskularisierter kleiner Gefäße beschreibt (Olschewski *et al.* 2001). Diese Veränderungen gehen einher mit einer Verminderung der Gefäßelastizität, einer anhaltenden Vasokonstriktion sowie einem Verlust kleiner pulmonaler Gefäße (Rarefizierung) und führen im weiteren Krankheitsverlauf zu einer progredienten Obstruktion und Obliteration der pulmonalen Gefäße sowie zu plexiformen Gefäßläsionen. Resultierend steigt der PVR und der mPAP, gefolgt von einer Erhöhung der Nachlast des rechten Herzens (Gaine und Rubin 1998). Dies kann über eine rechtskardiale Hypertrophie in der Ausbildung eines *Cor pulmonale* resultieren, was mit einer erhöhten Mortalität der Patienten assoziiert wird.

Gleichzeitig konnte bei betroffenen Patienten ein Ungleichgewicht vasoaktiver Stoffe zugunsten von Vasokonstriktoren wie Endothelin-1, Serotonin oder Thromboxan-A₂ festgestellt werden (Christman *et al.* 1992). Bei erkrankten Personen wurde weiterhin eine reduzierte endogene Bioverfügbarkeit von vasodilatativen Stoffen wie NO und PGI₂ als mögliche Ursache der Pathogenese identifiziert. Giaid und Kollegen konnten zeigen, dass die Expression der endothelialen NO-Synthase (NOS3), welche NO aus der Aminosäure L-Arginin bildet, bei gleichzeitig verstärktem endogenen NO-Abbau bei PAH-Patienten vermindert ist (Giaid und Saleh 1995; Xu *et al.* 2004).

Durch die reduzierte NO-Bioverfügbarkeit sowie durch plexiforme Läsionen im Gefäßendothel resultiert eine endotheliale Dysfunktion, die thrombotische Prozesse durch eine gesteigerte Produktion proliferativer Faktoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) verstärkt (Tuder *et al.* 2001).

3.1.4.2 Inflammatorische Prozesse

In Lungen von PAH-Patienten wurde neben proliferativen Veränderungen der Gefäßwände auch ein gesteigertes Auftreten von entzündlichen Infiltraten nachgewiesen, bestehend aus mononukleären Zellen wie Makrophagen und T-Zellen (Cool *et al.* 1997; Gerasimovskaya *et al.* 2012). Weiterhin wurde ein vermehrtes Auftreten von peri- und intravaskulären Inflammationen festgestellt, manifestiert durch eine erhöhte Konzentrationen von zirkulierenden Chemokinen und Zytokinen wie Interleukin (IL-) 1 β , IL-6, IL-8, CC-Chemokinligand (CCL) 2 und 5 und dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α). Ein Zusammenhang zwischen dem gesteigerten Vorkommen inflammatorischer Prozesse und einem reduzierten Gefäßlumen sowie einem gesteigerten mPAP konnte bereits von Stacher und Kollegen hergestellt werden (Stacher *et al.* 2012). Eine hohe IL-1 β - sowie TNF- α -Konzentration korreliert beispielsweise mit einer Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine wie Fibronektin, die in veränderten Gefäßen im Zusammenhang mit einer PAH auftreten und proliferative Prozesse beschleunigen (Molossi *et al.* 1995).

Eine übergeordnete Rolle spielen in diesem Zusammenhang Monozyten, die aus hämatopoietischen Vorläuferzellen des Knochenmarks gebildet werden und als Promonozyten in die Zirkulation gelangen, wo sie zu Monozyten differenziert werden (Lewis und Pollard 2006). Durch Chemokine wie CCL2 wird die Infiltration von Monozyten ins Gewebe begünstigt, in welchem, als Antwort auf unterschiedliche Signale, eine Differenzierung zu Makrophagen stattfindet. Man unterscheidet zwischen den klassisch aktivierten M1-Makrophagen und den alternativ aktivierten M2-Makrophagen (Mantovani *et al.* 2007). Ein Zusammenspiel mit Interferon gamma oder Lipopolysacchariden resultiert über eine Anregung von Typ-1-T-Helferzellen (TH₁-Zellen) in einer Polarisierung zu proinflammatorischen Makrophagen des M1-Subtyps (Martinez *et al.* 2008). M1-Makrophagen zeigen eine gesteigerte Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-10 und TNF- α . TH₂-Zellen regen die Makrophagen zur Polarisierung in den M2-Subtyp an, der proangiogene und fibrotische Eigenschaften zeigt (Gordon und Martinez 2010). Eine Stimulation mit IL-4 oder IL-13 resultiert in einer M2-Polarisation des M2a-Subtyps, der weiterhin regulatorische und homöostatische Funktionen besitzt (Migliaccio und Holian 2010). M2-Makrophagen werden durch eine hohe Synthese des IL-1-Rezeptorantagonisten, IL-10 und IL-12 und einer Sekretion von CCL22 definiert (Martinez *et al.* 2008).

3.2 L-Arginin-NO-Stoffwechselweg

3.2.1 Stickstoffmonoxid und dessen endogene Regulation

Stickstoffmonoxid, ein gasförmiges, radikalisches Molekül, wurde in den 1970er Jahren als *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) von Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad identifiziert, die für ihre die Entdeckung von NO als vasodilatives, cGMP-vermitteltes Signalmolekül 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden (Murad *et al.* 1979; Furchgott und Zawadzki 1980; Ignarro *et al.* 1987; Palmer *et al.* 1987). Furchgott *et al.* konnten zeigen, dass Acetylcholin über die Stimulation von EDRF eine endothelabhängige Relaxation glatter Muskelzellen hervorruft, die über eine gesteigerte NO-Synthese die cGMP-Bildung stimulieren (Murad *et al.* 1979; Furchgott und Zawadzki 1980; Furchgott 1983). 1987 konnten Ignarro und Palmer EDRF als Stickstoffmonoxid identifizieren (Ignarro *et al.* 1987; Palmer *et al.* 1987), welches 1992 von der Zeitschrift „Science“ zum Molekül des Jahres gewählt wurde.

NO wird über ein Enzym aus der Klasse der Oxidoreduktasen aus der Aminosäure L-Arginin gebildet, welches 1989 als NO-Synthase (NOS) charakterisiert wurde (Palmer *et al.* 1988; Moncada *et al.* 1989). Die NOS katalysiert in Gegenwart von Sauerstoff die Oxidation des Guanidinostickstoffs der Aminosäure L-Arginin über das Intermediat N^ω-Hydroxy-L-Arginin (NOHA) unter Abspaltung von L-Citrullin und Wasser mithilfe der Kofaktoren Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin, Flavin-Adenin-Dinukleotid, Flavin-Mononukleotid und Calmodulin (Abbildung 3.1; Stuehr 1997).

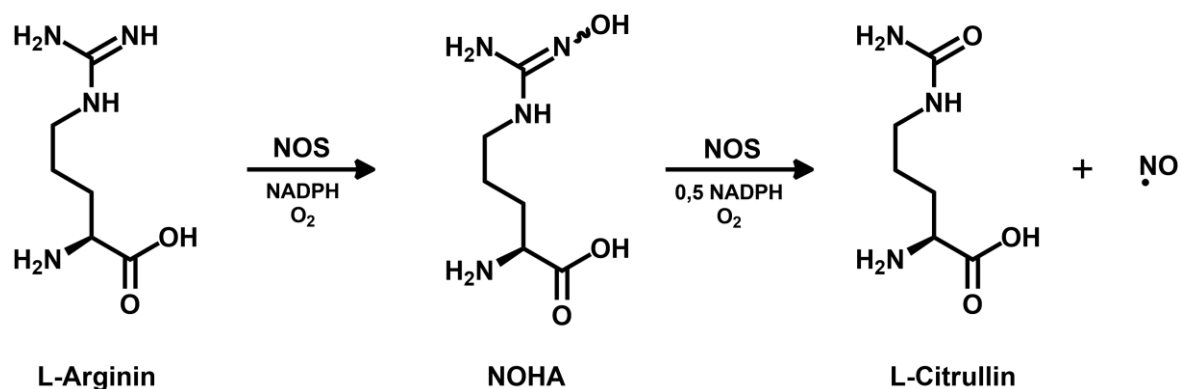


Abbildung 3.1: Katalyse der NO-Synthasen. Umsetzung der Aminosäure L-Arginin über das Intermediat NOHA zu Stickstoffmonoxid (NO) und L-Citrullin durch Katalyse der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS). NADPH, Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; NOHA, N^ω-Hydroxy-L-Arginin; O₂, Sauerstoff.

Bisher konnten drei Isoformen dieses Enzyms charakterisiert werden, die sich in ihren Expressionsmustern und ihrer Lokalisation unterscheiden. Die Isoformen werden von unterschiedlichen Genen kodiert und weisen eine Sequenzhomologie von 51-57% auf (Alderton *et al.* 2001). Bei der endothelialen NOS (NOS3), ursprünglich in Endothelzellen nachgewiesen, und der neuronalen NOS (NOS1), welche zunächst im Zentralnervensystem isoliert wurde, handelt es sich um konstitutiv aktive, Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängige Isoformen, während die Expression der induzierbaren NOS (NOS2) in Makrophagen Ca^{2+} -unabhängig durch Endotoxine und proinflammatorische Zytokine stimuliert wird (Lechner *et al.* 2005). Im Lungenepithel und im Dünndarm, aber auch in fetalen Gewebeformen, konnte außerdem eine konstitutiv aktive Form der NOS2 identifiziert werden (Kobzik *et al.* 1993). Die Existenz der erythrozytären und mitochondrialen NOS wird noch diskutiert (Deliconstantinos *et al.* 1995; Ghafourifar und Richter 1997). Im Rahmen dieser Arbeit soll vor allem auf die endotheliale NO-Synthase fokussiert werden, die neben den Endothelzellen auch in Thrombozyten exprimiert wird und dort Ca^{2+} -abhängig die NO-Synthese katalysiert (Radomski *et al.* 1990). Das gebildete NO diffundiert in die glatten Muskelzellen und stimuliert die sGC, welche die Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) zum *second messenger* cGMP unter Abspaltung eines Phosphatrestes katalysiert. cGMP aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen, die über eine Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Relaxation der Gefäßmuskulatur und zur Aufrechterhaltung des Gefäßtonus führt (Arnold *et al.* 1977; Katsuki und Murad 1977). Neben den vasodilatativen Eigenschaften konnte gezeigt werden, dass NO die Thrombozytenaktivierung und -aggregation (Radomski *et al.* 1987), die Monozytenadhäsion (Kubes *et al.* 1991), die Oxidation von *low-density* Lipoproteinen (Tsao *et al.* 1994) und die Proliferation glatter Muskelzellen (Moncada und Higgs 2006) inhibiert. Aufgrund der vasoprotektiven und antiarteriogenen Eigenschaften spielt NO eine entscheidende Rolle in der Erhaltung der Gefäßhomöostase.

3.2.2 Methylarginine

Eine pulmonal-endotheliale Dysfunktion mit konsekutiver Vasokonstriktion wird unter anderem durch eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit bei gleichzeitig vermehrter Freisetzung vasokonstriktiver und proliferativer Stoffe manifestiert, die auf unterschiedliche Pathomechanismen zurückzuführen sind (Christman *et al.* 1992). In diesem Zusammenhang spielen die endogenen Dimethylarginine, die als NOS-Inhibitoren in die NO-Synthese eingreifen, eine mögliche Rolle. Das $\omega\text{-N}^G\text{,N}^G$ -Dimethylarginin, bekannt als Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), und das als Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) bezeichnete $\omega\text{-N}^G\text{,N}^{G'}$ -Dimethylarginin, Derivate der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin, konnten bereits in den 1970er Jahren im humanen Urin nachgewiesen werden (Abbildung 3.2; Kakimoto und Akazawa 1970; Nakajima *et al.* 1971). Die Arginin-Metabolite ADMA, SDMA und

L- ω -N^G-Monomethylarginin (L-NMMA; Abbildung 3.2) werden durch posttranslationale Modifikation von Argininresten in Proteinen gebildet. Die Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) katalysieren die Methylierung zweier Argininreste durch Transferierung des Methylrestes von S-Adenosyl-L-Methionin auf den terminalen Guanidinstickstoff des L-Arginins. Es sind neun Isoformen der PRMT bekannt, die sich in zwei Untergruppen einteilen lassen (Zakrzewicz und Eickelberg 2009): Die PRMT Typ I dient der Katalyse der Mono- und Dimethylierung am selben Stickstoffatom und ist somit an der Synthese von ADMA und L-NMMA beteiligt, während SDMA über die PRMT Typ II gebildet wird, die die Methylierung unterschiedlicher, terminaler Guanidin-Stickstoffe katalysiert (Rajpurohit *et al.* 1992; Bedford und Richard 2005). Durch Hydrolyse werden die Dimethylarginine ADMA, SDMA und L-NMMA freigesetzt und mittels kationischem Aminosäuretransporter (CAT) aus der Zelle ausgeschleust. Zur Wiederaufnahme in die Zelle dient ebenfalls das transmembranäre Transportsystem CAT (Bogle *et al.* 1995).

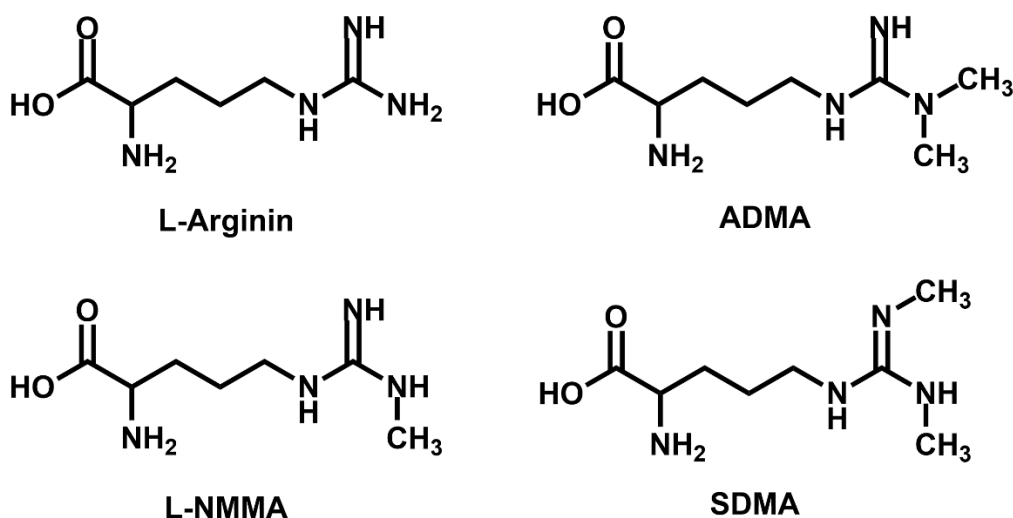


Abbildung 3.2: Chemische Strukturen der Aminosäure L-Arginin sowie der Metabolite Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) und L- ω -N^G-Monomethylarginin (L-NMMA).

Die Methylarginine ADMA und L-NMMA spielen in der Pathogenese der PAH eine Rolle, da sie die NO-Bioverfügbarkeit durch reversible, kompetitive Hemmung der NOS-Enzyme beeinflussen, wobei ADMA, verglichen mit L-NMMA, eine etwa zehnfach stärkere inhibitorische Potenz und auch höhere Plasmaspiegel im Menschen zeigt (Rees *et al.* 1990; Vallance *et al.* 1992). Weiterhin konkurrieren die L-Arginin-Analoga mit den Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin um den kationischen Aminosäuretransporter CAT, sodass hohe Konzentrationen der Methylarginine zu einer reduzierten Verfügbarkeit des NOS-Substrates L-Arginin führen (Closs *et al.* 1997). Die verminderte NO-Bioverfügbarkeit

resultiert über eine reduzierte Aktivierung der sGC in einer eingeschränkten Relaxation glatter Muskelzellen.

Eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit kann weiterhin mit erhöhten Konzentrationen der L-Arginin-Metabolite assoziiert sein. Es konnten bereits Zusammenhänge zwischen erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen und kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt werden (Goonasekera *et al.* 1997; Usui *et al.* 1998; Miyazaki *et al.* 1999). ADMA stellt somit einen Prädiktor für die Risikobewertung und Gesamtmortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen dar und spielt eine übergeordnete Rolle in der Regulation des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges (Valkonen *et al.* 2001). Außerdem konnten Gorenflo und Kielstein eine Assoziation zwischen erhöhten ADMA-Werten im Plasma und einem hohen mPAP sowie einer reduzierten Überlebensdauer bei PAH-Patienten herstellen (Gorenflo *et al.* 2001; Kielstein *et al.* 2005).

3.2.3 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolasen

Hinweise auf eine renale Elimination der Dimethylarginine fanden erstmals Vallance und seine Mitarbeiter, indem sie bei niereninsuffizienten Patienten, verglichen mit einer gesunden Kontrollkohorte, erhöhte Plasmakonzentrationen von ADMA und SDMA nachwiesen (Vallance *et al.* 1992). Eine im Vergleich zum ADMA erhöhte SDMA-Ausscheidung im Tierversuch machte auf einen weiteren Abbaumetabolismus von ADMA, nicht aber von SDMA, aufmerksam (McDermott 1976). Schließlich konnte 1987 das ADMA-degradierende Enzym N^G,N^G-Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) in der Rattenniere identifiziert werden, welches eine wichtige Rolle im Metabolismus der Methylarginine spielt (Ogawa *et al.* 1987; Ogawa *et al.* 1990; Kimoto *et al.* 1993). Während SDMA zum größten Teil über die Niere eliminiert wird, spaltet die DDAH sowohl ADMA als auch L-NMMA enzymatisch durch eine hydrolytische Reaktion zu L-Citrullin und den entsprechenden Mono-/Dimethylaminen (Abbildung 3.3).

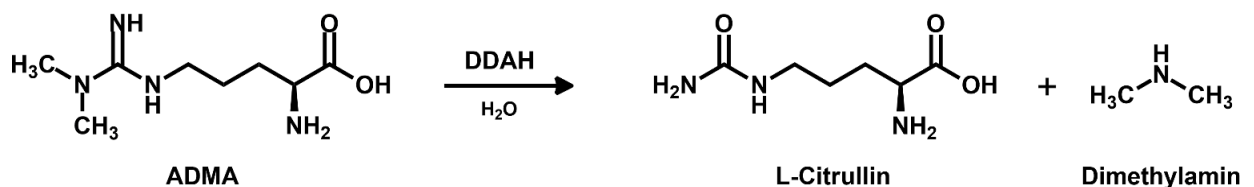


Abbildung 3.3: Enzymatische Katalyse der N^G,N^G-Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) am Beispiel des Abbaus von ADMA zu L-Citrullin und Dimethylamin. ADMA, Asymmetrisches Dimethylarginin.

Die Entdeckung, dass der Abbau der Methylarginine oftmals nicht linear mit der Expression der DDAH im Gewebe einhergeht, führte 1999 durch Leiper und seine Mitarbeiter zu der Identifizierung einer weiteren Isoform des Enzyms, der DDAH2 (Leiper *et al.* 1999). Die Isoformen weisen bei einer Sequenzhomologie von circa 50% eine unterschiedliche Gewebeverteilung auf. Während die DDAH1 vor allem in Gehirn, Bauchspeicheldrüse, Niere und Leber isoliert werden konnte, wird die DDAH2 vorwiegend in Herz, Niere und Plazenta exprimiert. Weiterhin konnten verschiedene Studien eine Kolo-kalisation zwischen der Expression der DDAH- und NOS-Isoformen feststellen, die auf eine isoformspezifische Regulation der NO-Bioverfügbarkeit in Abhängigkeit von den Methylargininen hinweisen (Tojo *et al.* 1997; Gray *et al.* 2010). Während die DDAH1 vorwiegend in NOS1-reguliertem Gewebe wie im Gehirn und Leber isoliert wurde, konnte die DDAH2, koexprimiert mit der NOS3 und NOS2, vermehrt in Herz, Lunge und Thymus nachgewiesen werden (Tran *et al.* 2000; Palm *et al.* 2007).

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen der DDAH-Expression und den ADMA-Plasmakonzentrationen konnte durch eine Inhibition der DDAH, die in einer veränderten NO-Synthese resultierte, festgestellt werden. Der verminderte enzymatische Abbau von ADMA resultierte in erhöhten Konzentrationen des kardiovaskulären Risikofaktors und damit in einer erniedrigten NO-Bioverfügbarkeit (MacAllister *et al.* 1996). Weiterhin konnte mittels eines transgenen Mausmodells gezeigt werden, dass *Ddah1*-überexprimierende Tiere reduzierte ADMA-Plasmakonzentrationen aufweisen (Dayoub *et al.* 2003). Im Lungengewebe von PAH-Patienten beziehungsweise von pulmonal-hypertensiven Ratten konnte eine reduzierte Expression und Funktion der DDAH2 festgestellt werden (Pullamsetti *et al.* 2005).

Das Schaubild in Abbildung 3.4 zeigt eine schematische Übersicht der Regulation des NO-Metabolismus und des Zusammenspiels der beteiligten Enzyme. Die Gewebeverteilung sowie die unterschiedlichen Isoenzyme werden in dieser Übersicht nicht berücksichtigt.

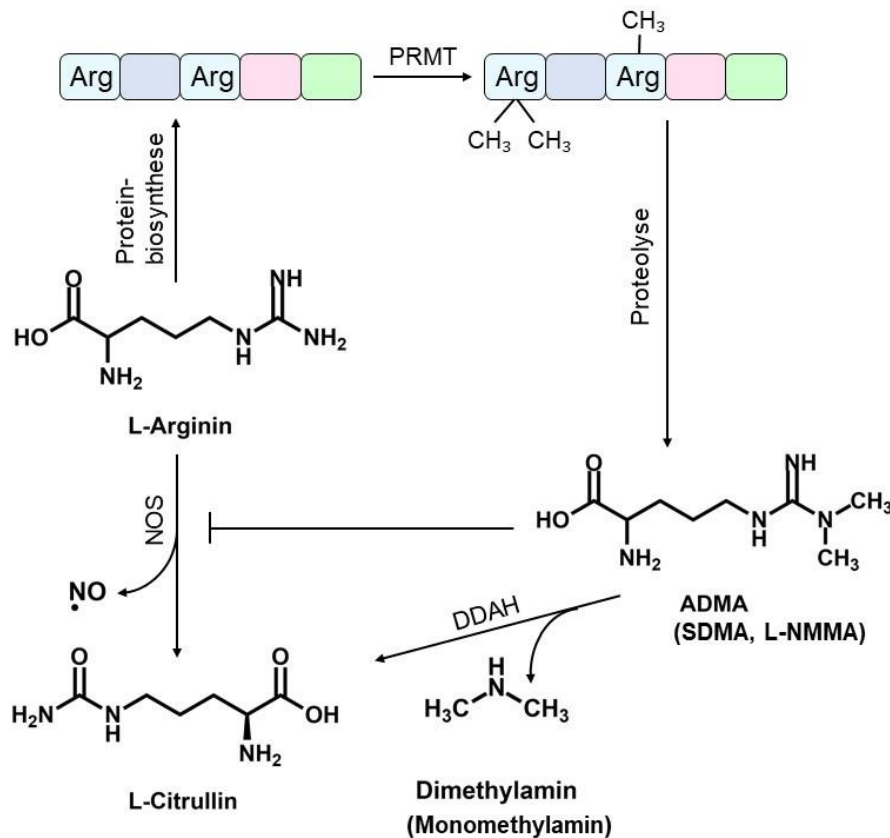


Abbildung 3.4: Vereinfachte Übersicht der Regulation des L-Arginin-NO-Metabolismus. Arg, proteingebundenes L-Arginin; ADMA, Asymmetrisches Dimethylarginin; DDAH, Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase; L-NMMA, L-ω-N^G-Monomethylarginin; NO, Stickstoffmonoxid; NOS, NO-Synthase; PRMT, Protein-Methyltransferase; SDMA, Symmetrisches Dimethylarginin.

3.2.4 Pathologische Bedeutung bei der PAH

Eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit stellt einen zentralen Pathomechanismus in der Entwicklung einer PAH dar. Schon 1999 konnten Giaid und Saleh belegen, dass Patienten, die an einer PAH erkrankt sind, eine verminderte pulmonale NOS-Expression und -Aktivität aufweisen (Giaid und Saleh 1995). Weiterhin wurden in Patienten mit einem erhöhten mPAP $\geq$ 25 mmHg im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv erhöhte ADMA-Serumspiegel nachgewiesen (Meng *et al.* 2010). Da erhöhte ADMA-Konzentrationen mit dem Schweregrad einer endothelialen Dysfunktion korrelieren, die wiederum durch ein Ungleichgewicht vasodilatativer und vasokonstriktiver Mediatoren pathologische Umbauprozesse von Intima und Media verursacht, kann auf einen Zusammenhang zwischen dem NO-Metabolismus und der Progression einer PAH geschlossen werden.

3.3 Apelin und der Apelin-Rezeptor

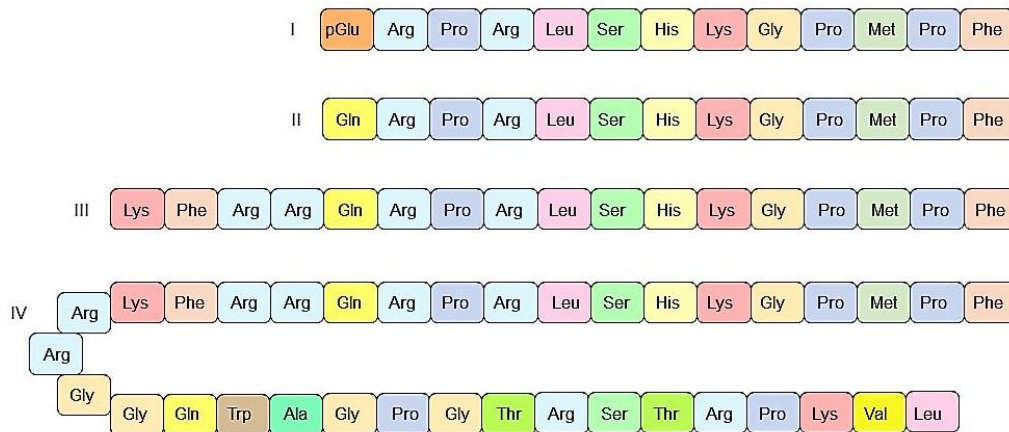
In jüngster Zeit wurde der apelinerge Signalweg, der das Adipokin Apelin und seinen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) APLNR umfasst, als wichtiger Regulator des kardiovaskulären Systems beschrieben (Chun *et al.* 2008; Pitkin *et al.* 2010). APLNR wurde zunächst von O'Dowd und Kollegen als *orphan* GPCR identifiziert, dessen Funktion und endogene Liganden zum Zeitpunkt seiner Entdeckung noch unbekannt waren (O'Dowd *et al.* 1993). Es handelt sich um einen $G_{\alpha i}$ -Protein-gekoppelten Rezeptor, der Angiotensin II, trotz einer 54% igen Homologie mit dem Angiotensin II Typ 1-Rezeptor in der hydrophoben Transmembranregion, nicht bindet (O'Dowd *et al.* 1993).

Erst als 1998 Wissenschaftler um Tatemoto und Fujino den endogenen Liganden des APLNR erstmalig aus dem Rindermagen isolieren konnten, wurde der Rezeptor deorphanisiert und seine Funktion erforscht (Tatemoto *et al.* 1998).

3.3.1 Charakterisierung und Regulation

Apelin (**APLNR endogenous ligand**) wird endogen als Vorstufe von 77 Aminosäuren (Prä-Pro-Apelin) mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert. Nach Abtrennung des Signalpeptides durch das *angiotensin-converting enzyme* (ACE) resultiert das Pro-Apelin, welches eine Sequenz von 55 Aminosäuren aufweist und C-terminal in die aktiven Formen Apelin-36, Apelin-17, Apelin-13 und das N-terminale Pyroglutamyl-Apelin-13 (Pyr¹-Apelin-13) gespalten wird, von denen Pyr¹-Apelin-13 *in vivo* die höchste biologische Aktivität und eine gesteigerte Resistenz gegenüber enzymatischer Degradation aufweist (Abbildung 3.5; Hosoya *et al.* 2000; Kawamata *et al.* 2001).

A



B

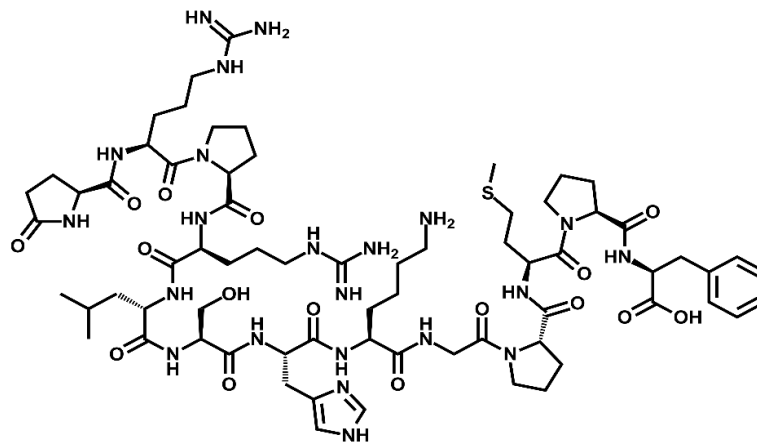


Abbildung 3.5: Darstellung von Apelin. A. Aminosäuresequenz der aktiven Formen Pyr¹-Apelin-13 (I), Apelin-13 (II), Apelin-17 (III) sowie Apelin-36 (IV). Abkürzungen der Aminosäuren, siehe Abkürzungsverzeichnis. **B.** Chemische Struktur des aktiven Metaboliten Pyr¹-Apelin-13.

Apelin und sein Rezeptor werden in verschiedenen Geweben exprimiert, wobei die höchste Expression in kardialen und pulmonalen Endothelzellen nachgewiesen wurde (Tatemoto *et al.* 2001; Medhurst *et al.* 2003; Sheikh *et al.* 2008).

Die Regulation der Apelin-Genexpression wird über unterschiedliche Effektoren vermittelt. Sowohl TNF- α als auch der *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) sollen in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen (Eyries *et al.* 2008). Weiterhin konnte bereits von Masi und Kollegen gezeigt werden, dass Apelin über Interaktion mit seinem GPCR APLNR den Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT)-Signalweg beeinflusst (Masri *et al.* 2004). Die genauen Mechanismen der Regulation sind bisher unbekannt.

3.3.2 Pathophysiologische Bedeutung

Das apelinerge System wurde bereits als wichtiger Regulator der Gefäßhomöostase beschrieben. Cheng und Kollegen konnten 2003 zeigen, dass Apelin *in vivo* als endothel- und NO-abhängiger Vasodilatator fungiert, was in einem erniedrigten arteriellen Blutdruck im Mausmodell resultierte (Cheng *et al.* 2003). An isolierten Rattenherzen wurde weiterhin ein dosisabhängiger positiv inotroper Effekt sowie ein gesteigertes HZV nachgewiesen (Szokodi 2002; Ashley *et al.* 2005). Außerdem wird ein Einfluss von Apelin auf die Gefäßelastizität diskutiert. Diese Studien suggerieren, dass das apelinerge System als potentiellles Zielmolekül in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen betrachtet werden kann (Galanth *et al.* 2012). Die Apelin-Konzentrationen im Plasma sowie die Apelin-Synthese in pulmonalen Endothelzellen von PAH-Patienten waren im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv erniedrigt (Chandra *et al.* 2011). Auch im Zellmodell konnte gezeigt werden, dass eine Apelin-Defizienz zu einer Proliferation glatter Muskelzellen führt, welche durch Apelin-Supplementation inhibiert werden konnte (Alastalo *et al.* 2011).

Weiterhin konnten Leeper und Kollegen im Rahmen eines Mausexperimentes zeigen, dass Apelin neben der Regulation der Gefäßhomöostase auch die Ausbildung von inflammatorischen Infiltraten sowie die Expression proinflammatorischer Zytokine reduziert (Leeper *et al.* 2009).

In der Literatur wird der apelinerge Signalweg aufgrund dieser protektiven Eigenschaften als potenzielles Zielmolekül für neue Ansätze in der Entwicklung von PAH-Pharmakotherapeutika betrachtet.

3.4 Hypoxie als Modell einer PAH

Eine ausreichende Sauerstoffversorgung spielt in allen höheren Lebewesen eine bedeutende Rolle, da Sauerstoff sowohl bei der Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) in den Mitochondrien als Oxidationsmittel dient als auch als Substrat an vielen weiteren enzymatischen Prozessen beteiligt ist. Ein Mangel an Sauerstoff gilt als zentraler Pathomechanismus der PAH, spielt aber bei allen Erkrankungen, die durch eine alveoläre Hypoxie bedingt sind, eine Rolle (Rabinovitch *et al.* 1979). Kommt es zu einer alveolären Hypoventilation, sinkt der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) in den Alveolen ab und es folgt eine reflektorische Vasokonstriktion, die durch den Euler-Liljestrand-Mechanismus beschrieben wird (Euler und Liljestrand 1946): In den Arealen alveolärer Hypoxie führt eine Vasokonstriktion zur Anpassung der Perfusion, sodass lediglich oxygeniertes Blut die Lunge passiert. Folglich sinkt die alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz und der pO_2 wird normalisiert. Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion kann in drei Phasen eingeteilt werden. Zunächst entsteht binnen der ersten Minuten eine akute alveoläre Hypoxie, die zu einer reversiblen, physiologischen Vasokonstriktion führt. Nach mehreren Stunden der Hypoxie-Exposition folgt eine protrahierte Hypoxie, die schließlich in einer chronischen Hypoxie resultiert, welche durch eine irreversible Ausbildung vaskulärer Umbauprozesse in den Pulmonalarterien und der Entwicklung einer PAH geprägt ist (Abbildung 3.6; Klöpping 2010).

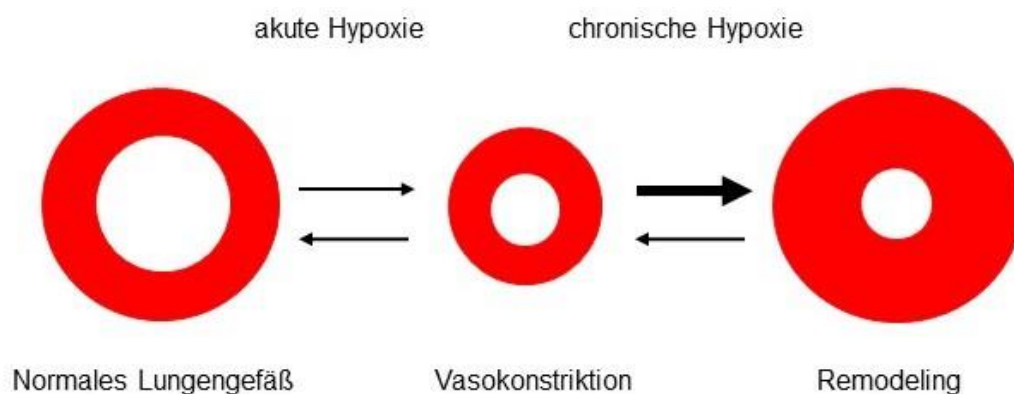


Abbildung 3.6: Vaskulärer Effekt auf eine akute alveoläre oder chronische Hypoxie. Eine akute Hypoxie resultiert in einer reversiblen physiologischen Vasokonstriktion, während eine chronische Hypoxie zu irreversiblen *Remodeling*-Prozessen führt. Modifiziert nach Klöpping (2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Hypoxie-Modell verwendet, um sowohl im Zell- als auch im Tiermodell den Phänotyp einer PAH zu induzieren. Bereits in den 1960er Jahren wurden Veränderungen in Rinderlungen festgestellt, die aufgrund der Haltung in mehreren tausend Metern Höhe einem reduzierten pO_2 in der Atemluft ausgesetzt waren (Hecht *et al.* 1962; Jensen *et al.* 1976). 1983 konnte die Arbeitsgruppe um Urbanova zeigen, dass die chronische Exposition von Hypoxie zur Entwicklung einer PH in Ratten führte (Urbanova *et al.* 1973). Die

Ausprägung des PAH-ähnlichen Phänotyps variiert jedoch im Tiermodell abhängig von der Tierart, Rasse, Alter und Geschlecht der Tiere (Ryan *et al.* 2011). Das verwendete Modell soll hämodynamische, histologische und bildgebende Merkmale des Krankheitsbildes erfüllen (Gomez-Arroyo *et al.* 2012).

3.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte insbesondere der Effekt von Apelin auf den L-Arginin-NO-Metabolismus erarbeitet werden. Zunächst galt es mithilfe eines endothelialen Zellkulturmodells zu untersuchen, ob Hypoxie die Regulation des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges beeinflusst und ob eine Apelin-Supplementation die Veränderungen beeinflussen kann.

Im Anschluss sollten die resultierenden Ergebnisse des zellkulturbasierten Modells im Tierversuch überprüft werden. Zur Etablierung des Mausmodells galt es zunächst, die Auswirkung der Hypoxie-Exposition auf die Tiere zu untersuchen. Die Etablierung des PAH-ähnlichen Phänotyps sollte als Grundlage für weitere Versuche dienen. Als weiterer Vorversuch, der der Etablierung des Modells diene, wurde die optimale Apelin-Konzentration für den Tierversuch ausgetestet. Im Anschluss sollte im Mausmodell der Einfluss von Apelin im Vergleich zu unsupplementierten Kontrolltieren unter vierwöchiger Hypoxie-Exposition überprüft werden. Zur Untersuchung der Beteiligung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges sollten neben Wildtyp-Mäusen ebenso *Ddah1*-defiziente Tiere verwendet werden. Insbesondere galt es, der Fragestellung nachzugehen, ob die Apelin-Supplementation der Hypoxie-induzierten PAH entgegenwirken kann und ob Apelin die Bioverfügbarkeit von ADMA, einem intrinsischen Inhibitor der NO-Synthese, vermindern kann.

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche sowie der Experimente im Tiermodell könnten Aufschluss über die Möglichkeit einer Apelin-Beteiligung in der Pathogenese der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie geben. Die Möglichkeit einer Apelin-Supplementation zur Therapie einer PAH galt es außerdem im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen. Weiterhin sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Apelin und dem L-Arginin-NO-Stoffwechselweg hergestellt werden. Diese Korrelation würde die positive NO-abhängige Wirkung einer Apelin-Substitution bei kardiovaskulären Erkrankungen erklären und gleichzeitig einen vielversprechenden pharmakotherapeutischen Ansatz in der PAH-Behandlung darstellen.

Um eine optimale Übertragbarkeit auf den humanen Organismus zu gewährleisten, war ein weiteres Ziel, die Ergebnisse aus Zellkultur- und Tiermodellexperimenten an humanen Proben von PAH-Patienten zu untersuchen. Dafür sollten in einem weiteren Teilprojekt M2-Makrophagen aus Patientenblut generiert werden. Anhand dieser Zellen sollte schließlich der immunmodulierende Einfluss von Apelin auf die Makrophagenfunktion analysiert werden.

4 Ergebnisse

Im Rahmen einer Kohorten-Studie, die in der II. Medizinischen Klinik, Abteilung für Pneumologie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinischen Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt wurde, wurden die Apelin-Plasmakonzentrationen von gesunden Probanden im Vergleich zu Patienten mit einer Idiopathischen Pulmonalen Arteriellen Hypertonie (IPAH) ermittelt. Es konnten reduzierte Apelin-Plasmakonzentrationen von Patienten zwischen 30 und 60 Jahren im Vergleich mit alterskorrelierenden gesunden Probanden gemessen werden (Abbildung 4.1). Aufgrunddessen sollte eine mögliche Beteiligung Apelins in der Pathogenese der PAH untersucht werden.

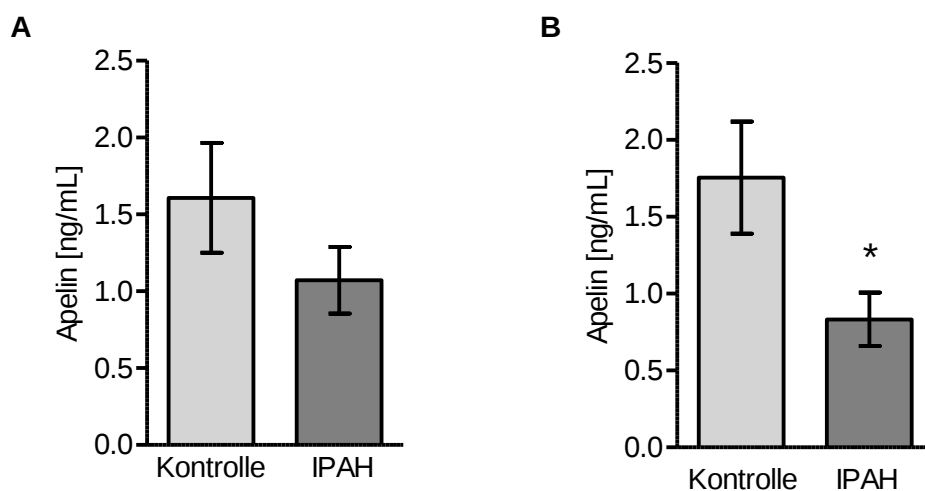


Abbildung 4.1: Apelin-Plasmakonzentrationen in Patienten mit einer Idiopathischen Pulmonalen Arteriellen Hypertonie (IPAH) im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv. A. Apelin-Plasmakonzentrationen des gesamten Patientenkollektivs (n=10) verglichen mit gesunden Probanden (n=18). **B.** Apelin-Plasmakonzentrationen von IPAH Patienten (30-60 Jahre) verglichen mit einer alterskorrelierenden gesunden Kontrollkohorte (n=9). Die Analyse erfolgte mittels Apelin-ELISA, dargestellt als MW±SEM. *p<0,05; zweiseitiger t-Test. IPAH, Idiopathische Pulmonale Arterielle Hypertonie.

4.1 Untersuchungen des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges

Dass der L-Arginin-NO-Stoffwechselweg in der Pathogenese der PAH eine entscheidende Rolle spielt, haben bereits Abman und Kollegen gezeigt (Abman *et al.* 1990). Die Arbeitsgruppe um Rabinovich konnte zeigen, dass ein PAH-ähnlicher Phänotyp durch chronische Hypoxie-Exposition induziert werden kann, die in einer gesteigerten Transkription des *hypoxia-inducible factor-1α* (HIF-1α) resultiert (Rabinovitch *et al.* 1979). HIF-1α konnte als Regulator von Apelin identifiziert werden (Glassford *et al.* 2007).

4.1.1 Untersuchungen zum Einfluss von Apelin auf den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg in Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen

Um die Assoziation zwischen Apelin und dem L-Arginin-NO-Stoffwechselweg weitergehend zu untersuchen, wurde zunächst ein endotheliales Zellkultur-Modell, basierend auf primären Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC), gewählt.

4.1.1.1 Einfluss von Hypoxie in HPMEC

Zur Erzeugung eines PAH-ähnlichen Phänotyps im Zellkulturmodell, wurden HPMEC für 24 Stunden unter sauerstoffreduzierten Bedingungen (5% O₂) kultiviert (Ahmad *et al.* 2013).

4.1.1.1.1 Regulation von Apelin und dem Apelin-Rezeptor

Um zu untersuchen, ob eine Hypoxie-Exposition von HPMEC einen Einfluss auf die Distribution von Apelin und die Expression seines G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR) APLNR besitzt, wurden die Zellen für 24 Stunden einer Hypoxie-Exposition ausgesetzt. Im Anschluss wurde die Apelin-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) analysiert und die Expression von APLNR durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt. Es konnte sowohl eine gesteigerte Apelin-Freisetzung als auch eine erhöhte APLNR Expression ermittelt werden (Abbildung 4.2).

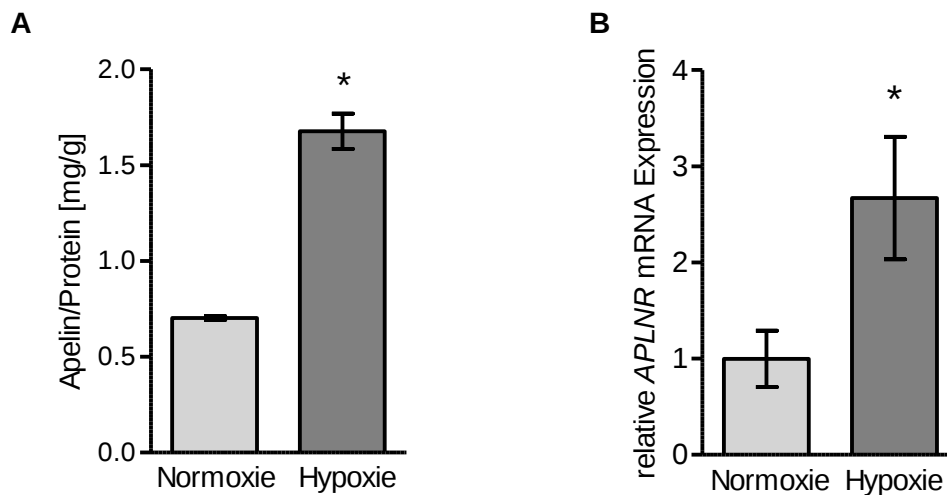


Abbildung 4.2: Apelin-Freisetzung und Expression des Apelin-Rezeptors (*APLNR*) in Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen durch Hypoxie-Exposition. **A.** Die Apelin-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* bestimmt und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. $n=4$ **B.** Die mRNA Expression des *APLNR* wurde mittels quantitativer PCR ermittelt, auf die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase relativiert und auf die *APLNR* Expression unter Normoxie kultivierter Zellen normiert. Die Daten sind als $MW \pm SEM$ dargestellt. $n=6$; $*p<0,05$; zweiseitiger t-Test.

4.1.1.1.2 Expression NO-modulierender Enzyme

Zur Untersuchung des PAH-ähnlichen Phänotyps wurde der Einfluss einer Hypoxie-Exposition auf die Zellen ermittelt, indem die Expression der NO-modulierenden Enzyme DDAH1 und DDAH2 sowie die *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA) Expression der endothelialen NO-Synthase (*NOS3*) untersucht wurde.

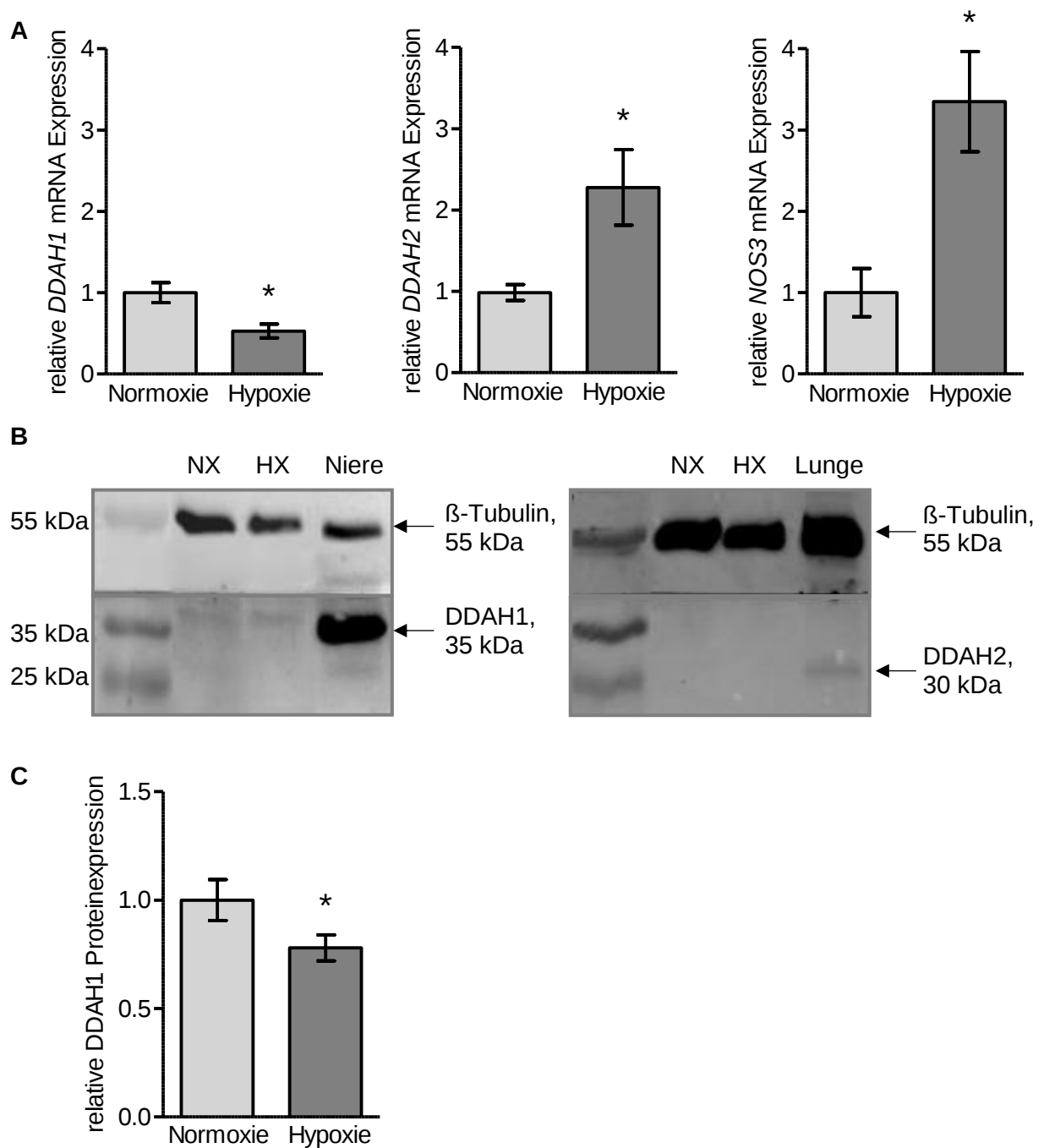


Abbildung 4.3: DDAH1 und DDAH2 Expression sowie NOS3 mRNA Expression unter Hypoxie-Exposition in HPMEC. **A.** Quantitative Analyse der Expression der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1; Normoxie (NX), n=33; Hypoxie (HX), n=21) und 2 (DDAH2; Normoxie, n=17; Hypoxie, n=11) sowie der endothelialen NO-Synthase (NOS3; Normoxie, n=13; Hypoxie, n=5) in Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC) mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion. Die Auswertung erfolgte mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode durch Relativierung auf die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Normierung auf die mRNA Expression der unter Normoxie kultivierten Zellen. **B.** Repräsentative Immunoblots zum Nachweis der DDAH1 und DDAH2. Proteinlysate der Niere (DDAH1) und Lunge (DDAH2) dienten als Positivkontrollen. **C.** Quantitative Auswertung zwei unabhängiger DDAH1-Immunoblots. Die Werte sind als $MW \pm SEM$ dargestellt und auf den Mittelwert der mRNA Expression Normoxie-behandelter Zellen relativiert. * $p < 0,05$; zweiseitiger t-Test.

Abbildung 4.3 zeigt, dass die Hypoxie-Exposition in dem gewählten Zellkulturmodell zu einer reduzierten mRNA Expression der *DDAH1*-Isoform führte, während die *DDAH2* und die *NOS3* vermehrt exprimiert wurden. Eine verminderte DDAH1 Proteinexpression unter Hypoxie-Exposition konnte ebenfalls gezeigt werden. Die DDAH2 konnte mittels Immunoblot nicht nachgewiesen werden. Ein weiterer Immunoblot ist in Abschnitt 8.1.1 dargestellt.

4.1.1.1.3 Konzentrationen der Dimethylarginine im Zellkulturüberstand von HPMEC

Um die Folge der reduzierten DDAH1 Expression durch Hypoxie-Exposition zu überprüfen, wurden die Konzentrationen der Dimethylarginine im Zellkulturüberstand der HPMEC mittels validierter Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Analyse gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Hypoxie-behandelten HPMEC im Vergleich zu den unter Normoxie kultivierten Zellen erhöhte ADMA-Konzentrationen im Überstand aufwiesen. Die SDMA-Konzentrationen blieben durch Hypoxie-Exposition unbeeinflusst (Abbildung 4.4).

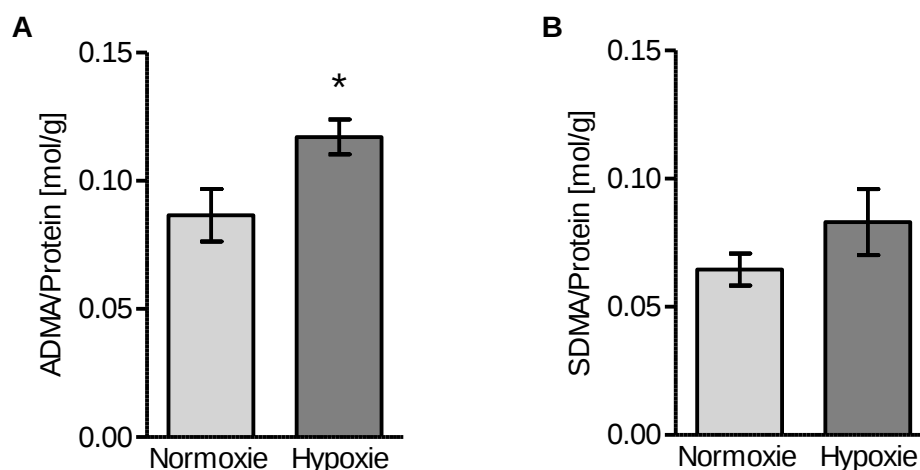


Abbildung 4.4: ADMA- und SDMA-Konzentrationen im Überstand Normoxie- und Hypoxie-behandelter HPMEC. Die Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC) wurden für 24 Stunden einer Normoxie- oder Hypoxie-Exposition ausgesetzt. **A.** Die Konzentrationen von Asymmetrischem (ADMA; Normoxie, n=13; Hypoxie, n=16) und **B.** Symmetrischem Dimethylarginin (SDMA; n=16) wurden mittels validierter LC-MS/MS-Analyse im Zellkulturüberstand bestimmt und auf die Proteinkonzentration der kultivierten Zellen normiert. Die Werte sind als $MW \pm SEM$ dargestellt. * $p < 0,05$; zweiseitiger t-Test.

4.1.1.1.4 Bestimmung der Nitrit-Konzentration im Überstand von HPMEC

Mittels fluorimetrischer Nitritbestimmung im Überstand Normoxie- und Hypoxie-exponierter HPMEC sollte indirekt die Aktivität der endothelialen NOS analysiert werden. Da NO eine geringe Halbwertszeit von nur 2-3 Sekunden in biologischen Systemen aufweist und zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) reagiert, wurde die NO_2^- -Konzentration gemessen, die sich proportional zur NO-Konzentration verhält (Anderson 1996). Eine Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen resultierte in einer gesteigerten Nitritkonzentration im Überstand der Zellen und ließ auf eine erhöhte Aktivität der NOS3 schließen (Abbildung 4.5).

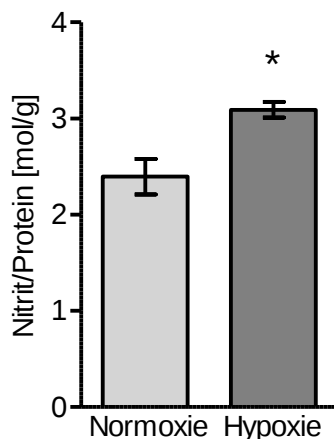


Abbildung 4.5: Nitritkonzentration im Überstand Hypoxie-exponierter HPMEC. Die Nitritkonzentration wurde im Überstand der Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC) mittels eines modifizierten Griess-Assays bestimmt und durch fluorimetrische Analyse mithilfe einer Kalibriergeraden ausgewertet. Die Werte sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ dargestellt und auf die Proteinkonzentration der Zellen bezogen. $n=3$ aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung; $*p<0,05$; zweiseitiger t-Test.

4.1.1.2 Einfluss von Apelin in Pulmonalen Endothelzellen

Um zu untersuchen, welche Wirkung eine Apelin-Behandlung auf den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg in HPMEC besitzt, wurden die Zellen unter Hypoxie-Exposition mit Apelin (10 pmol/L, 6 hrs) behandelt und die Modulation des Stoffwechselweges wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen analysiert.

4.1.1.2.1 Regulation von Apelin und dem Apelin-Rezeptor

In den Apelin-behandelten Zellen, die unter unveränderten beziehungsweise reduzierten Sauerstoffkonzentrationen kultiviert wurden, wurde zunächst die Expression des *APLNR* mittels qPCR bestimmt. Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass eine Hypoxie-Exposition die *APLNR*-Expression induziert. In Anwesenheit von Apelin konnte die Expression von *APLNR* durch Hypoxie-Behandlung nicht gesteigert werden (Abbildung 4.6).

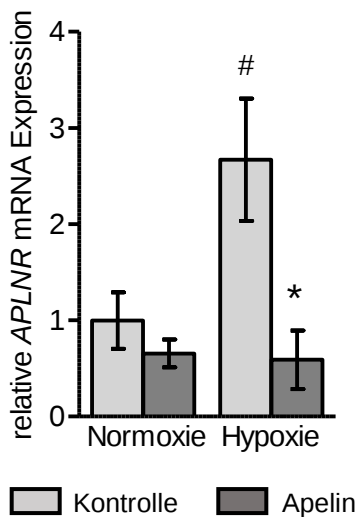


Abbildung 4.6: Veränderte Expression des Apelin-Rezeptors durch Apelin-Behandlung unter Hypoxie kultivierter HPMEC. Humane Pulmonale Mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC) wurden unter Normoxie- oder Hypoxie-Exposition kultiviert und mit Apelin behandelt (10 pmol/L, 6 hrs). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die mRNA Expression des Apelin-Rezeptors (*APLNR*) wurde mittels qPCR, relativiert auf die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, analysiert und mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet. Die Werte, normiert auf die unbehandelte Normoxie-Gruppe, sind als $MW \pm SEM$ dargestellt. $n=6$; * $p<0,05$ vs. Kontrolle; # $p<0,05$ vs. Normoxie; zweiseitiger t-Test.

4.1.1.2.2 Expression NO-modulierender Enzyme

Zur Analyse des Einflusses von Apelin auf die Expression NO-modulierender Enzyme, wurden die HPMEC für 24 Stunden unter Normoxie- beziehungsweise Hypoxie-Exposition kultiviert und dann für sechs Stunden mit Apelin behandelt. Die mRNA Expression der Enzyme *DDAH1*, *DDAH2* und *NOS3* wurde mittels qPCR bestimmt. Der regulierende Einfluss von Hypoxie auf die mRNA Expression der Enzyme konnte nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Apelin-Behandlung sowohl unter Normoxie- als auch unter Hypoxie-Exposition die Expression der *DDAH1* und *DDAH2* steigert. Einen steigernden Effekt zeigte Apelin weiterhin auf die mRNA Expression der *NOS3* unter unveränderten Sauerstoffbedingungen (Abbildung 4.7; A). Die Proteinexpression der *DDAH1* wurde durch eine Apelin-Behandlung gesteigert, während die *DDAH2* mittels Immunoblot nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.7; B, C). Ein weiterer repräsentativer *DDAH1*-Immunoblot ist in den ergänzenden Daten (Abschnitt 8.1.1) dargestellt.

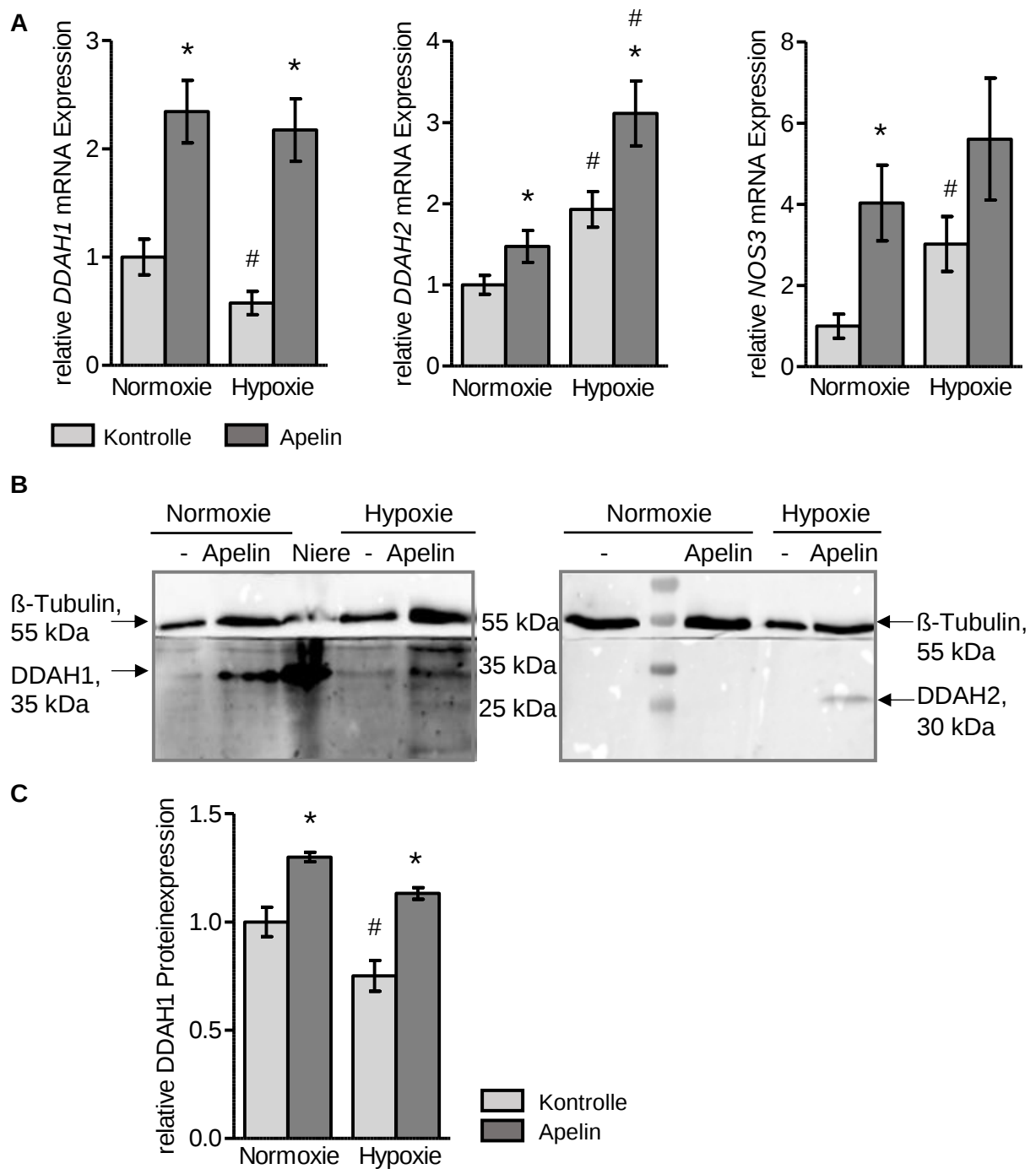


Abbildung 4.7: Veränderte Expression der NO-modulierenden Enzyme durch Apelin-Behandlung in HPMEC. Humane Pulmonale Mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC) wurden unter Normoxie- oder Hypoxie-Exposition kultiviert und mit Apelin behandelt (10 pmol/L, 6 hrs). **A.** Darstellung der mRNA Expression der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1 und 2 (DDAH1; DDAH2; n=18) und der endothelialen NO-Synthase (NOS3; Normoxie, n=8; Hypoxie, n=6). Die Analyse erfolgte mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion und $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode durch Relativierung auf die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Die als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ dargestellten Werte sind auf die unbehandelten HPMEC normiert. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. Normoxie; zweiseitiger t-Test. **B.** Immunoblot zur DDAH-Detektion. **C.** Quantitative Auswertung der Proteinexpression der DDAH1 und der Ladekontrolle β -Tubulin.

4.1.1.2.3 Konzentration der Dimethylarginine im Überstand von HPMEC

Um den Einfluss der veränderten Expression der *DDAH*-Isoformen durch eine Apelin-Behandlung auf die ADMA und SDMA-Konzentrationen im zellulären System zu untersuchen, wurden im Überstand der behandelten HPMEC die Konzentrationen der Dimethylarginine mittels LC-MS/MS-Analyse bestimmt. Eine Apelin-Behandlung der Normoxie- und Hypoxie-behandelten Zellen resultierte in reduzierten ADMA-Konzentrationen im Zellkulturüberstand, während die SDMA-Konzentrationen unverändert blieben (Abbildung 4.8).

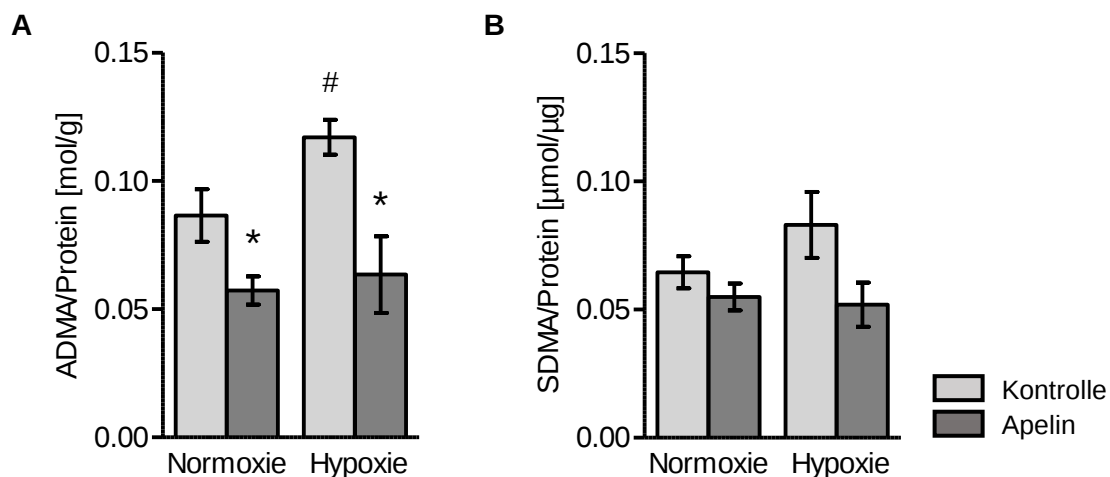


Abbildung 4.8: Konzentrationen der Dimethylarginine ADMA und SDMA im Zellkulturüberstand von HPMEC. **A.** Zu Analyse des Einflusses einer Apelin-Behandlung (10pmol/L, 6 hrs) wurden die Konzentrationen von Asymmetrischem (ADMA) und **B.** Symmetrischem Dimethylarginin (SDMA) im Überstand von Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen, kultiviert unter unveränderten und sauerstoffreduzierten Bedingungen, mittels LC-MS/MS-Analyse bestimmt. Die Konzentrationen der Dimethylarginine im Zellkulturüberstand wurden auf die Proteinkonzentrationen der kultivierten Zellen relativiert. Die graphische Darstellung basiert auf $MW \pm SEM$. $n=10$; * $p<0,05$ vs. Kontrolle; # $p<0,05$ vs. Normoxie; zweiseitiger t-Test.

4.1.1.2.4 Bestimmung der Nitritkonzentration im Überstand von HPMEC

Um zu analysieren, ob eine Behandlung mit Apelin neben der Expression NO-modulierender Enzyme auch die NO-Freisetzung reguliert, wurde die NO_3^- -Konzentration im Überstand aller Versuchsgruppen untersucht.

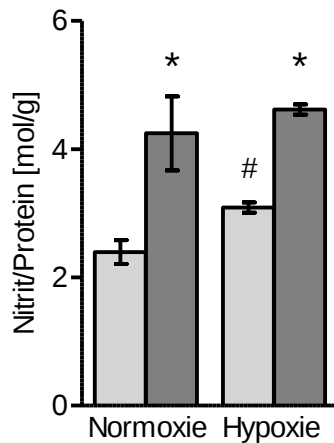


Abbildung 4.9: Einfluss von Apelin auf die Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand von unter Normoxie und Hypoxie kultivierten HPMEC. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit Apelin (10 pmol/L) behandelt. Die Analyse wurde mithilfe eines veränderten Griess-Assays durchgeführt und anhand einer Standardkurve ausgewertet. Die Werte sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ dargestellt und auf die Gesamtkonzentration der Proteine bezogen. $n=3$ aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. Normoxie; zweiseitiger t-Test.

Es konnte anhand dieser Untersuchung gezeigt werden, dass eine Behandlung von HPMEC mit Apelin in einer gesteigerten Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand resultiert (Abbildung 4.9). Diese vermehrte Nitrit-Konzentration lässt auf eine erhöhte NO-Freisetzung schließen. Um zu überprüfen, in welchem Zusammenhang diese mit den veränderten Expressionsmustern der DDAH-Isoformen steht, wurden weitere Zellen allein mit dem unspezifischen DDAH-Inhibitor Ebselen inkubiert oder nach Ebselen-Vorinkubation mit Apelin behandelt. Ebselen ist ein kleines, hydrophobes Molekül, welches neben der DDAH1 auch die Lipooxygenase, die NADPH-Oxygenase und die Proteinkinase C inhibiert (Linsky *et al.* 2011).

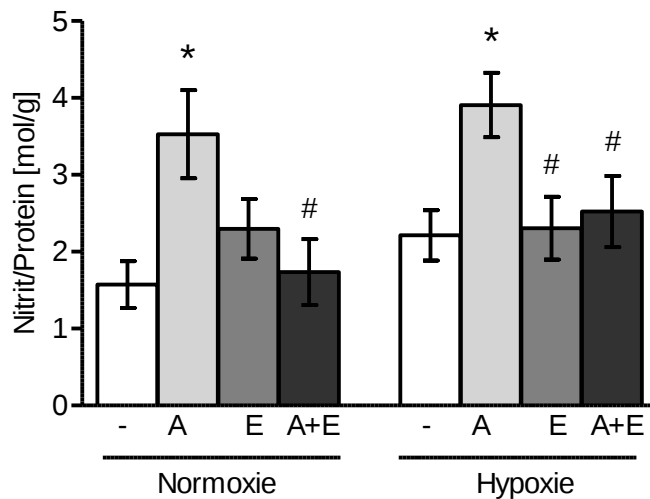


Abbildung 4.10: Einfluss einer Apelin-Behandlung von Ebselen-vorinkubierten Zellen auf die Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand von HPMEC. Die Zellen wurden mit Apelin (A, 10 pmol/L; 6 hrs), Ebselen (E, 20 μ mol/L; 6,5 hrs) oder einer Kombination aus beiden Wirkstoffen behandelt und im Vergleich zu unstimulierten Zellen (-) wurde die Nitrit-Freisetzung mittels fluorimetrischer Analyse und anschließender Auswertung mithilfe einer Standardkurve bestimmt. Die Werte sind auf die Gesamtproteinkonzentration relativiert und als $MW \pm SEM$ dargestellt. $n=7$; * $p<0,05$ vs. unstimulierte Zellen; # $p<0,05$ vs. Apelin; zweiseitiger t-Test.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Ebselen-Behandlung in einem Ausbleiben der Apelin-induzierten Steigerung der Nitrit-Freisetzung resultiert. Sowohl unter Normoxie- als auch unter Hypoxie-Exposition konnte eine Apelin-Behandlung in den Ebselen-vorinkubierten Zellen keine gesteigerte der Nitrit-Freisetzung im Zellkulturüberstand hervorrufen (Abbildung 4.10).

4.1.2 Tierexperimentelle Untersuchungen zur Analyse des Einflusses von Apelin auf den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg

Dass eine Dysregulation der *Ddah*-Enzyme im Krankheitsverlauf der PAH eine Rolle spielt, konnten bereits Millatt und Kollegen im Mausmodell zeigen (Millatt 2003). Für die Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Wildtyp-Mäuse (*Ddah1^{+/+}*) als auch global *Ddah1*-defiziente Tiere (*Ddah1^{-/-}*) verwendet, um die Auswirkung eines Mangels der *Ddah1* hinsichtlich des PAH-ähnlichen Phänotyps im Tiermodell zu untersuchen.

Mithilfe der tierexperimentellen Untersuchungen sollte zunächst der PAH-ähnliche Phänotyp mittels Hypoxie-Exposition etabliert und durch molekularbiologische Methoden untersucht werden. Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen wurde anschließend mittels osmotischer Minipumpen Apelin- oder Natriumchlorid-Lösung (NaCl) verabreicht, um den Einfluss des Wirkstoffes auf die Entwicklung des PAH-ähnlichen Phänotyps zu untersuchen. Alle Tiere wurden für vier Wochen unter sauerstoffreduzierten Bedingungen (10% O₂) gehalten.

4.1.2.1 Global *Ddah1*-defiziente Mäuse

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten *Ddah1*-defizienten Mäuse wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Yingjie Chen¹ zur Verfügung gestellt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Mäuse im Alter von acht bis neun Wochen für den Versuch verwendet und mit ihren Wildtyp-Geschwistertieren verglichen. Die transkriptionelle Defizienz der *Ddah1* wurde qualitativ mittels PCR ermittelt und die Proteinexpression wurde mittels eines Immunoblots und anschließender Antikörper-Detektion nachgewiesen. Zur quantitativen Analyse wurde die *Ddah1*-Defizienz mithilfe einer qPCR analysiert (Abbildung 4.11). Anhand der Analysen konnte gezeigt werden, dass die *Ddah1*-defizienten Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren eine stark reduzierte *Ddah1* Expression zeigen. Die Expression der *Ddah2* blieb im pulmonalen Gewebe aller Tiere unverändert.

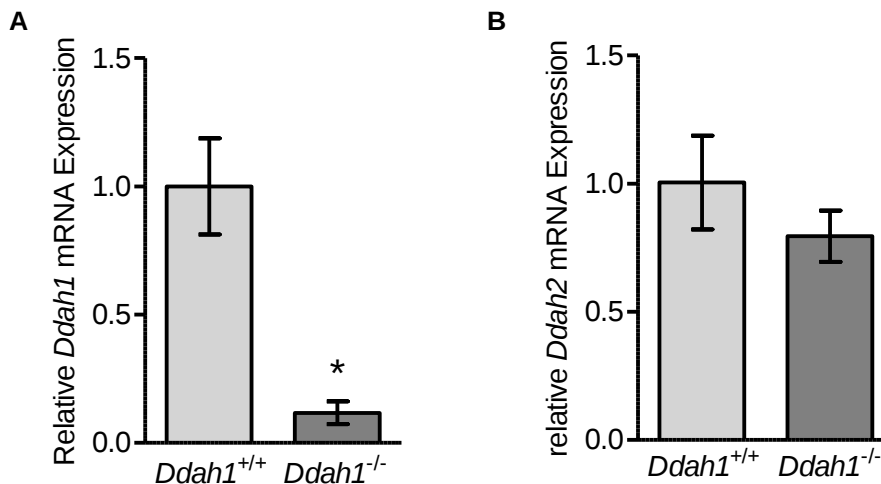


Abbildung 4.11: *Ddah1* und *Ddah2* mRNA Expression im pulmonalen Gewebe von Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen. A. Die quantitative Analyse der *Ddah1* und B. *Ddah2* Expression wurde auf transkriptioneller Ebene mittels qPCR durchgeführt und durch Relativierung auf das Ribosomale Protein L13A anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet. Die Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt und auf den Mittelwert der *Ddah*-Expression der Wildtyp-Tiere normiert. n=8-12; *p<0,05; zweiseitiger t-Test.

¹ Prof. Yingjie Chen, Division of Cardiology, University of Minnesota, Minneapolis, USA

Zur weiteren Charakterisierung der Mäuse wurde die mRNA Expression der *Ddah1*, *Ddah2* und des Apelin-Rezeptors *Aplnr* in unterschiedlichen Gewebearten untersucht (Abbildung 4.12). Die Analysen zeigten die höchste mRNA Expression der *Ddah1* in der Niere, während die *Ddah2* und der *Aplnr* die höchste Expression in der Lunge aufwiesen.

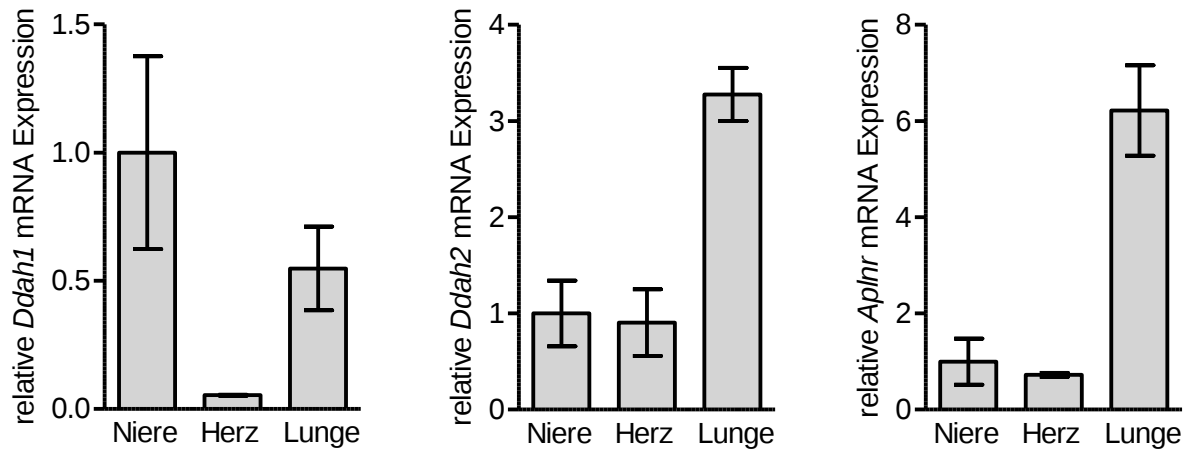


Abbildung 4.12: mRNA Expression der *Ddah1*, *Ddah2* und *Aplnr* in unterschiedlichen Gewebearten. Die Analyse wurde mittels qPCR aus Homogenaten von Niere, Herz und Lunge von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Werte sind als MW $\pm$ SEM relativ zum Mittelwert der *Ddah* beziehungsweise *Aplnr* mRNA Expression in der Niere dargestellt. n=8-12.

4.1.2.2 Validierung des PAH-ähnlichen Phänotyps

Zur Erzeugung des PAH-ähnlichen Phänotyps wurden Wildtyp- und *Ddah1*-defiziente Mäuse für vier Wochen unter normobaren, hypoxischen Bedingungen gehalten. Um das Wohlergehen der Mäuse zu überprüfen, wurde täglich sowohl das Spontanverhalten als auch der Allgemeinzustand der Tiere kontrolliert und einmal pro Woche wurde das Gewicht der Tiere dokumentiert (Abbildung 4.13). Hierbei wurden weibliche und männliche Tiere zunächst getrennt voneinander betrachtet.

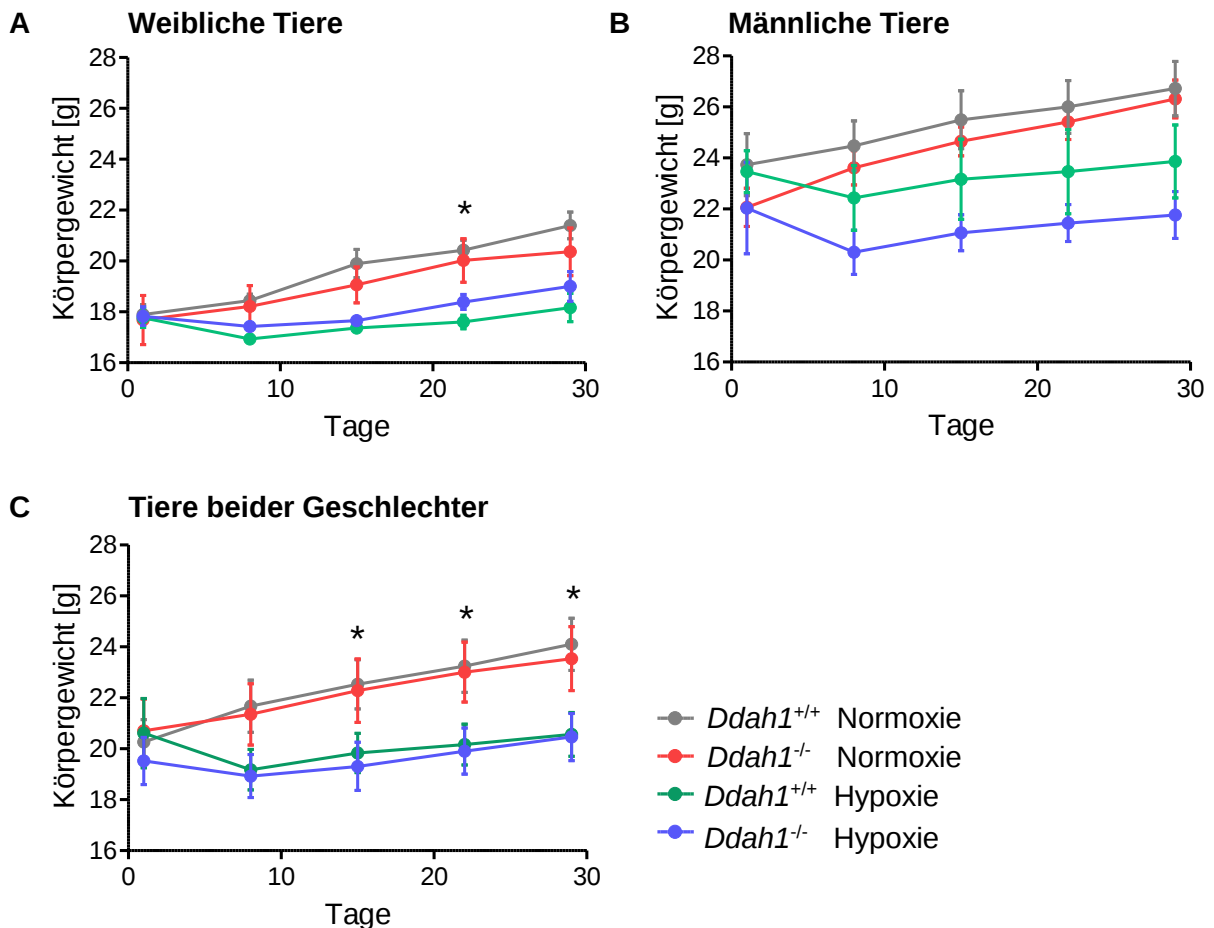


Abbildung 4.13: Gewichtsveränderungen der Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit.
A. Gewichtsveränderung der weiblichen Wildtyp (*Ddah1*^{+/+})- und *Ddah1*-defizienten (*Ddah1*^{-/-}) Tiere (*Ddah1*^{+/+}; Normoxie, n=5; Hypoxie, n=3. *Ddah1*^{-/-}; Normoxie, n=5; Hypoxie, n=7).
B. Gewichtsveränderung der männlichen Tiere (*Ddah1*^{+/+}; Normoxie, n=8; Hypoxie, n=6. *Ddah1*^{-/-}; Normoxie, n=5; Hypoxie, n=3). **C.** Darstellung des Körpergewichts aller Tiere über den vierwöchigen Beobachtungszeitraum (*Ddah1*^{+/+}; Normoxie, n=13; Hypoxie, n=9. *Ddah1*^{-/-}; Normoxie, n=10; Hypoxie, n=10). Die Daten sind als MW±SEM dargestellt. *p<0,05 vs. Hypoxie; 2-way-ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test.

Die Gewichtsanalysen zeigten, dass die Tiere unter unveränderten Sauerstoffbedingungen im Verlauf des Versuches stetig an Gewicht gewannen, wobei keine Unterschiede hinsichtlich des Genotyps festgestellt wurden. Bei den Tieren, welche zur Etablierung des PAH-ähnlichen Phänotyps unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, wurde innerhalb der ersten sieben Tage des Versuches eine Gewichtsreduktion um 3,9% beobachtet. Im Anschluss gewannen die Tiere wieder an Gewicht, konnten jedoch bis zum Ende des Versuchszeitraumes nicht das Gewicht ihrer Geschwister, die unter unveränderten Sauerstoffkonzentrationen gehalten wurden, erreichen. Selbst das jeweilige Ausgangsgewicht wurde innerhalb der vier Wochen nur von wenigen Tieren wieder erreicht. Unterschiede aufgrund des Genotyps konnten auch in der Hypoxie-exponierten Gruppe nicht beobachtet werden.

4.1.2.2.1 Expression NO-modulierender Enzyme

Um zu überprüfen, ob das gewählte Hypoxie-Modell einen Einfluss auf die *Ddah* Expression besitzt, wurde die pulmonale Expression der *Ddah*-Isoformen am Ende des vierwöchigen Versuches analysiert. Die mRNA, die für die DDAH1 und die DDAH2 kodiert, wurde mittels qPCR analysiert.

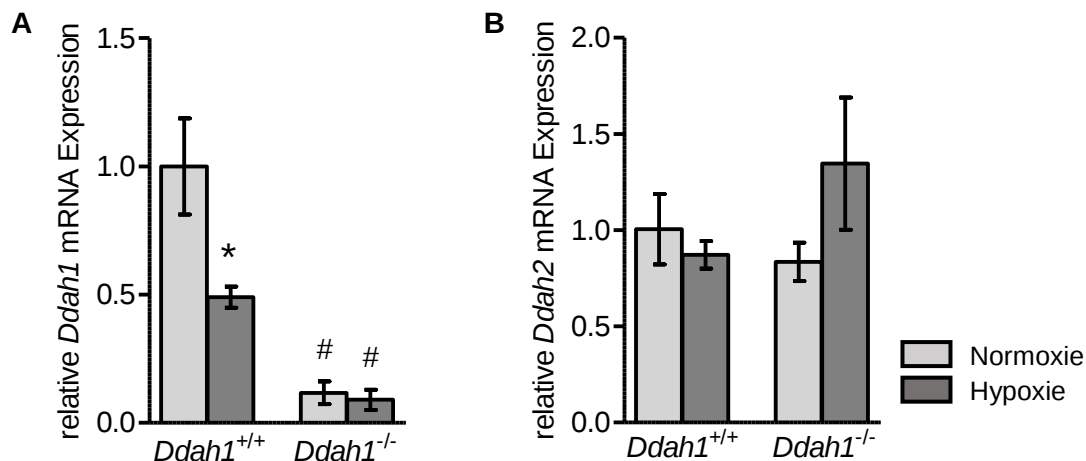


Abbildung 4.14: Pulmonale *Ddah1* und *Ddah2* mRNA Expression von unter Normoxie und Hypoxie gehaltener Versuchstiere. A. Quantitative Analyse der *Ddah1* und B. *Ddah2* Expression im Lungengewebe von *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}) sowie deren Wildtyp-Geschwistern (*Ddah1*^{+/+}), die unter normobaren, normoxischen oder hypoxischen Bedingungen gehalten wurden. Die Auswertung erfolgte durch Relativierung auf die Expression des Gens, welches für das Ribosomale Protein L13A kodiert, mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt und sind auf die Mittelwerte der pulmonalen mRNA Expression von unter Normoxie gehaltenen *Ddah1*^{+/+}-Tiere normiert. n=10; *p<0,05 vs. Normoxie; #p<0,05 vs. *Ddah1*^{+/+}; zweiseitiger t-Test.

Die Wildtyp-Mäuse zeigten durch eine vierwöchige Hypoxie-Exposition eine reduzierte *Ddah1* mRNA Expression. Die *Ddah1*-defizienten Mäuse wiesen erwartungsgemäß eine stark reduzierte Expression der *Ddah1* auf. Die mRNA Expression der *Ddah2* blieb in allen Versuchsgruppen unverändert (Abbildung 4.14).

Eine qualitative Analyse der *Ddah1* und *Ddah2* Proteinexpression wurde mittels Immunoblot und anschließender Antikörperdetektion durchgeführt. Die Proteine wurden aus Lungenhomogenat gewonnen; als Positivkontrolle der *Ddah1* Expression wurde das Homogenat einer Wildtyp-Niere verwendet. Da die höchste *Ddah2* Expression in der Lunge erwartet wurde (siehe Abschnitt 4.1.2.1), wurde hier keine Positivkontrolle aufgetragen. Die Hypoxie-behandelten Wildtyp-Tiere zeigten eine verminderte *Ddah1* Proteinexpression, während die *Ddah1*-defizienten Tiere keine pulmonale *Ddah1* Proteinexpression zeigten. Die *Ddah2* wurde in allen Versuchsgruppen in gleichem Maße exprimiert (Abbildung 4.15). Ein weiterer repräsentativer Immunoblot ist in Abschnitt 8.1.2 dargestellt.

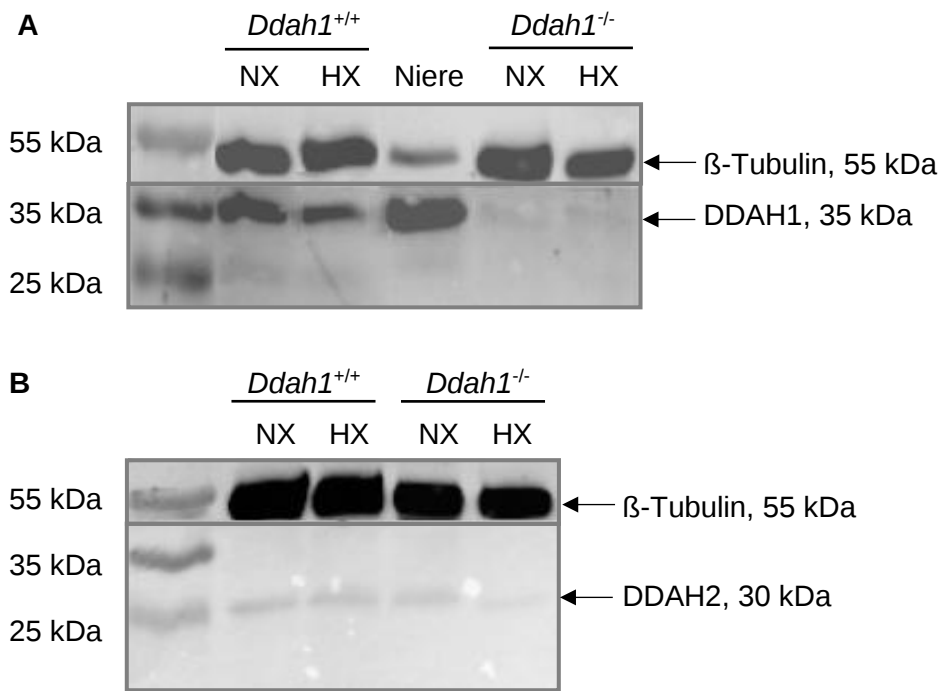


Abbildung 4.15: Immunoblots aus Lungenhomogenaten normoxisch- und hypoxisch-behandelter Wildtyp- und *Ddah1*-defizienter Mäuse. **A.** Proteinlysate, gewonnen aus Lungenhomogenat der Wildtyp (*Ddah1*^{+/+})- und *Ddah1*-defizienten (*Ddah1*^{-/-}) Mäuse, wurden mittels Immunoblot aufgetrennt und mithilfe von Antikörpern gegen DDAH1 und **B.** DDAH2 analysiert. Die Analyse der β-Tubulin Expression diente als Ladekontrolle. HX, Hypoxie; NX, Normoxie.

4.1.2.2.2 Plasma-Konzentrationen der L-Arginin-Derivate

Die Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäuse wurden im Rahmen dieser Arbeit für vier Wochen reduzierten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass abhängig vom Genotyp der Mäuse die L-Arginin-Plasmakonzentration durch Hypoxie-Exposition in Wildtyp-Tieren reduziert wird. Die SDMA-Plasmakonzentrationen wurden weder durch die Hypoxie-Exposition noch durch den Genotyp beeinflusst. Die ADMA-Plasmakonzentration ist, wie bereits von Hu und Kollegen beschrieben, in den *Ddah1*-defizienten Tieren erhöht (Hu et al. 2011). In Wildtyp-Tieren konnten unter Hypoxie-Exposition gesteigerte ADMA-Plasmakonzentrationen beobachtet werden, die bei den *Ddah1*-defizienten Tieren unverändert blieben. Bildete man das L-Arginin/ADMA-Verhältnis, so zeigte sich in den unter Hypoxie-Exposition gehaltenen Wildtyp-Tieren ein vermindertes Verhältnis verglichen mit den unter Normoxie gehaltenen Tieren. Die *Ddah1*-defizienten Mäuse zeigten ein reduziertes L-Arginin/ADMA-Verhältnis.

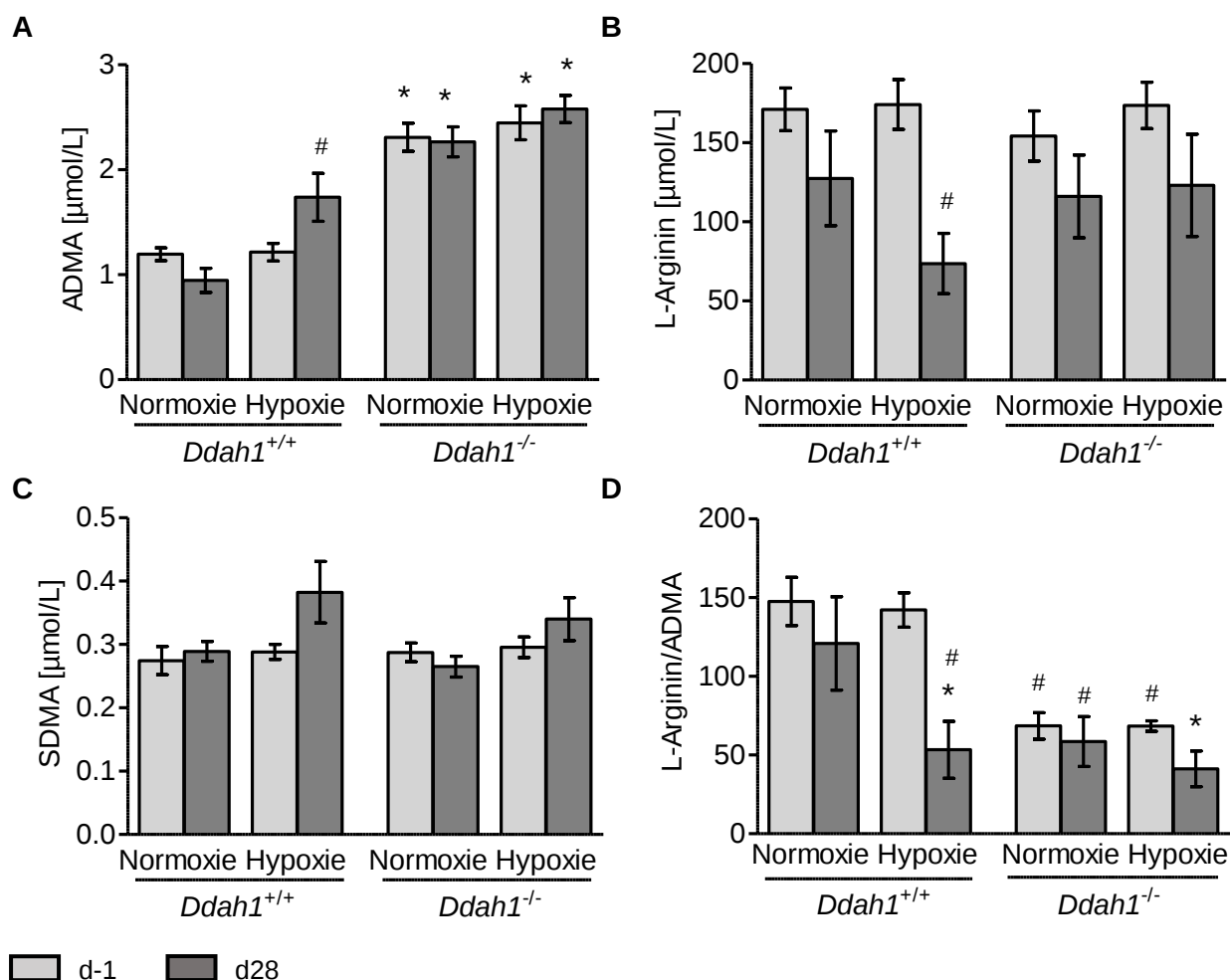


Abbildung 4.16: Hypoxie-induzierte Regulation von L-Arginin und den Dimethylargininen ADMA und SDMA in Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen. Es sind die Plasmakonzentrationen von Asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), Symmetrischem Dimethylarginin (SDMA) und L-Arginin in *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}) und ihren Wildtyp-Geschwistertieren (*Ddah1*^{+/+}) vor Versuchsbeginn (d-1; Normoxie, n=9; Hypoxie, n=7) sowie nach vierwöchiger Normoxie- (n=7) beziehungsweise Hypoxie-Exposition (d28; *Ddah1*^{+/+}; Normoxie, n=7; Hypoxie, n=6. *Ddah1*^{-/-}; Normoxie, n=7; Hypoxie, n=7) dargestellt. **A.** Plasmakonzentrationen von ADMA-, **B.** L-Arginin und **C.** SDMA wurden mittels validierter Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie gemessen. **D.** Graphische Darstellung des L-Arginin/ADMA-Verhältnisses. Die graphische Darstellung beruht auf MW±SEM. *p<0,05 vs. Präexposition; #p<0,05 vs. *Ddah1*^{+/+}; zweiseitiger t-Test.

4.1.2.2.3 Regulation von Apelin und dem Apelin-Rezeptor

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Hypoxie-Exposition oder die *Ddah1*-Defizienz der Tiere die Apelin-Regulation beeinflusst. Die Apelin-Konzentrationen wurden im Plasma mittels Apelin-ELISA gemessen, während die transkriptionelle Expression von *Aplnr* durch qPCR-Analyse und die APLNR-Proteinexpression mittels Immunoblot mit anschließender Antikörper-Detektion bestimmt wurde.

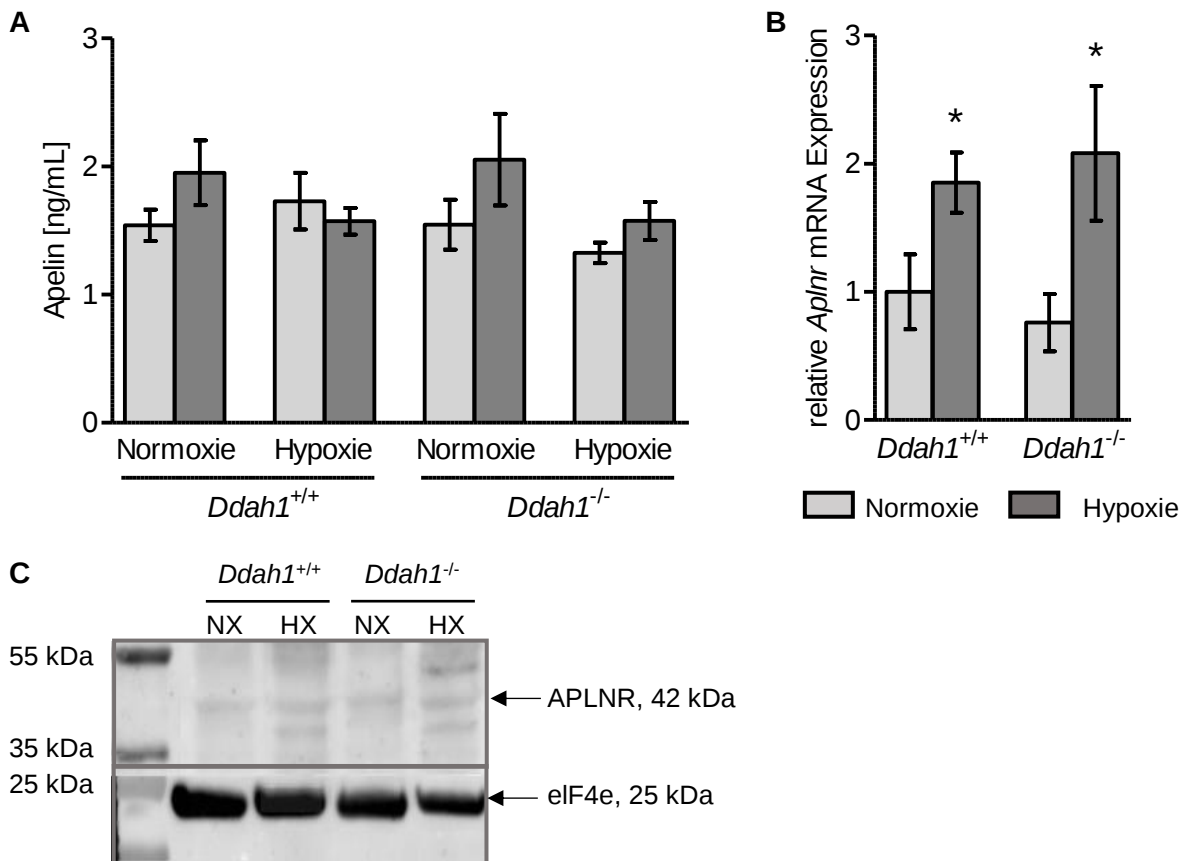


Abbildung 4.17: Einfluss von Hypoxie auf die Apelin-Plasmakonzentration sowie auf die pulmonale Expression seines G-Protein-gekoppelten Rezeptors *Aplnr* in Mäusen. **A.** Quantitative Bestimmung der Apelin-Plasmakonzentration in *Ddah1*-Wildtyp (*Ddah1*^{+/+}; Normoxie, n=8; Hypoxie, n=7) und *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}; Normoxie, n=6; Hypoxie, n=8). Die Analysen wurden vor (hellgrau) und nach (dunkelgrau) der Normoxie- beziehungsweise Hypoxie-Exposition (NX, HX) durchgeführt. **B.** Quantitative Analyse der *Aplnr* mRNA Expression in Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Tieren unter normoxischen und hypoxischen Sauerstoffbedingungen. Die Analyse erfolgte mittels qPCR und Relativierung auf das Ribosomale Protein L13A. Die Auswertung erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode und Normierung auf den Mittelwert der pulmonalen *Aplnr* mRNA Expression der unter Normoxie gehaltenen Wildtyp-Tiere durchgeführt. n=10; *p<0,05 vs. Präexposition; zweiseitiger t-Test. **C.** Qualitative Bestimmung der APLNR Proteinexpression mittels Immunoblot und anschließender Antikörper-Detektion gegen APLNR und die Ladekontrolle eIF4e. Alle Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt. eIF4e, eucaryotic translation initiation factor 4e.

Die Mäuse, die über den vierwöchigen Versuchszeitraum unter normobaren, normoxischen oder hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, zeigten im Vergleich zur präexpositionellen Apelin-Plasmakonzentration keine Veränderungen; auch vom Genotyp abhängige Unterschiede konnten nicht festgestellt werden. Während die Apelin-Plasmakonzentration unter reduzierten Sauerstoffbedingungen unverändert blieb, wurde eine genotypunabhängige, gesteigerte Expression des *Aplnr* durch Hypoxie-Exposition beobachtet.

4.1.2.2.4 Hämatokrit, hämodynamische Parameter und Rechtsherzhypertrophie

Allen Mäusen wurde nach Ende der vierwöchigen Expositionszeit retroorbital Blut zur Hämatokritmessung entnommen. Die Hämatokritanalyse konnte zeigen, dass der zelluläre Blutbestandteil der Tiere, die unter Hypoxie gehalten wurden, verglichen mit den Normoxie-exponierten Tieren, erhöht war. Zwischen den unter Normoxie gehaltenen Tieren konnte weiterhin ein Unterschied entsprechend ihres Genotyps festgestellt werden. Die Tiere, die eine *Ddah1*-Defizienz zeigten, wiesen unter Normoxie-Haltung einen erhöhten Hämatokrit, verglichen mit ihren Wildtyp-Geschwistern, auf (Abbildung 4.18). Abhängig vom Genotyp konnte bei den Tieren, die unter Hypoxie-Exposition gehalten wurden, kein Unterschied festgestellt werden.

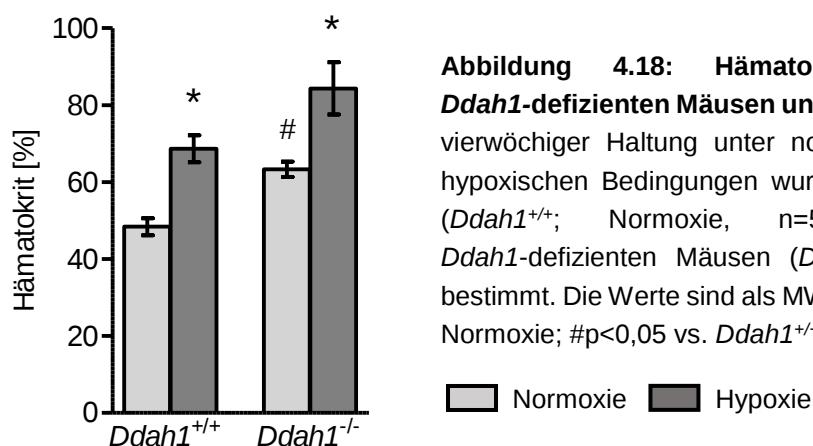


Abbildung 4.18: Hämatokrit von Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen unter Hypoxie-Exposition. Nach vierwöchiger Haltung unter normoxischen beziehungsweise hypoxischen Bedingungen wurde aus dem Blut von Wildtyp (*Ddah1*^{+/+}; Normoxie, n=5; Hypoxie, n=3) und *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}; n=3) der Hämatokrit bestimmt. Die Werte sind als MW±SEM dargestellt. *p<0,05 vs. Normoxie; #p<0,05 vs. *Ddah1*^{+/+}; zweiseitiger t-Test.

Ausdruck von Veränderungen der pulmonalen Arterien, wie sie bei Patienten mit PAH auftreten, ist eine Zunahme des pulmonal vaskulären Widerstands und Drucks. Als Folge kommt es zur Rechtsherzhypertrophie und Zunahme des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP). Um das Ausmaß der pulmonalen vaskulären Veränderungen auf die hämodynamische Veränderung des rechten Ventrikels im Hypoxie-Modell zu überprüfen, wurde in den Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Tieren, die unter normoxischen beziehungsweise hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, der RVSP mittels Rechtsherzkatheteruntersuchung ermittelt (Abbildung 4.19).

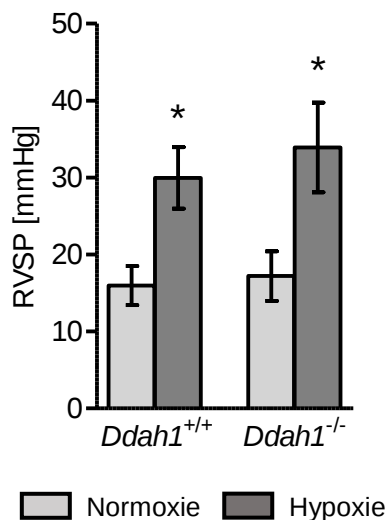


Abbildung 4.19: Mittlerer rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP) von Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen unter normobaren, normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die Analyse wurde nach vierwöchiger Normoxie- beziehungsweise Hypoxie-Exposition mittels Rechtsherzkatheteruntersuchung an Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}; n=3) und *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}; Normoxie, n=5; Hypoxie, n=4) durchgeführt. Dargestellt sind MW±SEM. *p<0,05 vs. Normoxie; zweiseitiger t-Test. *Ddah*, Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase; mmHg, Millimeter Quecksilbersäule; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler des Mittelwertes.

Unabhängig vom Genotyp konnten, verglichen mit der Normoxie-Kohorte, bei den Tieren, die unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, ein höherer RVSP gemessen werden. Abhängig vom Genotyp wurde kein Unterschied festgestellt.

Neben einem erhöhten Druck geht eine Zunahme des pulmonal vaskulären Widerstandes mit einer rechtsventrikulären Hypertrophie einher. Die Ausbildung wird auch als *Cor pulmonale* bezeichnet und kann zu einem Rechtsherzversagen führen, das die häufigste Todesursache von PAH-Patienten darstellt (Hoepfer *et al.* 2013). Zur Evaluation des PAH-ähnlichen Phänotyps, welcher in diesem Modell mittels Hypoxie-Exposition erzeugt wurde, wurden die Herzen der Tiere im Anschluss an den Versuch auf das Vorliegen einer Rechtsherzhypertrophie untersucht. Es wurde sowohl der Fulton-Index berechnet, als auch das Gewicht des rechten Ventrikels bezogen auf das Körpergewicht und die Tibialänge der Mäuse bestimmt. Anhand der Berechnungen konnte ein Anstieg aller drei Hypertrophie-Indices durch eine Hypoxie-Exposition nachgewiesen werden, welcher sowohl in den Wildtyp-Mäusen als auch in ihren *Ddah1*-defizienten Geschwistern gezeigt werden konnte. Abhängig vom Genotyp konnte, verglichen mit ihren Wildtyp-Geschwistern, ein erhöhter Fulton-Index in den *Ddah1*-defizienten Tieren festgestellt werden, der sowohl unter Normoxie-Exposition als auch unter sauerstoffreduzierten Bedingungen gezeigt werden konnte. Dieser genotypabhängige Unterschied wurde bei der Analyse des Verhältnisses des Gewichtes des rechten Ventrikels zum Körpergewicht oder der Tibialänge der Tiere lediglich unter Hypoxie-Exposition nachgewiesen. Eine Korrelation zwischen dem RVSP und dem Fulton-Index zeigte, dass eine Rechtsherzhypertrophie mit einem gesteigerten RVSP einhergeht (Abbildung 4.20).

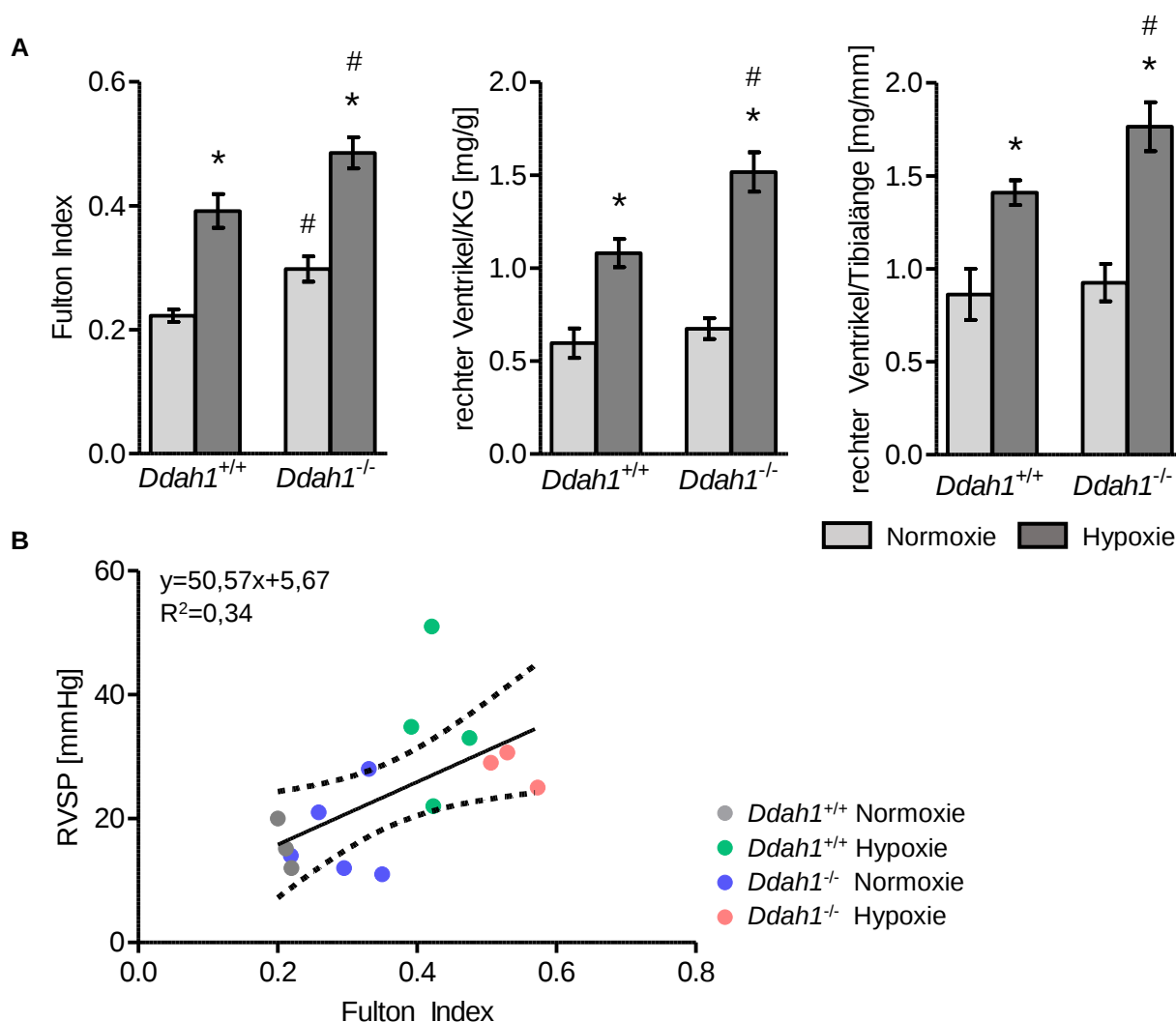


Abbildung 4.20: Veränderungen der Rechtsherzhypertrophie-Indices durch Hypoxie-Exposition in Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen. **A.** Die rechten Ventrikel von Normoxie- und Hypoxie-exponierten *Ddah1*-Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}; n=5) und *Ddah1*-defizienten Tieren (*Ddah1*^{-/-}; n=6) wurden ausgewogen und der Fulton-Index und die Relation vom rechten Ventrikel zum Körpergewicht (KG) und Tibialänge wurde berechnet. **B.** Korrelation zwischen dem Fulton Index und dem mittleren rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSP). Die Daten sind als MW±SEM dargestellt. *p<0,05 vs. Normoxie; #p<0,05 vs. Wildtyp; zweiseitiger t-Test.

Als weiterer Marker für das Vorliegen einer Rechtsherzhypertrophie gilt die Größe der Kardiomyozyten, die mittels immunhistochemischer Färbung von Dystrophin, einem Protein der Muskelfasermembran, analysiert wurde. Zur Auswertung wurde die Fläche aus dem Umfang der einzelnen Kardiomyozyten berechnet.

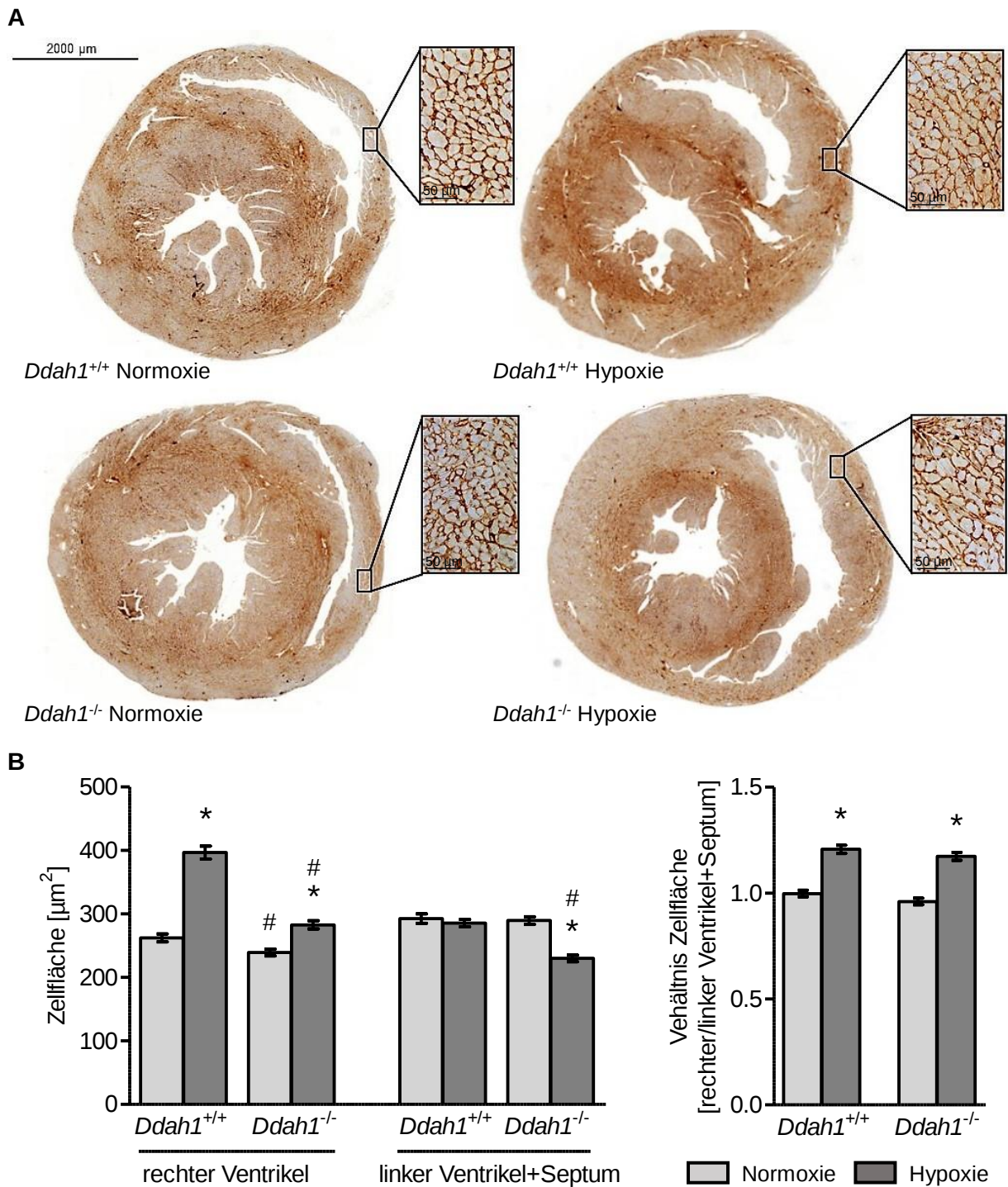


Abbildung 4.21: Kardiomyoztenfläche von Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen nach Hypoxie-Exposition. Querschnitte des Herzens von *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}) und ihren Wildtyp-Geschwistern (*Ddah1*^{+/+}). Die Kardiomyozyten wurden mittels Dystrophin-Antikörper immunhistochemisch angefärbt. **A.** Beispielhafte Querschnitte aus allen vier Versuchsgruppen. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt Kardiomyozyten des rechten Ventrikels, 50-fache Vergrößerung. **B.** Quantitative Auswertung der Kardiomyozytenfläche. Dargestellt sind die MW±SEM. n=400 Zellen aus vier Tieren je Gruppe; *p<0,05 vs. Normoxie; #p<0,05 vs. Wildtyp; zweiseitiger t-Test.

Die Tiere, die für vier Wochen einer Hypoxie-Exposition ausgesetzt waren, zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen eine vergrößerte Zellfläche rechtsventrikulärer Kardiomyozyten, während die Größe der linksventrikulären Zellen durch die Sauerstoffveränderung unverändert blieb oder reduziert wurde. Die Fläche der Kardiomyozyten des linken Ventrikels blieb in den Wildtyp-Tieren unverändert, während in den *Ddah1*-defizienten Tieren eine reduzierte Zellfläche nachgewiesen wurde. Die Berechnung des Verhältnisses der Zellfläche des rechten Ventrikels zur Fläche der linksventrikulären Kardiomyozyten zeigte sowohl in den Wildtyp- als auch in den *Ddah1*-defizienten Tieren eine Hypoxie-induzierte vergrößerte Kardiomyozytenfläche im rechten Ventrikel verglichen mit der Größe der Kardiomyozyten des linken Ventrikels. Das Verhältnis der Zellfläche des rechten zum linken Ventrikel und Septum zeigte keinen Unterschied abhängig vom Genotyp der Tiere.

4.1.2.2.5 Pulmonale Gefäß- und Alveolarveränderungen

Zum Nachweis elastischer Fasern wurde an histologischen Lungenschnitten eine Elastika-van-Gieson-Trichrom-Färbung angewandt, um anhand dieser die Intima-Media- und Adventitiadicke zu ermitteln (Abbildung 4.22). Die Färbung erlaubte eine deutliche Unterscheidung der internen und externen *lamina elastica*.

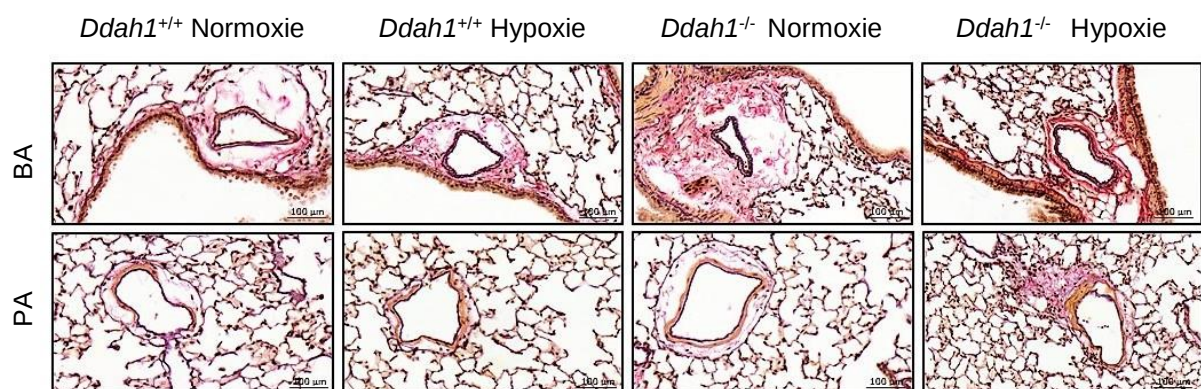


Abbildung 4.22: Beispielfarbungen histologische Elastika-van-Gieson-Färbung der pulmonalen Gefäße. Es wurden Bronchial (BA)- und Pulmonalarterien (PA) von Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}) und *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}) unter Normoxie- und Hypoxie-Exposition angefärbt.

Die Ermittlung der Intima-Media- und Adventitiadicke anhand der Elastika-van-Gieson-Färbung konnte zeigen, dass eine Hypoxie-Exposition der Tiere die Intima-Mediadicke in den Wildtyp-Tieren verstärkt. Die *Ddah1*-defizienten Tiere zeigten keine veränderte Intima-Mediadicke nach vierwöchiger Hypoxie-Behandlung (Abbildung 4.23). Ein genotypabhängiger Unterschied konnte nicht ermittelt werden. Eine Veränderung in der Adventitiadicke wurde weder durch eine Hypoxie-Exposition noch durch den unterschiedlichen Genotyp der Tiere beobachtet.

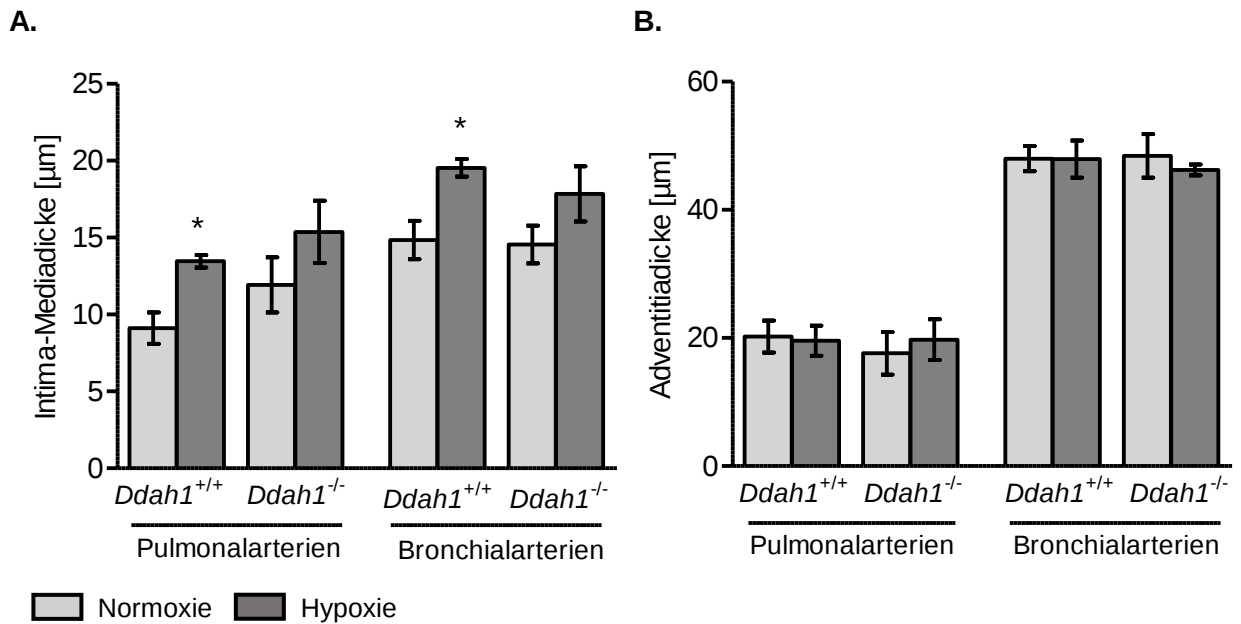


Abbildung 4.23: Veränderung der Intima-Media- und Adventitiadicke der Pulmonal- und Bronchialarterien durch Hypoxie-Exposition. A. Auswertung der Elastika-van-Gieson-Färbung (Abbildung 4.22) durch Ermittlung der Intima-Media- und B. Adventitiadicke von Pulmonal- und Bronchialarterien in Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen. Die Werte sind als MW±SEM dargestellt. *Ddah1*^{+/+}; Normoxie, n=9; Hypoxie, n=7. *Ddah1*^{-/-}, n=6. *p<0,05 vs. Normoxie; zweiseitiger t-Test.

Die Lungenschnitte wurden weiterhin immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) angefärbt, um Muskularisierungen der Gefäße zu detektieren. Zur Analyse der Gesamtzahl der im entsprechenden Lungenabschnitt befindlichen Gefäße wurde das Oberflächenmolekül *cluster of differentiation* (CD) 31 immunhistochemisch angefärbt, um endotheliale Strukturen, die die Gefäße auskleiden, sichtbar zu machen. Eine Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE-Färbung) zeigte die Struktur des Alveolargewebes (Abbildung 4.24).

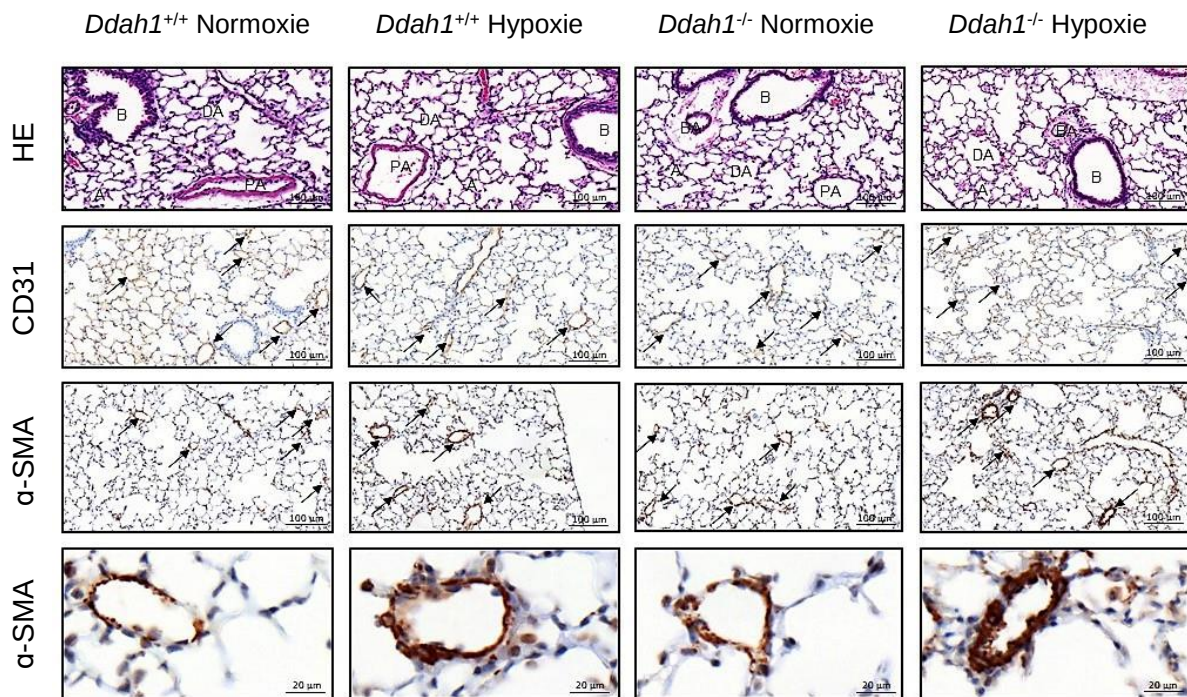


Abbildung 4.24: Histologische Färbungen zur Ermittlung pulmonaler Gefäß- und Strukturveränderungen durch Hypoxie-Exposition in Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE; oben, 20-fache Vergrößerung) stellt eine Übersichtsfärbung der Gefäß- und Alveolarstruktur dar. Immunhistochemische Färbungen mittels Antikörper gegen *cluster of differentiation* (CD) 31 (2. von oben, 20-fache Vergrößerung) und *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA; 3. von oben, 20-fache Vergrößerung; unten, 50-fache Vergrößerung eines isolierten Gefäßes) zeigen endotheliale Strukturen (CD31) sowie den Muskularisierungsgrad der Gefäße (α -SMA). Die Pfeile zeigen die angefärbten Gefäße. A, Alveole; B, Bronchus; BA, Bronchialarterie; DA, *Ductus Alveoli*; PA, Pulmonalarterie.

Die immunhistochemischen Färbungen (Abbildung 4.24) zeigten, dass eine Hypoxie-Exposition den Muskularisierungsgrad kleiner pulmonaler Gefäße beeinflusst. Durch die vierwöchige Haltung unter reduzierten Sauerstoffbedingungen wurden die absolute Anzahl und der prozentuale Anteil muskularisierter Gefäße erhöht, während der Anteil unmuskularisierter Gefäße gegen Null ging. Außerdem wurde die Anzahl der Gefäße pro 100 Alveolen durch die Hypoxie-Exposition auf die Hälfte reduziert (Abbildung 4.25). Vom Genotyp abhängige Unterschiede im Muskularisierungsgrad der Gefäße konnten nur unter normoxischen Bedingungen, nicht aber in den Hypoxie-exponierten Tieren gezeigt werden. Die *Ddah1*-defizienten Mäuse wiesen weniger unmuskularisierte Gefäße im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren auf. Anhand der HE-Übersichtsfärbung konnte demonstriert werden, dass die Induktion des PAH-ähnlichen Phänotyps weiterhin genotypunabhängig die Alveolarstruktur verändert. So zeigten Hypoxie-exponierte Tiere einen erniedrigten *radial alveolar count* (RAC), der die Anzahl der Alveolen pro Lungenabschnitt beschreibt.

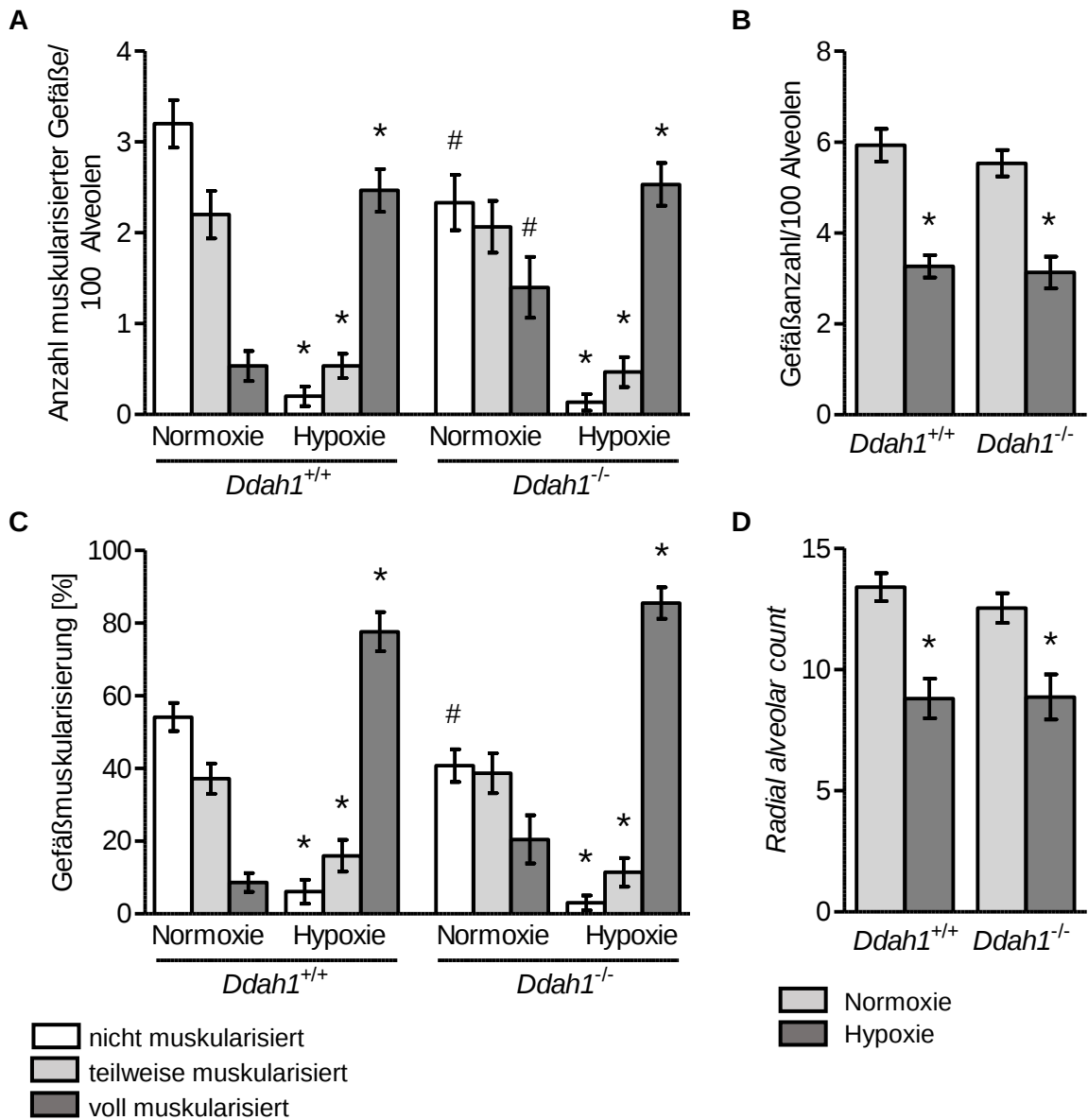


Abbildung 4.25: Pulmonale Gefäßmuskularisierung und -rarifizierung in Hypoxie-behandelten Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}) und *Ddah1*-defizienten (*Ddah1*^{-/-}) Mäusen. Die Auswertung erfolgte mittels der in Abbildung 4.24 dargestellten histologischen Färbungen. **A.** Einteilung der Gefäße mittels *alpha-smooth muscle actin*-Färbung in nicht muskularisiert, teilweise muskularisiert und voll muskularisiert. Die Anzahl der jeweiligen Gefäße wurde pro 100 Alveolen gezählt. **B.** Gesamtanzahl der Gefäße pro 100 Alveolen, ermittelt mithilfe der immunhistochemischen Färbung gegen *cluster of differentiation 31*. **C.** Der prozentuale Anteil nicht muskularisierter, teilweise muskularisierter und voll muskularisierter Gefäße, bezogen auf die Gesamtanzahl der Gefäße pro 100 Alveolen. **E.** Der *Radial alveolar count* beschreibt die Anzahl der Alveolen in einem definierten Abschnitt, die anhand der HE-Färbung ermittelt wurden. Die Werte sind als MW±SEM dargestellt. n=15, aus definierten Lungenabschnitten von 100 Alveolen von insgesamt drei Tieren je Versuchsgruppe. *p<0,05 vs. Normoxie; #p<0,05 vs. Wildtyp; zweiseitiger t-Test.

Die pulmonalen Veränderungen im Aufbau der Gefäßwand werden unter anderem durch endotheliale Proliferation und Migration hervorgerufen. Strukturelle Veränderungen sind auf eine erhöhte Muskularisierung und die vermehrte Synthese von Bindegewebsstrukturen zurückzuführen, die zu vaskulären Umbauprozessen (*Remodeling*) führen können. Mittels quantitativer PCR wurde die mRNA Expression von *Col4a1* im Lungenhomogenat der Tiere analysiert. Abbildung 4.26 zeigt, dass eine vierwöchige Hypoxie-Exposition unabhängig vom Genotyp in einer gesteigerten *Col4a1* mRNA Expression resultierte.

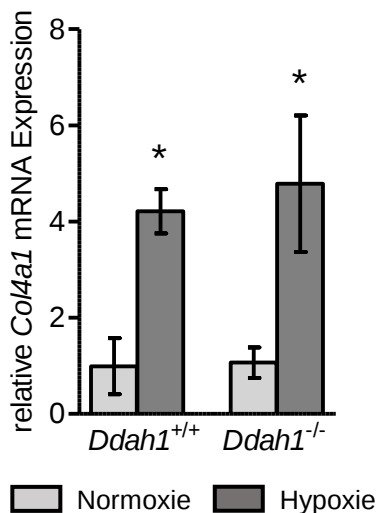


Abbildung 4.26: Pulmonale *Col4a1* mRNA Expression in normoxischen und hypoxischen Mäusen. Die quantitative Analyse der pulmonalen Kollagen IV, alpha 1 (*Col4a1*) mRNA Expression erfolgte mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion und Relativierung auf das Ribosomale Protein L13A. Zur Auswertung wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt und die Werte wurden auf die pulmonale *Col4a1* Expression in normoxischen Wildtyp-Tieren normiert. Die graphische Darstellung beruht auf $MW \pm SEM$. $n=10$; * $p < 0,05$ vs. Normoxie; zweiseitiger t-Test.

4.1.2.3 Einfluss von Apelin auf den PAH-ähnlichen Phänotyp

Um den möglichen Einfluss von Apelin auf die Entwicklung eines PAH-ähnlichen Phänotypes und die Modulation des Phänotyps durch den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg zu untersuchen, wurden die Mäuse für vier Wochen mit Apelin behandelt. Das Apelin wurde ihnen mittels subkutan implantierter osmotischer Minipumpen kontinuierlich verabreicht. Als Kontrolle dienten Mäuse, denen mit isotonischer NaCl-Lösung gefüllte Minipumpen implantiert wurden. Um einen Phänotyp, ähnlich dem einer PAH, zu induzieren, wurden die *Ddah1*-defizienten Mäuse und ihre Wildtyp-Geschwister während des gesamten Versuchszeitraumes einer Hypoxie-Exposition ausgesetzt. Sowohl vor Versuchsbeginn als auch zum Ende des Versuches wurde allen Tieren Blut entnommen, welches zur Bestimmung des Hämatokrits und zur Analyse der Plasmakonzentrationen von Apelin und den Methylargininen diente.

4.1.2.3.1 Konzentrationsfindung

Um die optimale Supplementationskonzentration von Apelin zu ermitteln, wurden zunächst an Wildtyp-Tieren Freigaberraten von 1 mg/kg KG, 2 mg/kg KG und 2,5 mg/kg KG pro Tag im Vergleich zu einer NaCl-Behandlung getestet. Die Tiere wurden zur Konzentrationsermittlung für vier Wochen unter unveränderten Sauerstoffbedingungen gehalten. Vor Versuchsbeginn sowie einmal pro Woche während des gesamten Versuchszeitraumes wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, welches zur Bestimmung der Apelin-Plasmakonzentration mittels ELISA-Analyse diente. Bei einer täglichen Apelin-Freigabe der Pumpen von 1,5 mg/kg KG konnte lediglich eine leicht erhöhte Apelin-Plasmakonzentration im Vergleich zu den NaCl-supplementierten Kontrolltieren festgestellt werden. Eine deutlich gesteigerte Plasmakonzentration konnte bei Supplementationen von 2 oder 2,5 mg/kg KG pro Tag gezeigt werden. Die Apelin-Plasmakonzentration, die nach Ende des Versuches gemessen wurde, war in allen Versuchsgruppen im Vergleich zum Ausgangswert erniedrigt (Abbildung 4.27). Aufgrund der gemessenen Apelin-Konzentration im Plasma der Mäuse wurde in den folgenden Versuchen zur Supplementationskonzentration stets eine Apelin-Freigaberrate von 2 mg/kg KG pro Tag gewählt.

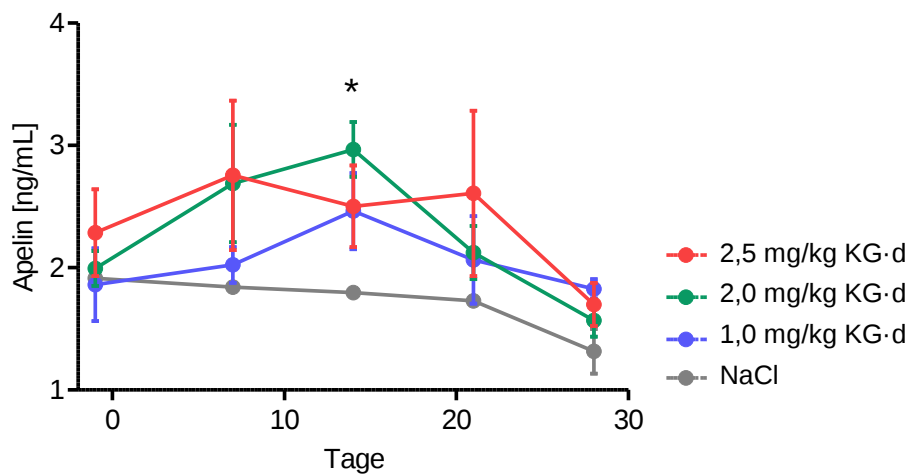


Abbildung 4.27: Apelin-Plasmakonzentrationen von Apelin- und NaCl-supplementierten Wildtyp-Mäusen innerhalb eines Versuchszeitraumes von vier Wochen. Wildtyp-Tieren wurde mittels osmotischer Minipumpen Natriumchlorid-Lösung (NaCl) oder Apelin in unterschiedlichen Konzentrationen verabreicht, um eine Freigaberrate von 1, 2 oder 2,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag (d) zu erhalten. Einmal pro Woche wurden den Tieren Blut entnommen, welches zur Analyse der Apelin-Plasmakonzentration mittels ELISA diente. Die Werte sind als MW±SEM angegeben. n=3-4; *p<0,05 vs. NaCl; 2-way-ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test.

4.1.2.3.2 Gewichtsveränderungen

Zur Überprüfung des Wohlergehens der Tiere wurde während des gesamten Versuchszeitraumes täglich der Zustand der Tiere überprüft. Da sich das Befinden der Tiere häufig in ihrer Gewichtszunahme oder -abnahme widerspiegelt, wurde neben der täglichen Kontrolle des Allgemeinzustandes und des Spontanverhaltens einmal wöchentlich das Gewicht der Tiere dokumentiert. Männliche und weibliche Tiere wurden wegen ihres Gewichtsunterschiedes zunächst getrennt betrachtet. Innerhalb der ersten sieben Beobachtungstage unter Hypoxie-Exposition haben alle Mäuse durchschnittlich 9,4% ihres Körpergewichtes verloren, im Anschluss aber erneut Gewicht hinzugewonnen (Abbildung 4.28). Zum Ende des Versuches haben die meisten Tiere ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht. Es wurden weder apelin- noch genotypabhängige Unterschiede festgestellt.

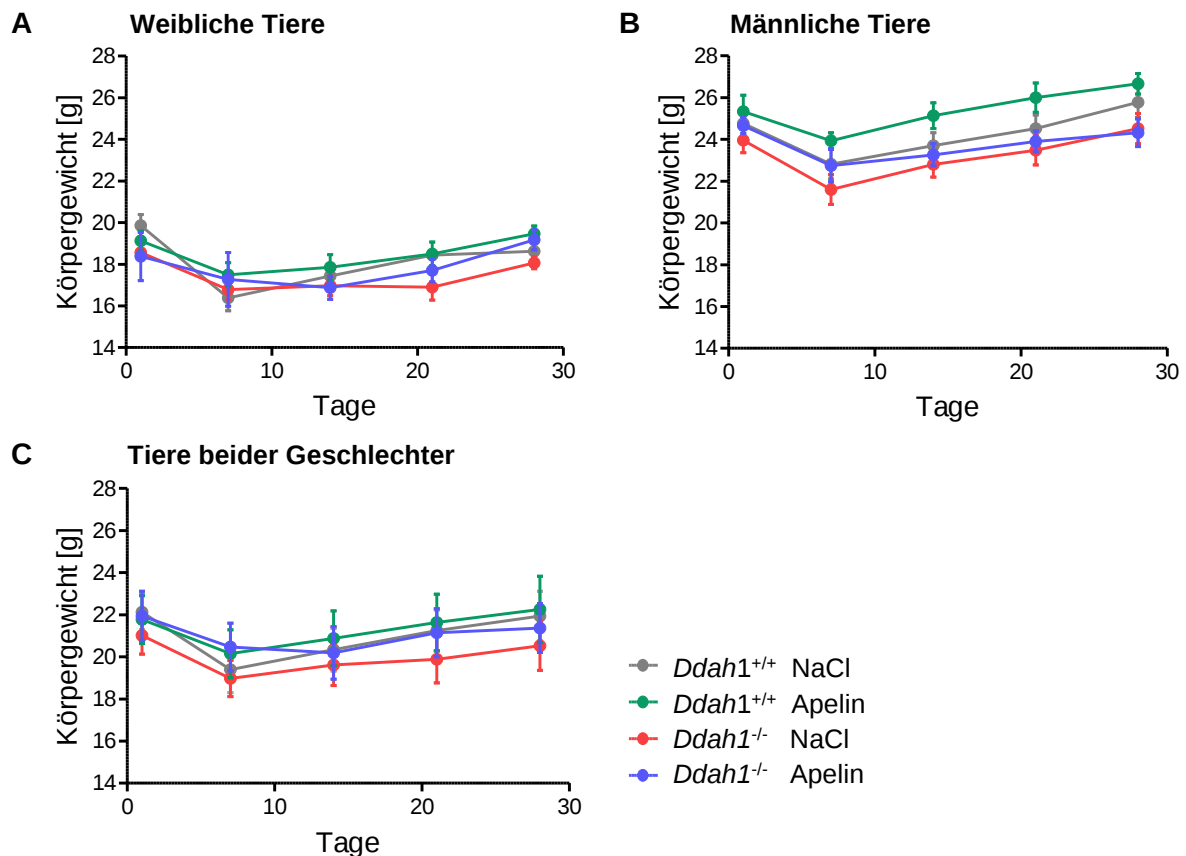


Abbildung 4.28: Gewichtsveränderungen der Apelin- und NaCl-supplementierten Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit. **A.** Gewichtsveränderungen der weiblichen Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}) und *Ddah1*-defizienten (*Ddah1*^{-/-}) Tiere. *Ddah1*^{+/+}; Apelin, n=5; NaCl, n=5. *Ddah1*^{-/-}; Apelin, n=4; NaCl, n=5. **B.** Gewichtsveränderungen der männlichen Tiere. *Ddah1*^{+/+}; NaCl, n=6; Apelin, n=3; *Ddah1*^{-/-}; n=5. **C.** Darstellung des Körpergewichtes aller Tiere über den vierwöchigen Beobachtungszeitraum. *Ddah1*^{+/+}; NaCl, n=11; Apelin, n=8. *Ddah1*^{-/-}; NaCl, n=10; Apelin, n=9. Alle Tiere wurden unter hypoxischen Bedingungen gehalten und mit NaCl oder Apelin (2 mg/kg KG·d) supplementiert. Die Daten sind als MW±SEM dargestellt. Keine signifikanten Unterschiede; 2-way-ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test.

4.1.2.3.3 Apelin-Plasmakonzentrationen

Zur Überprüfung der Funktionalität der implantierten osmotischen Minipumpen und zur Analyse der Apelin-Plasmakonzentrationen während des Versuchszeitraumes wurde in allen Mäusen sowohl vor Versuchsbeginn als auch nach Versuchsende retroorbitär Blut entnommen und mittels ELISA die Apelin-Plasmakonzentration ermittelt.

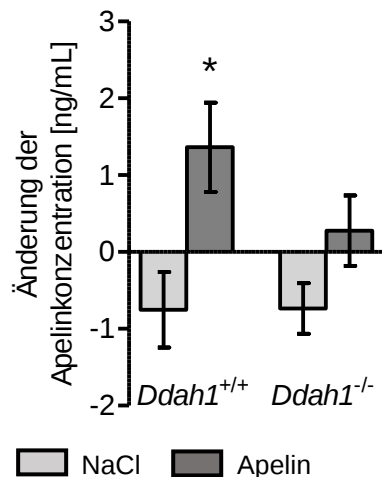


Abbildung 4.29: Änderung der Apelin-Konzentrationen durch Apelin- oder NaCl-Supplementation im Plasma von unter Hypoxie gehaltenen Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen. Die Apelin-Konzentration im Plasma der Mäuse wurde vor Versuchsbeginn sowie nach vierwöchiger Apelin- (2 mg/kg KG·d; *Ddah1*^{+/+}, n=9; *Ddah1*^{-/-}, n=11) oder Natriumchlorid-Supplementation (NaCl; *Ddah1*^{+/+}, n=8; *Ddah1*^{-/-}, n=11) mittels ELISA analysiert und die Differenz berechnet. Die graphische Darstellung beruht auf MW±SEM. *p<0,05 vs. NaCl; zweiseitiger t-Test.

Die Apelin-Plasmakonzentration war durch die subkutane Verabreichung von Apelin oder NaCl, bei den Apelin-supplementierten Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den Tieren, die NaCl erhielten, zu einer höheren Konzentration verschoben (Abbildung 4.29). In den *Ddah1*-defizienten Tieren konnte ein Trend festgestellt werden, der auf eine erhöhte Plasmakonzentration in den Apelin-behandelten Tieren hindeutet.

4.1.2.3.4 Expression NO-modulierender Enzyme

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Hypoxie-Exposition die mRNA Expression der *Ddah1*, nicht aber der *Ddah2*, in Wildtyp-Tieren reduziert (Abschnitt 2.1.2.2.1), sollte nun überprüft werden, welchen Einfluss eine Supplementation von Apelin auf die mRNA Expression NO-modulierender Enzyme besitzt. Nach Ablauf des Versuches wurde im Lungenhomogenat der Mäuse die mRNA Expression der *Ddah1* und *Ddah2* bestimmt. Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass eine Apelin-Supplementation in Wildtyp-Tieren in einer gesteigerten mRNA Expression der *Ddah1* resultiert. Die *Ddah1*-defizienten Tiere blieben in Bezug auf die *Ddah1* mRNA Expression unbeeinflusst (Abbildung 4.30). Die Analyse der *Ddah2* Expression zeigte, dass die subkutane Verabreichung von Apelin weder in *Ddah1*-defizienten Tieren noch in den Wildtyp-Mäusen zu einer Veränderung im Expressionsmuster führt.

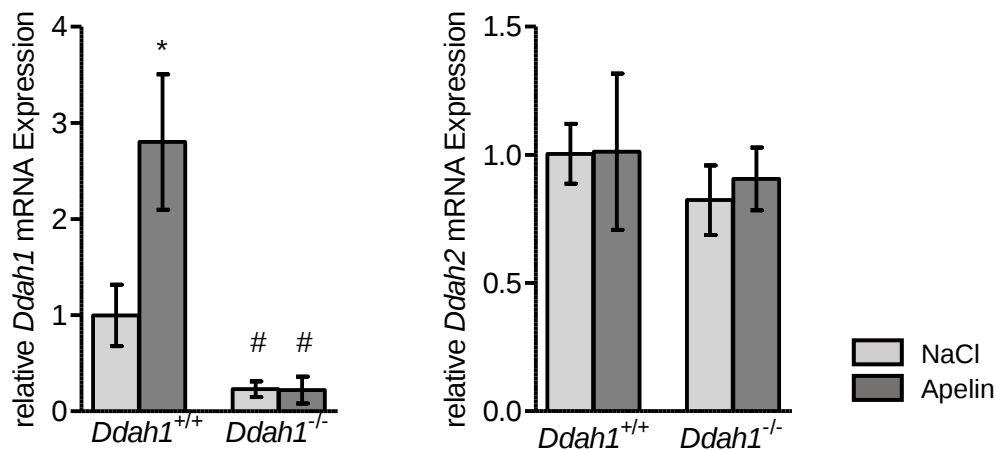


Abbildung 4.30: Pulmonale *Ddah1* und *Ddah2* mRNA Expression Apelin- und NaCl-supplementierter Mäuse. A. Quantitative Analyse der *Ddah1* und *Ddah2* Expression in Lungenhomogenat von Apelin- (2 mg/kg KG·d) oder NaCl-supplementierten *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}) sowie deren Wildtyp-Geschwisten (*Ddah1*^{+/+}). Alle Tiere wurden unter normobaren, hypoxischen Bedingungen gehalten. Die Analyse erfolgte mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion und Relativierung auf die mRNA Expression des Ribosomalen Proteins L13A mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt und sind auf die NaCl-supplementierten Wildtyp-Tiere normiert. n=6; *p<0,05 vs. NaCl; zweiseitiger t-Test.

Neben der Analyse der mRNA Expression der *Ddah1* und *Ddah2*, wurde die Proteinexpression der NO-modulierenden Enzyme mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot durch Antikörper-Detektion bestimmt. In den Apelin-supplementierten Wildtyp-Tieren konnte eine gesteigerte DDAH1 Proteinexpression gezeigt werden. Die DDAH1-Proteinexpression aus dem Nierenlysat einer Wildtyp-Maus wurde als Positivkontrolle verwendet. Die DDAH2 Proteinexpression zeigte sowohl in den Wildtyp- als auch in den *Ddah1*-defizienten Tieren keinen Unterschied (Abbildung 4.31). Ein weiterer repräsentativer Immunoblot ist in Abschnitt 8.1.3 dargestellt.

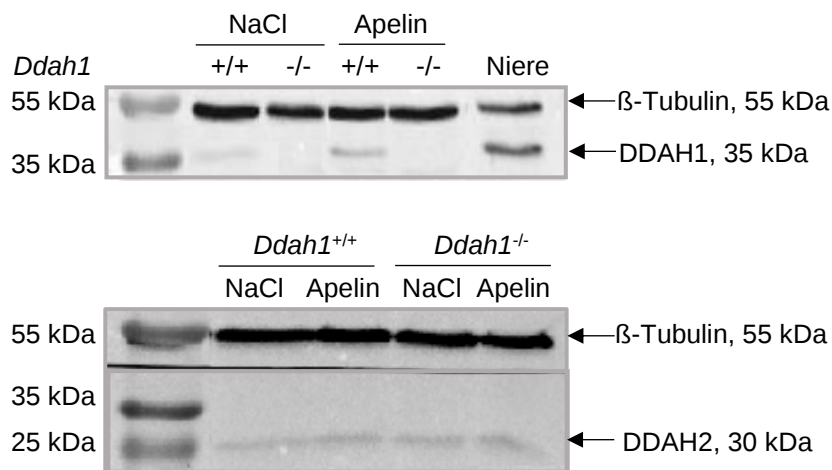
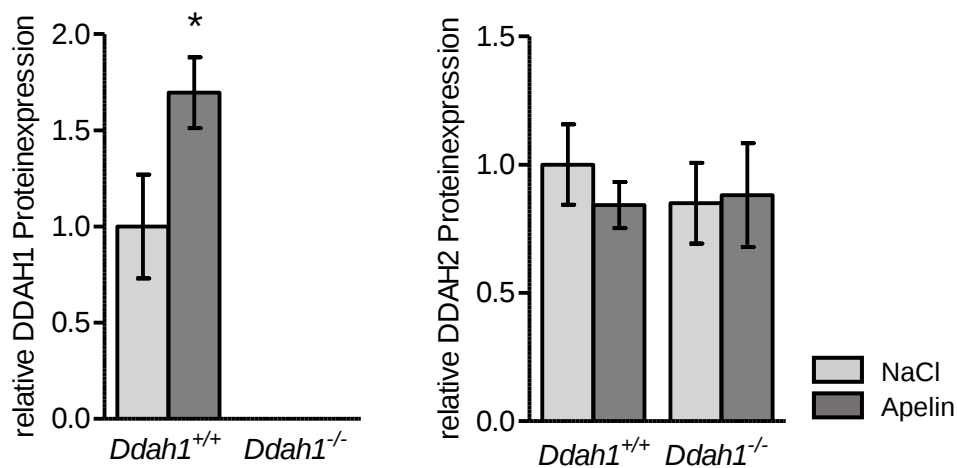
A**B**

Abbildung 4.31: Immunoblot-Analyse von Apelin- und NaCl-supplementierten Mäusen.
A. Repräsentative Immunoblots zur Analyse der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) 1 und 2 in Wildtyp- ($Ddah1^{+/+}$) und $Ddah1$ -defizienten Tieren ($Ddah1^{-/-}$). Die β -Tubulin Proteinexpression diente als Ladekontrolle. **B.** Auswertung der Immunoblots durch Relativierung auf die β -Tubulin Proteinexpression und Normierung auf die Proteinexpression von NaCl-supplementierten Wildtyp-Tieren. Alle Tiere wurden unter hypoxischen Bedingungen gehalten und mit Apelin (2 mg/kg KG·d) oder Natriumchlorid (NaCl) behandelt. Die graphische Darstellung beruht auf $MW \pm SEM$.

4.1.2.3.5 Plasma-Konzentrationen der L-Arginin-Derivate nach Apelin-Supplementation

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass eine Apelin-Verabreichung die Expression des ADMA-abbauende Enzym DDAH1 im Lungengewebe hochreguliert, sollte der Einfluss Apelins auf die Synthese der Methylarginine nachgewiesen werden. Mittels validierter LC-MS/MS-Analyse wurden die Plasmakonzentrationen von L-Arginin, ADMA und SDMA bestimmt.

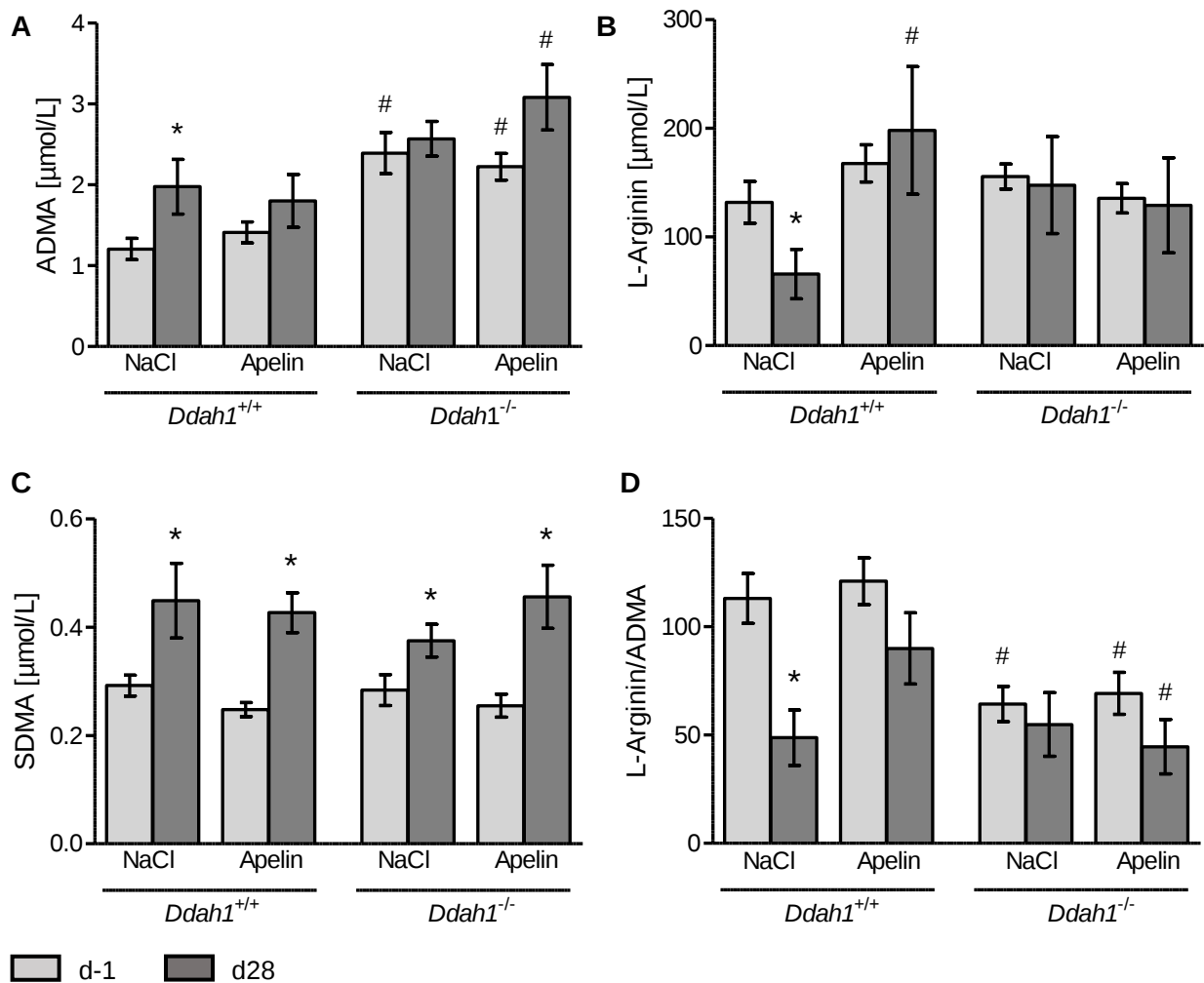


Abbildung 4.32: Plasma-Konzentrationen der Methylarginine nach Apelin-Supplementation in *Ddah1*-defizienten Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistern. Die Konzentrationen von **A.** Asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA; *Ddah1*^{+/+}, n=9; *Ddah1*^{-/-}, n=10), **B.** L-Arginin (*Ddah1*^{+/+}; NaCl, n=8; Apelin, n=9. *Ddah1*^{-/-}; n= 10), und **C.** Symmetrischem Dimethylarginin (SDMA; *Ddah1*^{+/+}, n=9; *Ddah1*^{-/-}; n=10) wurde mittels LC-MS/MS-Analyse vor (d-1) und nach der vierwöchigen Apelin (2 mg/kg KG·d) oder NaCl-Behandlung (d28) bestimmt. Alle Tiere wurden unter Hypoxie-Exposition gehalten. **D.** Darstellung des L-Arginin/ADMA-Verhältnisses. Die Darstellung der Werte beruht auf MW±SEM. *p<0,05 vs. vor d-1; #p<0,05 vs. NaCl; zweiseitiger t-Test.

Anhand dieser Messungen konnte gezeigt werden, dass eine Supplementation von Apelin in Wildtyp-Mäusen die Hypoxie-bedingte Reduktion der Plasma-L-Arginin-Konzentration inhibiert, während in den *Ddah1*-defizienten Mäusen kein Unterschied detektiert werden konnte (Abbildung 4.32). Die ADMA-Plasmakonzentration stieg durch die vierwöchige Haltung der NaCl-supplementierten Wildtyp-Tiere unter sauerstoffreduzierten Bedingungen an. Dieser Effekt konnte in den Apelin-supplementierten Tieren nicht gezeigt werden. Die *Ddah1*-defizienten Mäuse zeigten, wie bereits in Abschnitt 4.1.5.2.3 beschrieben, im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren eine gesteigerte ADMA-Plasmakonzentration, die durch Apelin-Supplementation unbeeinflusst blieb. Durch die Hypoxie-Exposition konnte in allen Versuchsgruppen unabhängig vom Genotyp oder der Apelin-Behandlung ein Anstieg der SDMA-Plasmakonzentration festgestellt werden. Bildete man das Verhältnis aus L-Arginin und ADMA, so zeigte sich nach Hypoxie-Exposition eine Reduktion des Verhältnisses in den NaCl-behandelten Wildtyp-Tieren. Im Vergleich zu den genetisch unveränderten Mäusen zeigten die *Ddah1*-defizienten Mäuse ein reduziertes L-Arginin/ADMA-Verhältnis, welches sowohl durch Hypoxie-Exposition als auch durch eine Apelin-Behandlung unbeeinflusst blieb.

4.1.2.3.6 Regulation des Apelin-Rezeptors

Mittels quantitativer PCR wurde die Expression des GPCR *Ap1nr* analysiert, um den Einfluss von Apelin auf die *Ap1nr*-Regulation zu überprüfen. Die Analyse erfolgte aus dem Lungenhomogenat Apelin- und NaCl-supplementierter Tiere. Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren, die NaCl über die osmotische Minipumpe erhielten, zeigten die Apelin-supplementierten Tiere eine reduzierte *Ap1nr* mRNA Expression (Abbildung 4.33). Innerhalb der Gruppe der *Ddah1*-defizienten Tiere konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die Proteinexpression wurde mittels Immunoblot und anschließender Antikörper-Detektion ermittelt.

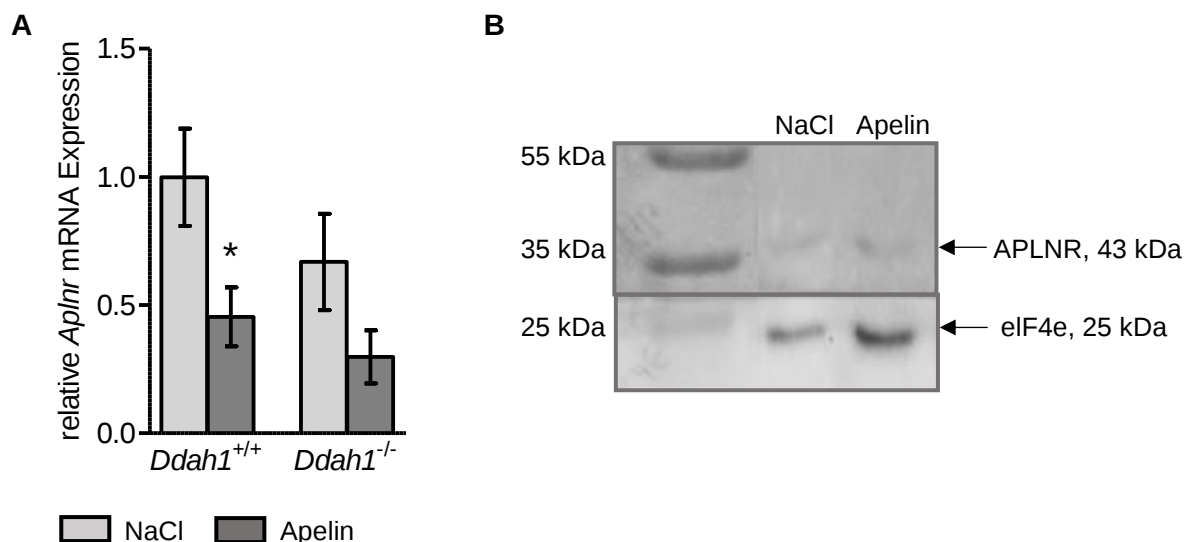


Abbildung 4.33: Apelin-Rezeptor Expression in Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen nach Apelin- oder NaCl-Verabreichung unter Hypoxie-Exposition. **A.** Die Apelin-Rezeptor (*Aplnr*) mRNA Expression von Apelin- (2 mg/kg KG·d) und Natriumchlorid- (NaCl) supplementierten Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}) und *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}), gehalten unter sauerstoffreduzierten Bedingungen, wurde untersucht. Die Analyse erfolgte mittels quantitativer Polymerasen-Kettenreaktion und anschließender Auswertung mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode durch Relativierung auf das Ribosomale Protein L13A. Die Daten sind als MW $\pm$ SEM, normiert auf die Normoxie-behandelten Wildtyp-Mäuse, dargestellt. n=5; *p<0,05 vs. NaCl; zweiseitiger t-Test. **B.** Immunoblot aus Lungenproteinlysaten von NaCl- und Apelin-supplementierten Wildtyp-Mäusen und anschließender APLNR-Antikörperdetektion. Als Ladekontrolle diente die Detektion von eIF4e. eIF4e, eucaryotic translation initiation factor 4E.

4.1.2.3.7 Hämatokrit, hämodynamische Parameter und Rechtsherzhypertrophie

Zum Ende des vierwöchigen Versuchszeitraumes wurde allen Tieren retrobulbär Blut entnommen, anhand dessen der Hämatokrit bestimmt wurde (Abbildung 4.34). Es zeigte sich kein Unterschied im Hämatokrit der *Ddah1*-defizienten Mäusen und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere, die mit Apelin oder NaCl supplementiert wurden.

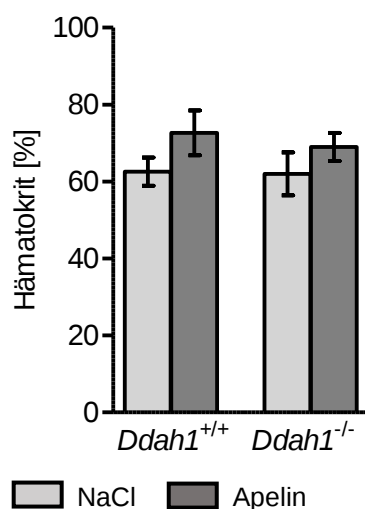


Abbildung 4.34: Hämatokrit der Apelin- und NaCl-supplementierten Mäuse nach vierwöchiger Hypoxie-Exposition. Der Hämatokrit der Wildtyp (*Ddah1*^{+/+}) und *Ddah1*-defizienten Mäuse (*Ddah1*^{-/-}) wurde nach vierwöchiger Supplementation von Apelin (2 mg/kg KG·d; *Ddah1*^{+/+}, n=3; *Ddah1*^{-/-}, n=5) oder Natriumchlorid-Lösung (NaCl; *Ddah1*^{+/+}, n=5; *Ddah1*^{-/-}, n=3) bestimmt. Dargestellt sind die Werte als MW $\pm$ SEM. Keine signifikanten Unterschiede; zweiseitiger t-Test.

Weiterhin wurde bei den Apelin- und NaCl-supplementierten *Ddah1*-defizienten Mäusen sowie ihren Wildtyp-Geschwisten eine Rechtsherzkatheteruntersuchung zur Ermittlung des RVSP durchgeführt.

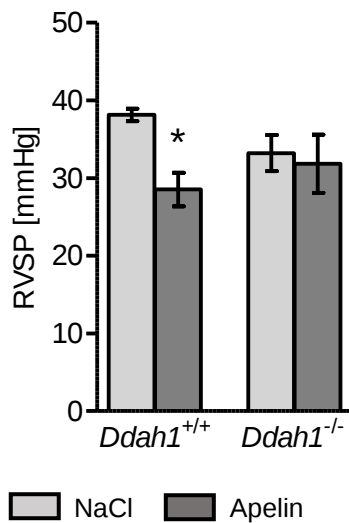


Abbildung 4.35: Änderung des mittleren rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) nach Apelin-Supplementation von Mäusen unter Hypoxie-Exposition. Die Untersuchung wurde nach vierwöchiger Supplementation von Apelin (2 mg/kg KG·d) oder Natriumchloridlösung (NaCl) mittels einer Rechtsherzkatheteruntersuchung an Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}; NaCl, n=3; Apelin, n=5) und *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}; NaCl, n=3; Apelin, n=4) durchgeführt. Dargestellt sind MW±SEM. *p<0,05 vs. Normoxie; zweiseitiger t-Test.

Anhand dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine subkutane, kontinuierliche Verabreichung von Apelin den durch Hypoxie-Exposition gesteigerten RVSP in Wildtyp-Tieren reduziert (Abbildung 4.35). In den *Ddah1*-defizienten Mäusen konnte dieser Unterschied nicht festgestellt werden. Analog zu dem Versuch, in welchem der Einfluss von Hypoxie zur Induktion des PAH-ähnlichen Phänotyps untersucht wurde (siehe Abschnitt 4.1.2.2.4), konnte auch hier kein Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen und ihren *Ddah1*-defizienten Geschwistertieren ermittelt werden. Im Anschluss wurden die Herzen der unter Narkose getöteten Tiere explantiert, mit Formaldehyd-Lösung fixiert und das Gewicht des rechten Ventrikels wurde getrennt vom Gewicht des linken Ventrikels und Septum bestimmt, um den Fulton Index zu berechnen. Als weitere Hypertrophie-Indices wurde das Gewicht des rechten Ventrikels bezogen auf das Körpergewicht oder die Tibialänge der Tiere berechnet.

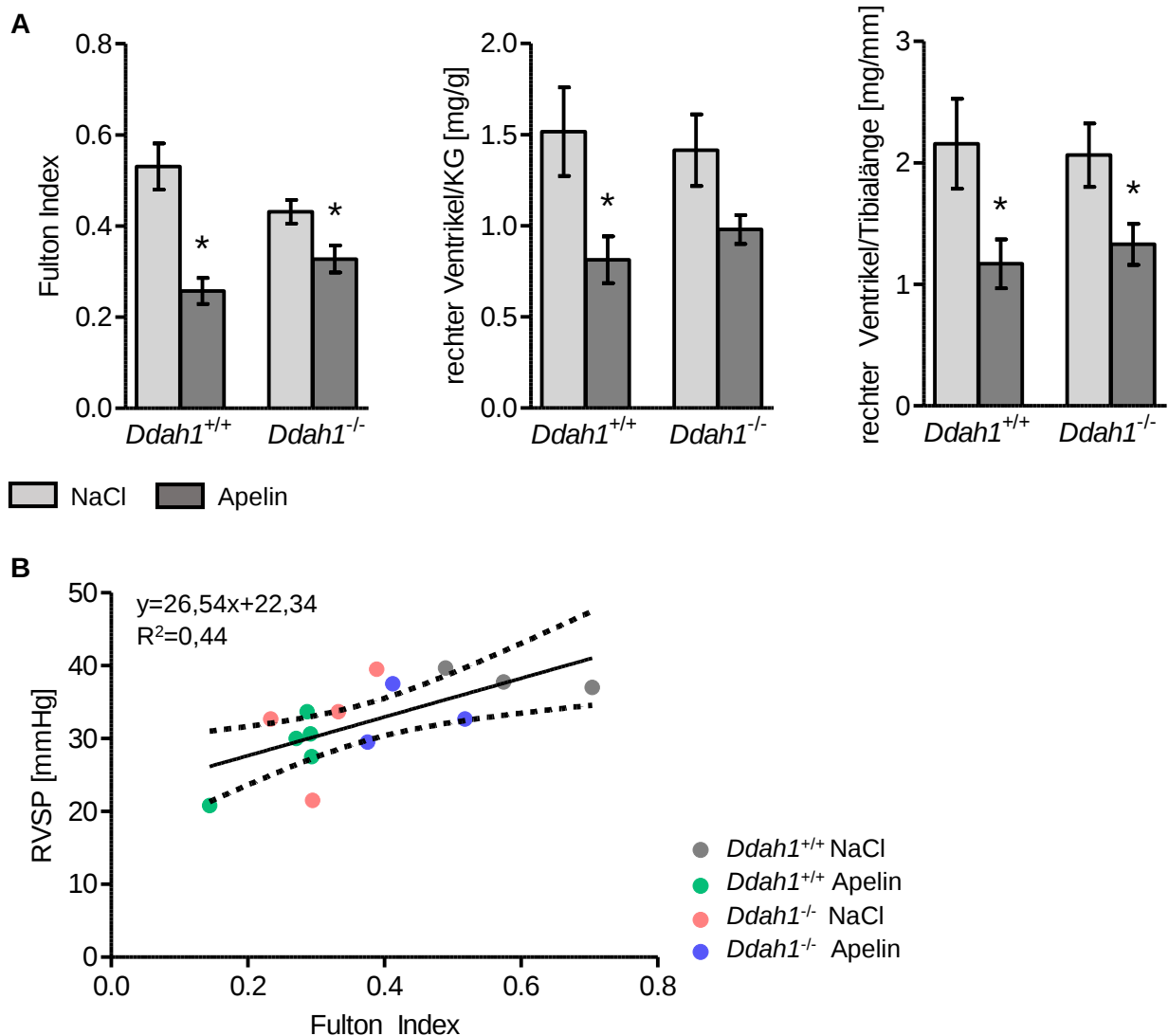


Abbildung 4.36: Rechtsherzhypertrophie-Indices in Apelin- und NaCl-supplementierten Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen unter Hypoxie-Exposition. Die Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}) und *Ddah1*-defizienten Mäuse (*Ddah1*^{-/-}) wurden unter hypoxischen Bedingungen gehalten und erhielten eine kontinuierliche Applikation von Apelin (2 mg/kg KG·d) oder Natriumchlorid (NaCl). **A.** Es wurde der Fulton Index berechnet und das Gewicht des rechten Ventrikels auf das Körpergewicht (KG) und die Tibiallänge der Tiere bezogen. **B.** Korrelation zwischen dem mittleren rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSP) und dem Fulton Index. Die Daten sind als MW±SEM dargestellt. n=5; *p<0,05 vs. NaCl; zweiseitiger t-Test.

Wie bereits von Lan und Kollegen gezeigt, zeigten die Tiere, die einen Hypoxie-induzierten PAH-ähnlichen Phänotyp aufwiesen, eine gesteigerte Rechtsherzhypertrophie (Lan et al. 2015). Anschließend wurde analysiert, ob eine Apelin-Supplementation der Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie entgegenwirken kann. Die Berechnungen der Rechtsherzhypertrophie-Indices zeigten, dass eine vierwöchige Apelin-Verabreichung eine Rechtsherzhypertrophie in Wildtyp-Mäusen reduziert (Abbildung 4.36). Durch Apelin-Supplementation konnten der Fulton-Index und das Verhältnis des Gewichtes des rechten Ventrikels und der Tibiallänge in den Wildtyp- und den *Ddah1*-defizienten Tieren

reduziert werden. Bezog man das Gewicht des rechten Ventrikels auf das Körpergewicht der Mäuse, so konnte eine Reduktion der Rechtsherzhypertrophie-Indices nur in den genetisch unveränderten Tieren nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte die Korrelation des RVSP und des Fulton Index, dass ein gesteigerter Fulton-Index mit einem erhöhten RVSP einhergeht.

Die immunhistochemische Färbung von kardialen Querschnitten mithilfe eines Dystrophin-Antikörpers machte die Muskelfasermembranen der Kardiomyozyten sichtbar, sodass die Fläche der einzelnen Zellen ermittelt werden konnte. Die Analysen zeigten, dass die durch Hypoxie-Exposition hervorgerufene Rechtsherzhypertrophie durch Apelin-Supplementation reduziert werden konnte. Verglichen mit den Kardiomyozyten der NaCl-behandelten Kontrollgruppe, konnte sowohl die Zellfläche der Kardiomyozyten im rechten Ventrikel als auch im linken Ventrikel und Septum durch Apelin-Behandlung reduziert werden. Bildete man das Verhältnis aus der Zellfläche der Kardiomyozyten des rechten Ventrikels und denen des linken Ventrikels und Septum, so konnte eine reduzierte Rechtsherzhypertrophie in den Wildtyp-Tieren, nicht aber in ihren *Ddah1*-defizienten Geschwistern nachgewiesen werden. In den NaCl-supplementierten *Ddah1*-defizienten Tieren wurde im Vergleich zu den genetisch unveränderten Tieren ein reduziertes Verhältnis vom rechten zum linken Ventrikel und Septum gezeigt (Abbildung 4.37).

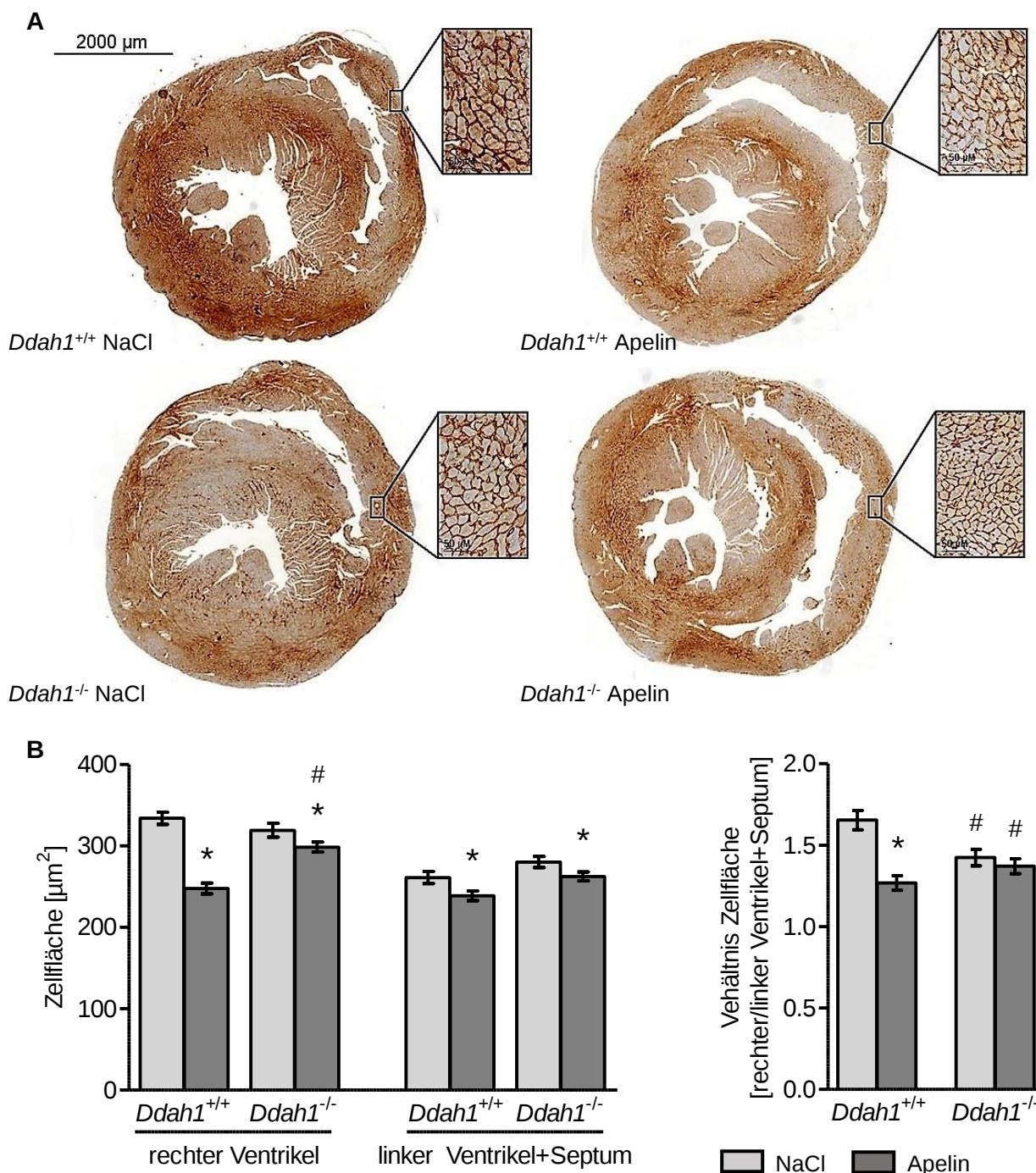


Abbildung 4.37: Kardiomyoztengröße im rechten Ventrikel von Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen nach vierwöchiger Apelin- oder NaCl-Supplementation. Querschnitte des rechten Herzens von *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}) und ihren Wildtyp-Geschwistern (*Ddah1*^{+/+}), die Apelin mg/kg KG·d) oder eine Natriumchlorid-Lösung (NaCl) über vier Wochen verabreicht bekamen. Die Schnitte wurden mittels Dystrophin-Antikörper immunhistochemisch angefärbt. **A.** Beispielhafte kardiale Querschnitte aus allen vier Versuchsgruppen. **B.** Quantitative Auswertung der Kardiomyozytenfläche und das Verhältnis der Zellfläche des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel und Septum. Dargestellt sind die MW±SEM. n=400 Zellen aus jeweils vier Tieren; *p<0,05 vs. NaCl; #p<0,05 vs. Wildtyp; zweiseitiger t-Test.

4.1.2.4 Pulmonale Gefäß- und Alveolarveränderungen

Wie bereits in Abschnitt 4.1.2.2.5 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass der Hypoxie-induzierte PAH-ähnliche Phänotyp mit Veränderungen der Pulmonalstruktur einhergeht. So konnte mittels histologischer Analysen eine Hypoxie-vermittelte gesteigerte Intima-Mediadicke nachgewiesen werden, während die Adventitiadicke unbeeinflusst blieb. Weiterhin konnte eine Hypoxie-Exposition mit einer verstärkten Muskularisierung und einer Rarefizierung kleiner pulmonaler Gefäße assoziiert werden. Im Folgenden wurden die Lungenschnitte der Apelin- und NaCl-supplementierten Mäuse mittels Elastika-van-Gieson-Trichrom-Färbung analysiert (Abbildung 4.38). Die elastischen Strukturen wurden violett, das Muskelgewebe gelb und Kollagenfasern rot angefärbt, sodass Intima-Media und Adventitia differenziert werden konnten, um die jeweilige Ausprägung zu analysieren.

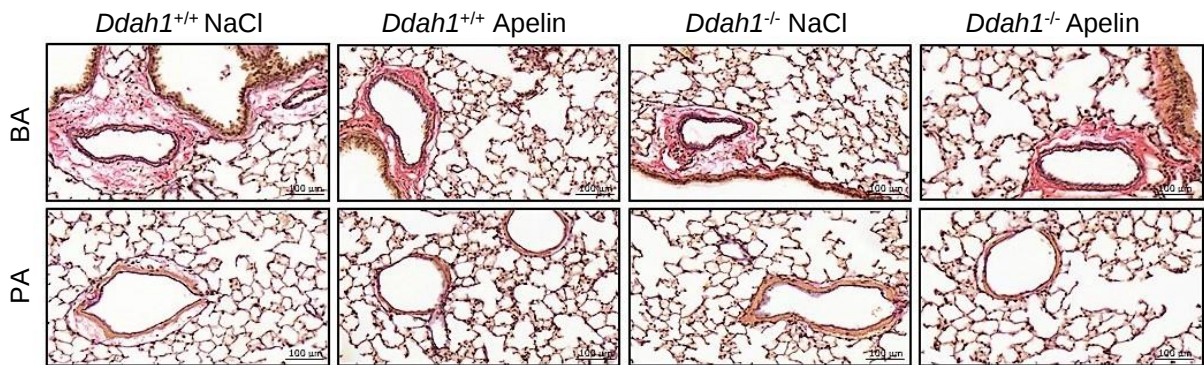


Abbildung 4.38: Histologische Färbung von pulmonalen Gefäßen hypoxischer Apelin- und NaCl-supplementierter Tiere mittels Elastika-van-Gieson-Färbung. Dargestellt ist eine beispielhafte histologische Elastika-van-Gieson-Färbung der Pulmonal (PA)- und Bronchialarterien (BA) von Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}) und *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}), denen Apelin (2 mg/kg KG·d) oder Natriumchlorid-Lösung (NaCl) über vier Wochen verabreicht wurde. d, Tag; *Ddah*, Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase; kg, Kilogramm; KG, Körpergewicht; mg, Milligramm.

Im Rahmen der Analyse der Intima-Media- und Adventitiadicke konnte in der Gruppe der Wildtyp-Tiere gezeigt werden, dass eine Apelin-Supplementation die Ausprägung der Intima-Media innerhalb der Pulmonalarterien reduziert (Abbildung 4.39). Dieser Effekt konnte in den Bronchialarterien nicht nachgewiesen werden. Auch die *Ddah1*-defizienten Tieren zeigten keine Veränderungen der Intima-Mediadicke. Die Adventitiadicke blieb durch Apelin-Behandlung innerhalb aller Versuchsgruppen unbeeinflusst.

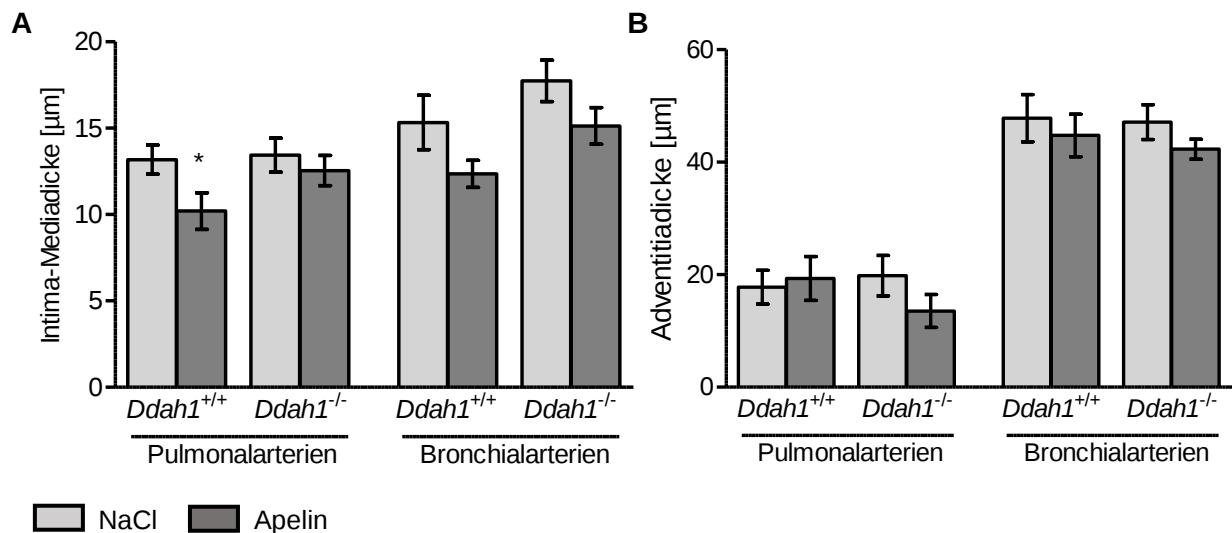


Abbildung 4.39: Intima-Media- und Adventitiadicke der Pulmonal- und Bronchialarterien in Apelin- und NaCl-supplementierten Tieren. Die Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}) und *Ddah1*-defizienten (*Ddah1*^{-/-}) Tiere wurden unter Hypoxie-Exposition gehalten und mit Apelin- (2 mg/kg KG·d) oder Natriumchlorid (NaCl) supplementiert. **A.** Auswertung der Elastika-van-Gieson-Färbung durch Ermittlung der Intima-Media- und **B.** Adventitiadicke der Pulmonal- und Bronchialarterien. Die Werte sind als MW±SEM dargestellt. n=7; *p<0,05 vs. NaCl; zweiseitiger t-Test.

Die Lungenschnitte wurden außerdem mit einer histologischen HE-Übersichtsfärbung angefärbt, um die Alveolarstruktur zu analysieren. Die immunhistochemischen Färbungen mittels Antikörper gegen CD31 und α-SMA dienten der Detektion von kleinen pulmonalen Gefäßen (CD31) und der Analyse des Muskularisierungsgrades der Gefäße (α-SMA, Abbildung 4.40).

A

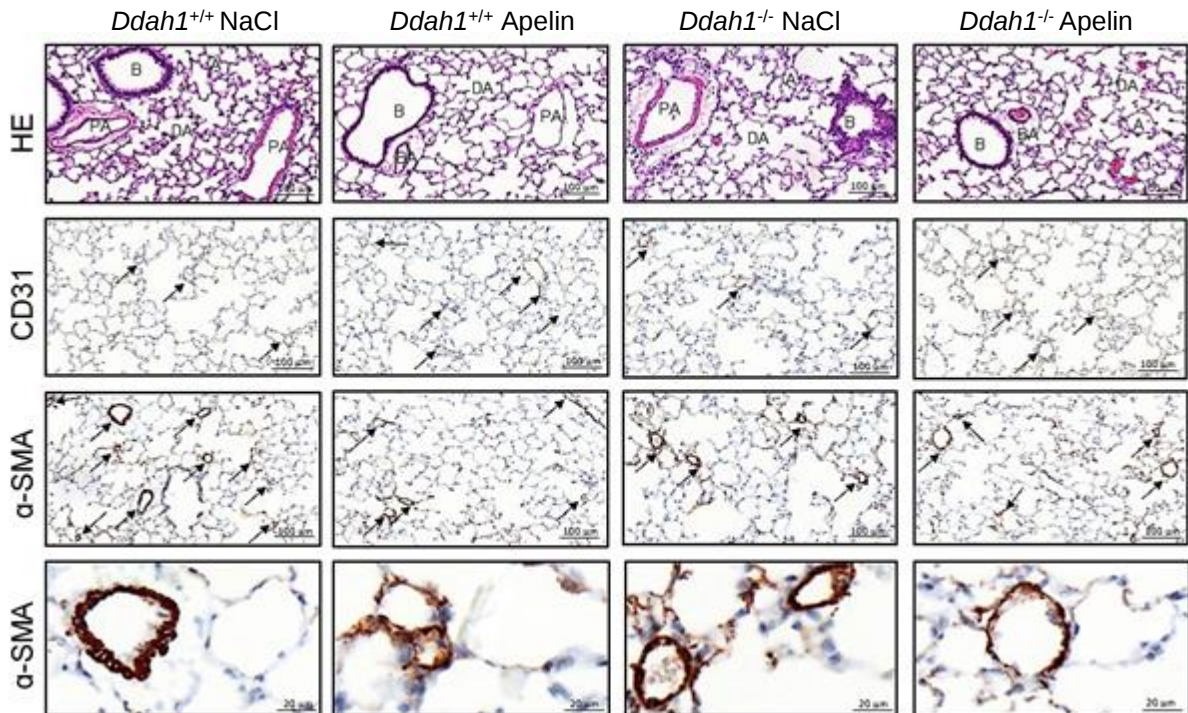


Abbildung 4.40: Histologische Färbungen zur Ermittlung pulmonaler Gefäß- und Strukturveränderungen durch Supplementation von Apelin in hypoxischen Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen. Die Mäuse wurden über vier Wochen mit Natriumchlorid (NaCl) oder Apelin (2 mg/kg KG·d) supplementiert. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE; oben, 20-fache Vergrößerung) zeigt eine Übersichtsfärbung der Gefäß- und Alveolarstruktur. Anhand immunohistochemischer Färbungen mittels Antikörper gegen *cluster of differentiation* (CD) 31 (2. von oben, 20-fache Vergrößerung) und *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA; 3. von oben, 20-fache Vergrößerung; unten, 50-fache Vergrößerung eines isolierten Gefäßes) wurden endotheliale Strukturen (CD31) sowie der Muskularisierungsgrad der Gefäße (α -SMA) detektiert. Die Pfeile zeigen die angefärbten Gefäße. A, Alveole; B, Bronchus; BA, Bronchialarterie; DA, *Ductus Alveoli*; PA, Pulmonalarterie.

Die Färbung spezifischer Strukturen mittels Antikörper gegen CD31 und α -SMA zeigte, dass die subkutane Verabreichung von Apelin sowohl die Anzahl als auch den Muskularisierungsgrad der pulmonalen Gefäße pro 100 Alveolen beeinflusst. Durch die Applikation von Apelin wurde der Anteil unmuskularisierter Gefäße in Wildtyp-Tieren erhöht, während der Anteil der voll und teilweise muskularisierten Gefäße unverändert blieb. In den *Ddah1*-defizienten Mäusen konnte eine Reduktion der voll muskularisierten Gefäße gezeigt werden. Außerdem wurde durch die Supplementation des Verums die Anzahl der Gefäße pro 100 Alveolen in Wildtyp-Mäusen und *Ddah1*-defizienten Mäusen im Vergleich zur NaCl-Gruppe erhöht. Vom Genotyp abhängige Unterschiede konnten ebenfalls festgestellt werden. Die NaCl-supplementierten *Ddah1*-defizienten Mäuse wiesen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern einen gesteigerten Anteil muskularisierter Gefäße auf. Die

HE-Übersichtsfärbung zeigte anhand der Ermittlung des RAC, dass eine Apelin-Applikation genotypunabhängig die Alveolarstruktur nicht beeinflusst.

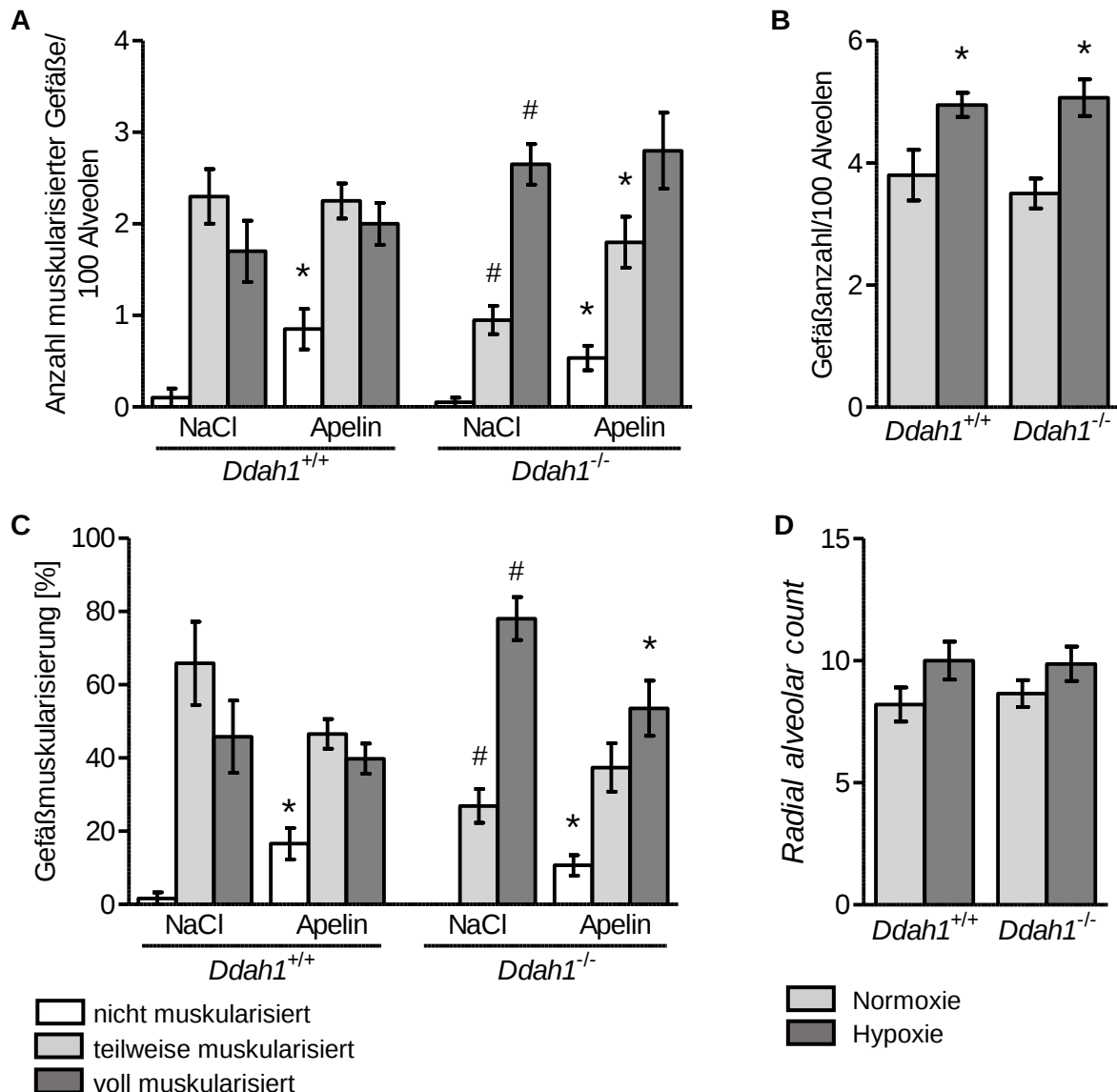


Abbildung 4.41: Pulmonale Gefäßmuskularisierung und -rarifizierung in Apelin- und NaCl-behandelten Mäusen unter Hypoxie-Exposition. Die Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE) stellt die pulmonale Gefäß- und Alveolarstruktur dar. Immunhistochemische Färbungen mittels Antikörper gegen *cluster of differentiation* (CD) 31 und *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) zeigten endotheliale Strukturen (CD31) und den Muskularisierungsgrad pulmonaler Gefäße (α -SMA). Es wurden Wildtyp- und *Ddah1*-defiziente Tiere analysiert, die mit Natriumchloridlösung (NaCl) oder Apelin (2mg/kg KG) behandelt wurden. **A.** Einteilung der Gefäße in nicht-, teilweise- und voll muskularisierte Gefäße pro 100 Alveolen. **B.** Gesamtanzahl der Gefäße pro 100 Alveolen, ermittelt mithilfe der CD31-Färbung. **C.** Prozentualer Anteil nicht muskularisierter, teilweise muskularisierter und voll muskularisierter Gefäße bezogen auf die Anzahl der Gefäße pro 100 Alveolen. **E.** Der *Radial alveolar count* beschreibt die Anzahl der Alveolen in einem definierten Abschnitt. n=15 Lungenabschnitte aus je drei Tieren, dargestellt als MW $\pm$ SEM *p<0,05 vs. NaCl; #p<0,05 vs. *Ddah1*^{+/+}; zweiseitiger t-Test.

Wie bereits beschrieben, sind Proliferations- und Migrationsprozesse eine Ursache für pulmonale Gefäßveränderungen, die durch Muskularisierung und eine vermehrte Synthese von Bindegewebsstrukturen charakterisiert sind. Dass der Hypoxie-induzierte PAH-ähnliche Phänotyp mit einer gesteigerten *Col4a1* Expression einhergeht, konnte in Abschnitt 4.1.5.5 gezeigt werden. Mittels quantitativer PCR aus Lungenhomogenaten der Tiere, die mit Apelin oder NaCl supplementiert wurden, wurde die *Col4a1* mRNA Expression analysiert. Eine vierwöchige Apelin-Behandlung führte in Wildtyp-Mäusen zu einer reduzierten *Col4a1* mRNA Expression.

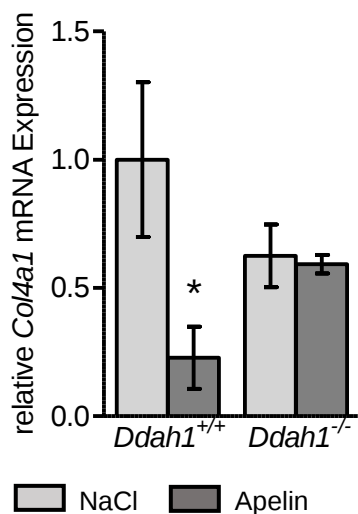


Abbildung 4.42: Pulmonale *Col4a1* mRNA Expression in Apelin-supplementierten Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Tieren. Die quantitative Analyse der Kollagen IV Typ alpha (*Col4a1*) mRNA Expression erfolgte mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion aus dem Lungenhomogenat von Natriumchlorid- (NaCl) oder Apelin-supplementierten (2 mg/kg KG·d) Wildtyp- (*Ddah1*^{+/+}) und *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}). Die Expression wurde auf das Ribosomale Protein L13A relativiert, mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet und auf die *Col4a1* mRNA Expression der NaCl-behandelten Wildtyp-Tiere normiert. Die graphische Darstellung beruht auf MW $\pm$ SEM. n=5; *p<0,05 vs. NaCl; zweiseitiger t-Test.

Eine vierwöchige subkutane Apelin-Applikation reduzierte die *Col4a1* mRNA Expression in Wildtyp-Mäusen. In der Gruppe der *Ddah1*-defizienten Tiere konnte kein Unterschied zwischen den Apelin- und NaCl-supplementierten Mäusen festgestellt werden. Auch abhängig vom Genotyp war keine Veränderung in der *Col4a1* Expression nachzuweisen.

4.2 Untersuchungen des PI3K/AKT-Signalweges

Da der Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B- (PI3K/AKT) Signalweg häufig mit der Regulation durch Apelin assoziiert wird, wurde die Phosphorylierung beteiligter Proteine analysiert. Es wurden HPMEC, kultiviert unter Normoxie- und Hypoxie-Exposition, untersucht.

4.2.1 Beeinflussung des PI3K/AKT-Signalweges durch Hypoxie

Die Zellkulturüberstände von HPMEC, kultiviert unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen, wurden mittels PathScan® Akt Signaling Antibody Array Kit analysiert. Durch Chemilumineszenzanalyse konnte die Hypoxie-bedingte Veränderung der Phosphorylierung von Proteinen, die eine Rolle in diesem Signalweg spielen, analysiert werden.

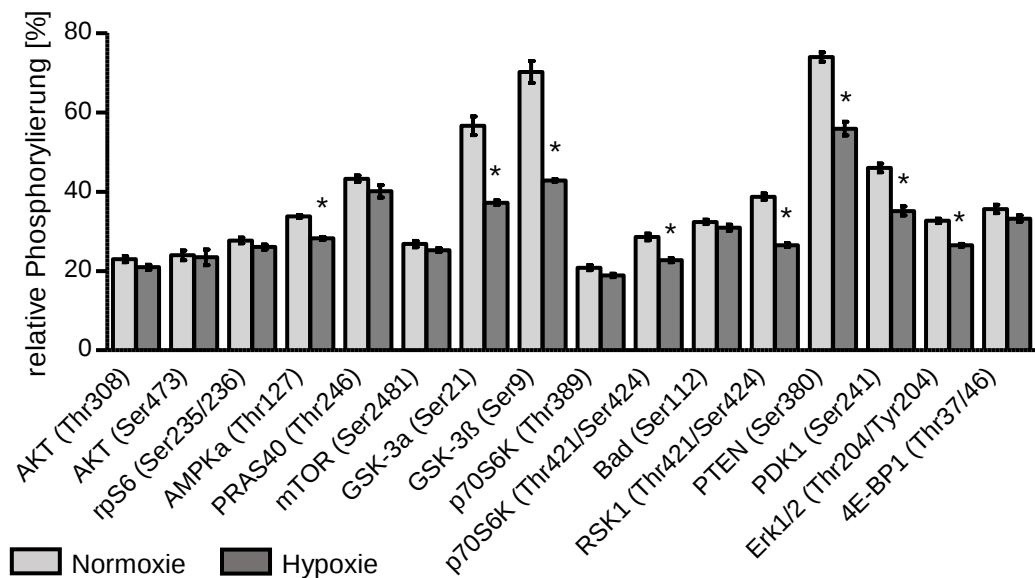


Abbildung 4.43: Hypoxie-bedingte veränderte Phosphorylierung einzelner Proteine des PI3K/AKT-Signalweges in HPMEC. Die Analyse erfolgte mittels PathScan® Akt Signaling Antibody Array Kit durch Chemilumineszenz-Detektion. Dargestellt sind $MW \pm SEM$, bezogen auf die Positivkontrolle. $n=4$; $*p<0,05$; zweiseitiger t-Test. 4E-BP, *eukaryotic initiation factor 4E*; AKT=PKB, Proteinkinase B; AMPK, AMP-aktivierte Proteinkinase; Bad, *B-cell lymphoma 2-associated death promotor*; ERK, *extracellular-signal Regulated Kinase*; GSK, Glykogensynthase-Kinase; mTOR, *mechanistic target of rapamycin*; p70S6K, ribosomale Protein S6 Kinase; PDK, PI3-abhängige Proteinkinase; PI3, Phosphoinositid-3; PRAS40, Prolin-reiches AKT-Substrat 40 Kilodalton; PTEN, *Phosphatase and Tensin homolog*; rpS6, ribosomales Protein S6; RSK, Ribosomale Protein S6 Kinase; . Abkürzungen der Aminosäuren, siehe Abkürzungsverzeichnis.

Die Analyse konnte zeigen, dass eine Hypoxie-Behandlung von HPMEC in einer Beeinflussung des PI3K/AKT-Signalweges resultiert. Die Phosphorylierung der Proteine AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)- α , Glykogensynthase-Kinase (GSK)-3 α und - β , ribosomale Protein S6 Kinase (P70S6K), *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN), PI3-abhängige Proteinkinase (PDK) 1 und *extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK) 1/2 wurde durch eine Hypoxie-Exposition reduziert.

4.2.1.1 Beeinflussung des PI3K/AKT-Signalweges durch Apelin

Dass Apelin den PI3K/AKT-Stoffwechselweg beeinflusst, konnten bereits Masri und Kollegen zeigen (Masri *et al.* 2004). In Abschnitt 4.2.1 wurde gezeigt, dass eine Hypoxie-Exposition die Phosphorylierung einiger Proteine reduziert, welche am PI3K/AKT-Signalweg beteiligt sind. Um den Einfluss von Apelin in diesem Zusammenhang zu untersuchen, wurde der Überstand von unbehandelten und mit Apelin-inkubierten HPMEC mittels PathScan® Akt Signaling Antibody Array Kit untersucht.

Die Analyse zeigte, dass unter normoxischen Bedingungen, die Phosphorylierung der Proteine AMPK α , Prolin-reiches AKT-Substrat 40 Kilodalton (PRAS40), GSK-3 α und - β , p70S6K (Thr421/Ser424), *B-cell lymphoma 2-associated death promoter* (Bad), Ribosomale Protein S6 Kinase (RSK) 1, PTEN und PDK1 durch eine Behandlung mit Apelin gesteigert wird. Unter hypoxischen Bedingungen konnte eine apelinabhängige gesteigerte Phosphorylierung von mTOR, GSK-3 und p70S6K (Thr421/Ser424) gezeigt werden. Die Phosphorylierung durch Apelin-Behandlung unter normoxischen Bedingungen ist im Vergleich zu den unter Hypoxie kultivierten Zellen stärker ausgeprägt (Abbildung 4.44).

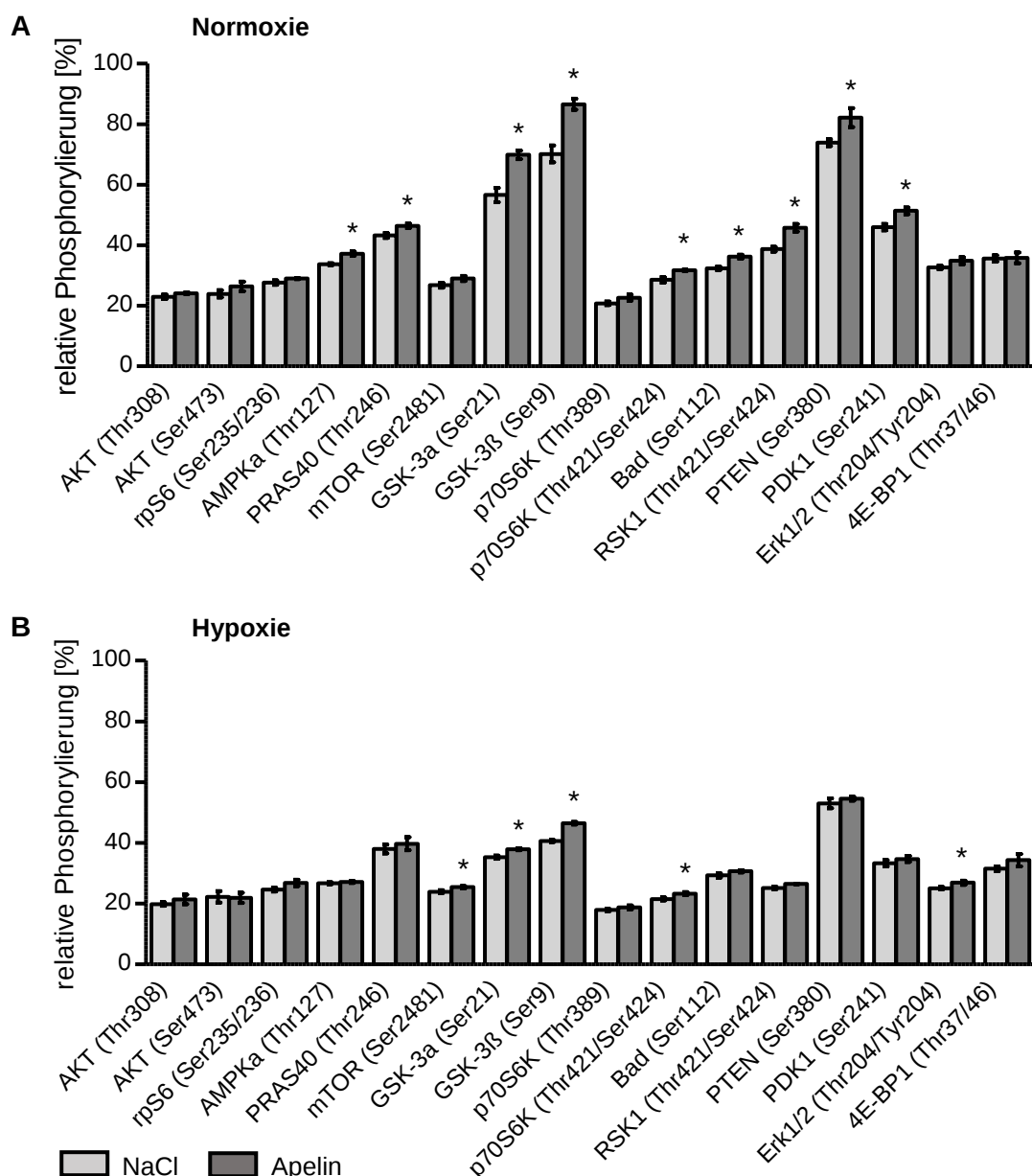


Abbildung 4.44: Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/AKT-Signalweges nach Apelin-Inkubation von HPMEC unter Normoxie- und Hypoxie-Exposition. Unstimulierte und mit Apelin (10 pmol/L, 6 hrs) behandelte Zellen wurden mittels PathScan® Akt Signaling Antibody Array Kit analysiert. Die Phosphorylierung der Proteine ist als $MW \pm SEM$ dargestellt und auf die Positivkontrolle relativiert. $n=4$; $*p<0,05$; zweiseitiger t-Test. 4E-BP, *eukaryotic initiation factor 4E*; AKT, Proteinkinase B; AMPK, AMP-aktivierte Proteinkinase; Bad, *B-cell lymphoma 2-associated death promotor*; ERK, *extracellular-signal Regulated Kinase*; GSK, Glykogensynthase-Kinase; mTOR, *mechanistic target of rapamycin*; p70S6K, ribosomale Protein S6 Kinase; PDK, PI3-abhängige Proteinkinase; PI3(K), Phosphoinositid-3(-Kinase); PRAS40, Prolin-reiches AKT-Substrat 40 Kilodalton; PTEN, *Phosphatase and Tensin homolog*; rpS6, ribosomales Protein S6; RSK, Ribosomale Protein S6 Kinase; Abkürzungen der Aminosäuren, siehe Abkürzungsverzeichnis.

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Apelin auf den PI3K/AKT-Stoffwechselweg wurde mittels eines unspezifischen GSK-Inhibitors (GSKI) die GSK-3 in HPMEC gehemmt und die mRNA Expression der *DDAH1* und *2* analysiert. Weiterhin wurden die ADMA-Konzentrationen im Zellkulturüberstand der Zellen gemessen.

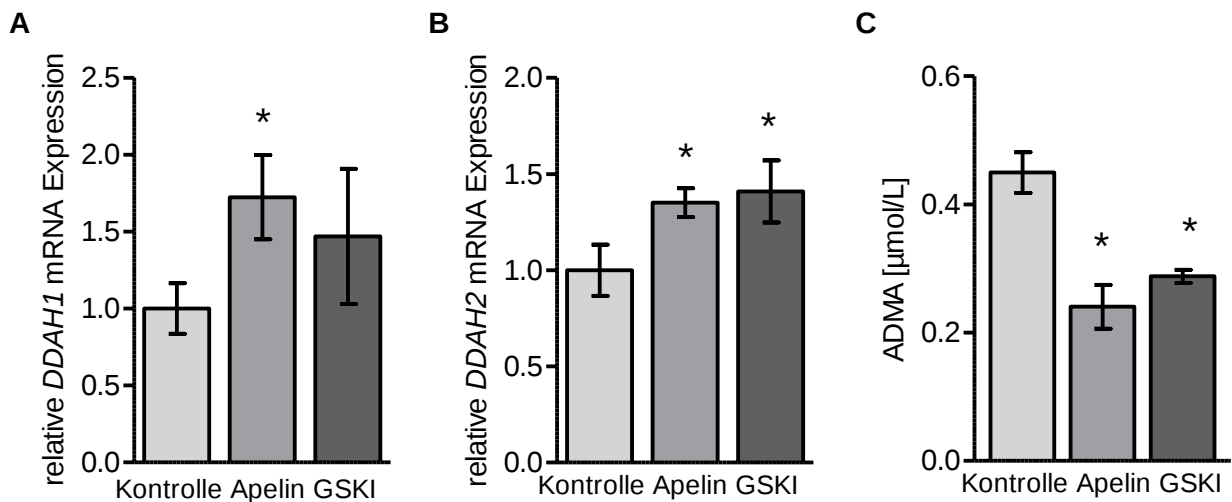


Abbildung 4.45: *DDAH* mRNA Expression und ADMA-Konzentrationen im Zellkultur-Überstand von HPMEC nach GSK3-Inhibition. A. Humane Pulmonale Mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC) wurden mit Apelin (10 pmol/L, 6 hrs) oder einem GSK3-Inhibitor (GSKI; 50 $\mu\text{mol/L}$, 6 hrs) behandelt und die mRNA Expression der *DDAH1* und B. *DDAH2* wurde analysiert. C. Die ADMA-Konzentrationen wurden im Zellkulturüberstand mittels LC-MS/MS-Analyse gemessen. Dargestellt sind MW $\pm$ SEM; n=6; *p<0,05 vs. Kontrolle; zweiseitiger t-Test. GSK(I), Glykogensynthase-Kinase (Inhibitor).

Eine Apelin-Behandlung (10 pmol/L, 6 hrs) von HPMEC resultierte, wie bereits in Abschnitt 4.1.1.2.2 gezeigt, in einer gesteigerten Expression der *DDAH1* und *DDAH2* sowie in reduzierten ADMA-Konzentrationen im Zellkulturüberstand. Eine GSK-Inhibition zeigte eine gesteigerte *DDAH2* mRNA Expression. Die *DDAH1* mRNA Expression wurde durch eine Inkubation mit GSKI nicht beeinflusst. Die ADMA-Konzentrationen im Zellkulturüberstand der GSKI-inkubierten HPMEC waren im Vergleich zu den unbehandelten Zellen reduziert (Abbildung 4.45).

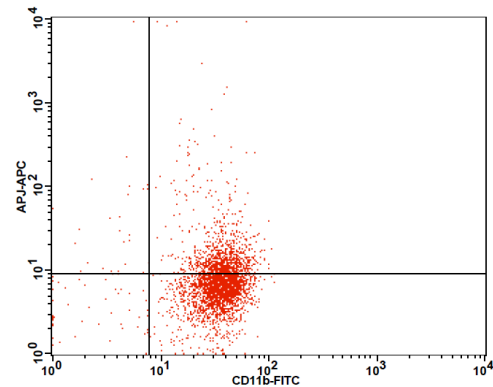
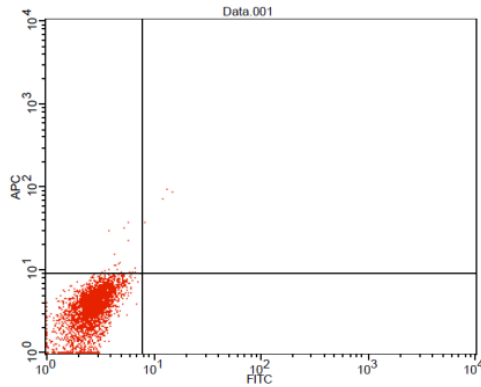
4.3 Apelinabhängige Immunmodulation in M2-Makrophagen

Mit Apelin konnten bereits pleiotrope Effekte assoziiert werden, sodass neben dem endothelialen Modell auch der Effekt von Apelin in Makrophagen untersucht werden sollte. Da eine PAH mit inflammatorischen Prozessen assoziiert wird und dabei das Mononukleär-phagozytäre System eine wichtige Rolle spielt, wurden aus dem Blut erkrankter Patienten sowie gesunder Probanden mononukleäre Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert und durch Zugabe von *Macrophage Colony-stimulating factor* (M-CSF; 1 ng/mL) und Interleukin-4 (IL-4; 20 ng/mL) zu M2-Makrophagen differenziert und polarisiert. Die Analyse zur Überprüfung des Makrophagen-Phänotyps ist in den ergänzten Daten (Abschnitt 8.1) dargestellt.

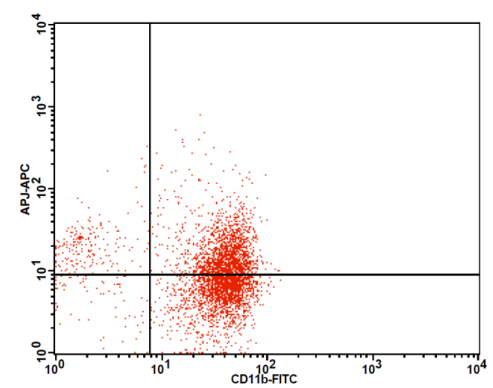
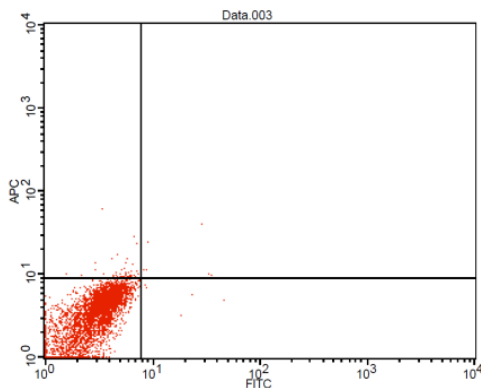
4.3.1 Regulation des Apelin-Rezeptors

Die Expression von *APLNR* auf der Oberfläche von *ex vivo* generierten Makrophagen wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS; *Fluorescence Activated Cell Sorting*) bestimmt. Die PAH-Patienten zeigten, verglichen mit gesunden Probanden, eine verstärkte Expression von *APLNR* auf der Oberfläche von *ex vivo* generierten M2-Makrophagen (Abbildung 4.46).

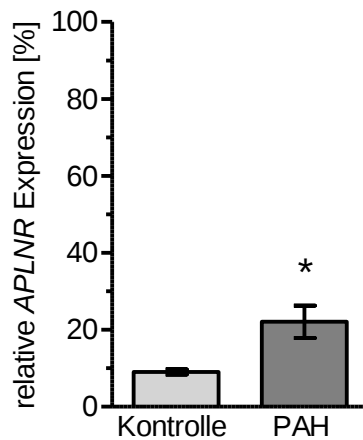
A Gesunder Proband



B PAH-Patient



C



D

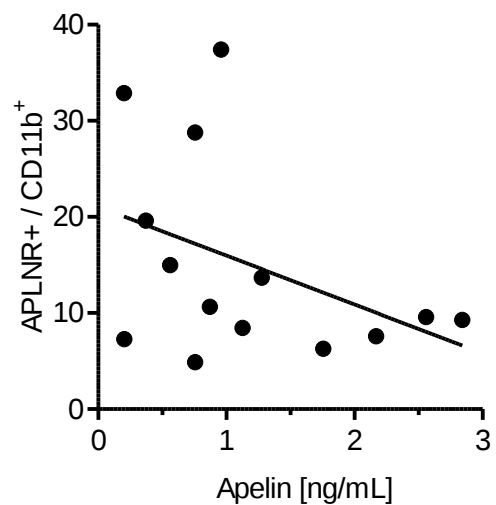


Abbildung 4.46: Expression des Apelin-Rezeptors (APLNR) auf der Oberfläche von M2-Makrophagen von PAH-Patienten und gesunden Probanden. Der APLNR wurde mittels Allophycocyanin- (APC) konjugierter Antikörper markiert und mithilfe von Durchflusszytometrie bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch Relativierung auf die Expression von *cluster of differentiation* (CD) 11b, die mittels Fluorescein-Isothiocyanat- (FITC) gekoppeltem Antikörper markiert wurden. **A.** APLNR- und CD11b-positive M2-Makrophagen gesunder Probanden und **B.** PAH-Patienten. **C.** Prozentuale Auswertung von APLNR und CD11b-exprimierenden Zellen. n=9-10, dargestellt als MW±SEM; *p<0,05 vs. Kontrolle; zweiseitiger t-Test. **D.** Korrelation zwischen APLNR-Expression auf M2-Makrophagen CD11b-positiver (CD11b⁺) Zellen und der Apelin-Plasmakonzentration von PAH-Patienten.

4.3.2 Zytokin-Expression

Da die Pathogenese einer PAH weiterhin mit einer gesteigerten Expression von Zytokinen einhergeht, wurde im Überstand der *ex vivo* generierten M2-Makrophagen die Konzentration proinflammatorischer Zytokine mittels *Human Cytokine Array Kit Panel A* analysiert. Die Zellkulturüberstände der Makrophagen erkrankter Patienten zeigten erhöhte Zytokin-Konzentrationen im Vergleich zu Zellen, die aus dem Blut gesunder Probanden isoliert wurden. Die Makrophagen wurden mit Apelin behandelt und die Zytokinkonzentration wurde im Zellkulturüberstand gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Apelin eine Reduktion im proinflammatorischen Zytokin-Profil hervorruft (Abbildung 4.47).

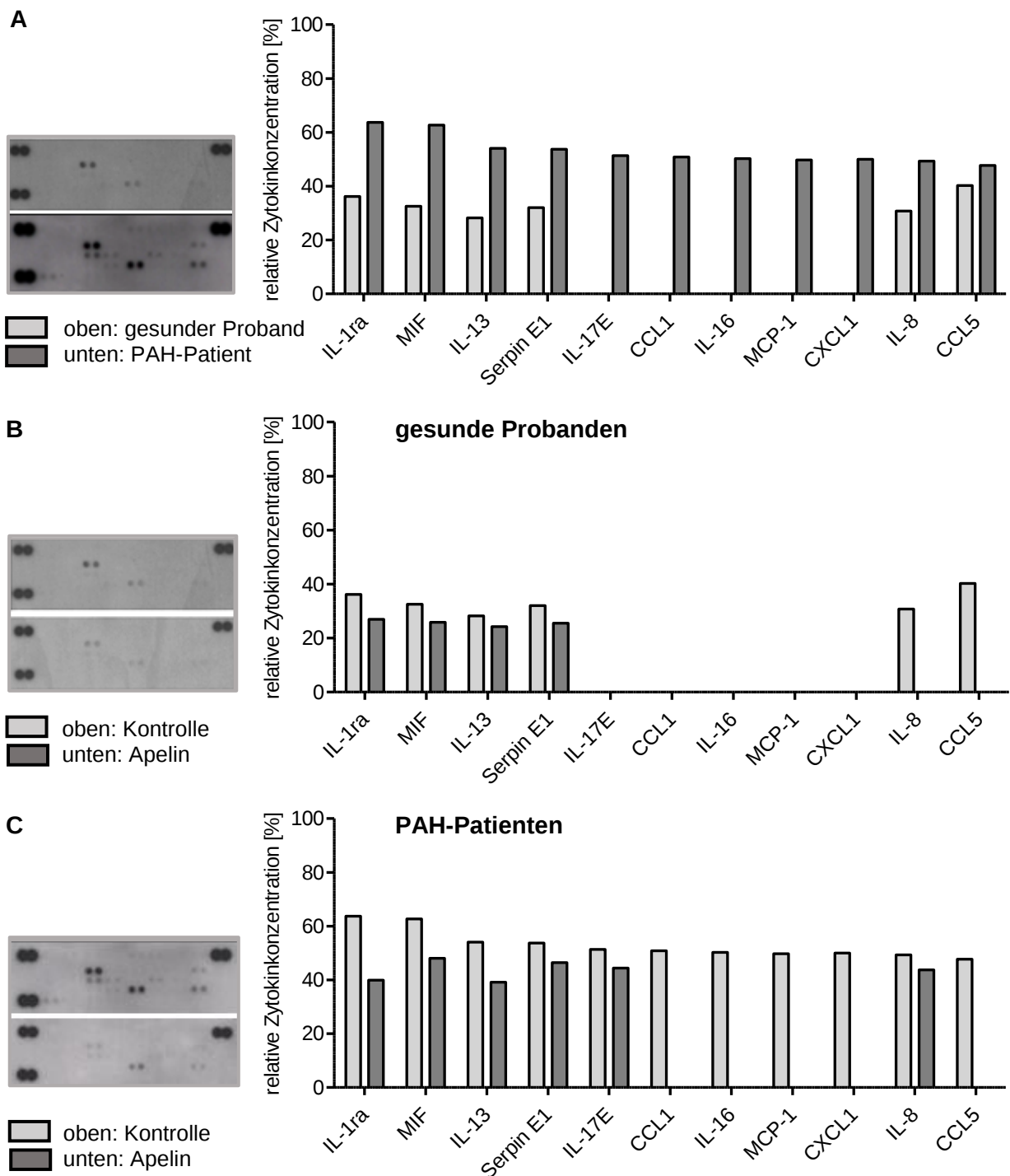


Abbildung 4.47: Profil von sezernierten Zytokinen, gemessen im Zellkulturüberstand *ex vivo* generierter M2-Makrophagen. **A.** Im Überstand von M2-Makrophagen gesunder Probanden und PAH-Patienten wurde die Zytokin-Expression mittels *Human Cytokine Array Kit Panel A* gemessen. **B.** Die Makrophagen gesunder Probanden und **C.** PAH-Patienten wurden mit Apelin behandelt (10 pmol/L, 6 hrs), die Zytokinexpression wurde untersucht und durch Chemilumineszenz-Detektion analysiert. Die Überstände wurden gepoolt und der MW $\pm$ SEM von technischen Replikationen des Versuches, relativiert auf die Positivkontrolle, dargestellt. n=4. IL, Interleukin; CCL, CC-Chemokinligand; CXCL, CXC-Chemokinligand; MCP, Makrophagen-Chemoattraktorprotein; MIF, *Macrophage Migration Inhibitory Factor*.

Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde die mRNA Expression der Zytokine IL-13, IL-16 und CXCL1 in ex vivo generierten M2-Makrophagen untersucht.

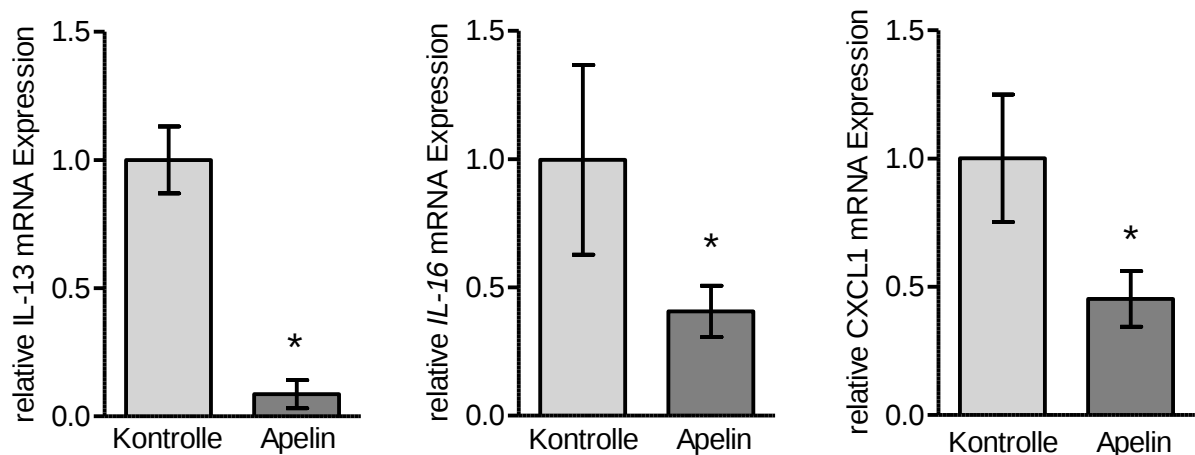


Abbildung 4.48: IL-13, IL-16 und CXCL1 mRNA Expression von Apelin-behandelten ex vivo generierten M2-Makrophagen. Die mononukleären Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Blut von PAH-Patienten isoliert und durch Zugabe von *Macrophage colony-stimulating factor* (1 ng/mL) und Interleukin 4 (20 ng/mL) zu M2-Makrophagen differenziert und polarisiert. Die Zellen wurden mit Apelin inkubiert (10 pmol/L, 6 hrs) und die mRNA Expression von Interleukin 13 (*IL-13*; n=6), Interleukin 16 (*IL-16*; n=18) und CXC-Chemokinligand 1 (*CXCL1*, n=16) wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion analysiert und auf die mRNA Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase bezogen. Die Daten sind als MW±SEM dargestellt und auf die unbehandelten Zellen normiert. *p<0,05; zweiseitiger t-Test.

4.3.3 Kollagen-Metabolismus

Proliferations- und Migrationsprozesse werden als weitere Ursache pulmonaler Gefäßveränderungen, die mit einer Muskularisierung und einer gesteigerten Synthese von Bindegewebsstrukturen charakterisiert sind, assoziiert. Die ex vivo generierten und zu M2-Makrophagen differenzierten und polarisierten mononukleären Zellen wurden mit Apelin behandelt (10 pmol/L, 6 hrs). Im Anschluss wurde mithilfe des Sircol™ Collagen Assays die Konzentration des fibrillären, löslichen Kollagens quantitativ ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Kollagen-Konzentration im Überstand von Makrophagen, die aus dem Blut von PAH-Patienten gewonnen wurden, im Vergleich zu der Kollagenkonzentration des Zellkulturüberstandes von Makrophagen, gewonnen aus dem Blut gesunder Probanden, erhöht war (Abbildung 4.49).

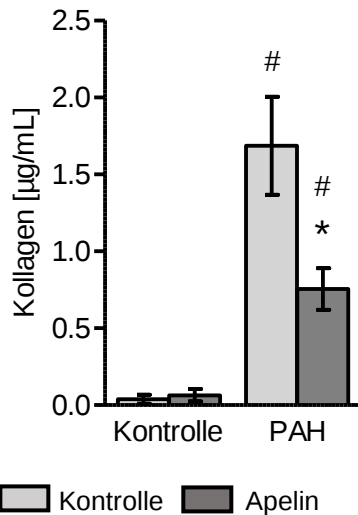


Abbildung 4.49: Kollagen-Konzentrationen im Zellkulturüberstand *ex vivo* generierter M2-Makrophagen nach Apelin-Behandlung. Die Zellen wurden mit Apelin (10 pmol/L, 6 hrs) behandelt und im Anschluss wurde die Kollagen-Konzentration im Überstand mittels Sircol™ Collagen Assay bestimmt. Die Auswertung erfolgte mithilfe einer Standardkurve und anschließender Relativierung auf die Proteinkonzentration der Zellen. Die Werte sind als MW±SEM dargestellt. n=4; *p<0,05 vs. unbehandelt; #p<0,05 vs. Kontrolle; zweiseitiger t-Test.

4.3.4 Analyse von Makrophagen im Tiermodell

In den genetisch unveränderten Tieren, die unter Normoxie und Hypoxie gehalten wurden, und in den hypoxischen Wildtyp-Tieren, welche eine NaCl- oder Apelin-Supplementation erhielten, wurden mittels immunhistochemischer F4/80-Färbung die pulmonalen Makrophagen markiert. Es konnte anhand der Färbung gezeigt werden, dass eine Hypoxie-Exposition zu einer gesteigerten Anzahl an Makrophagen pro 100 Alveolen führt. Eine Supplementation von Apelin über einen Zeitraum von vier Wochen resultierte unter unveränderten Sauerstoffbedingungen in einer reduzierten Makrophagenanzahl (Abbildung 4.50).

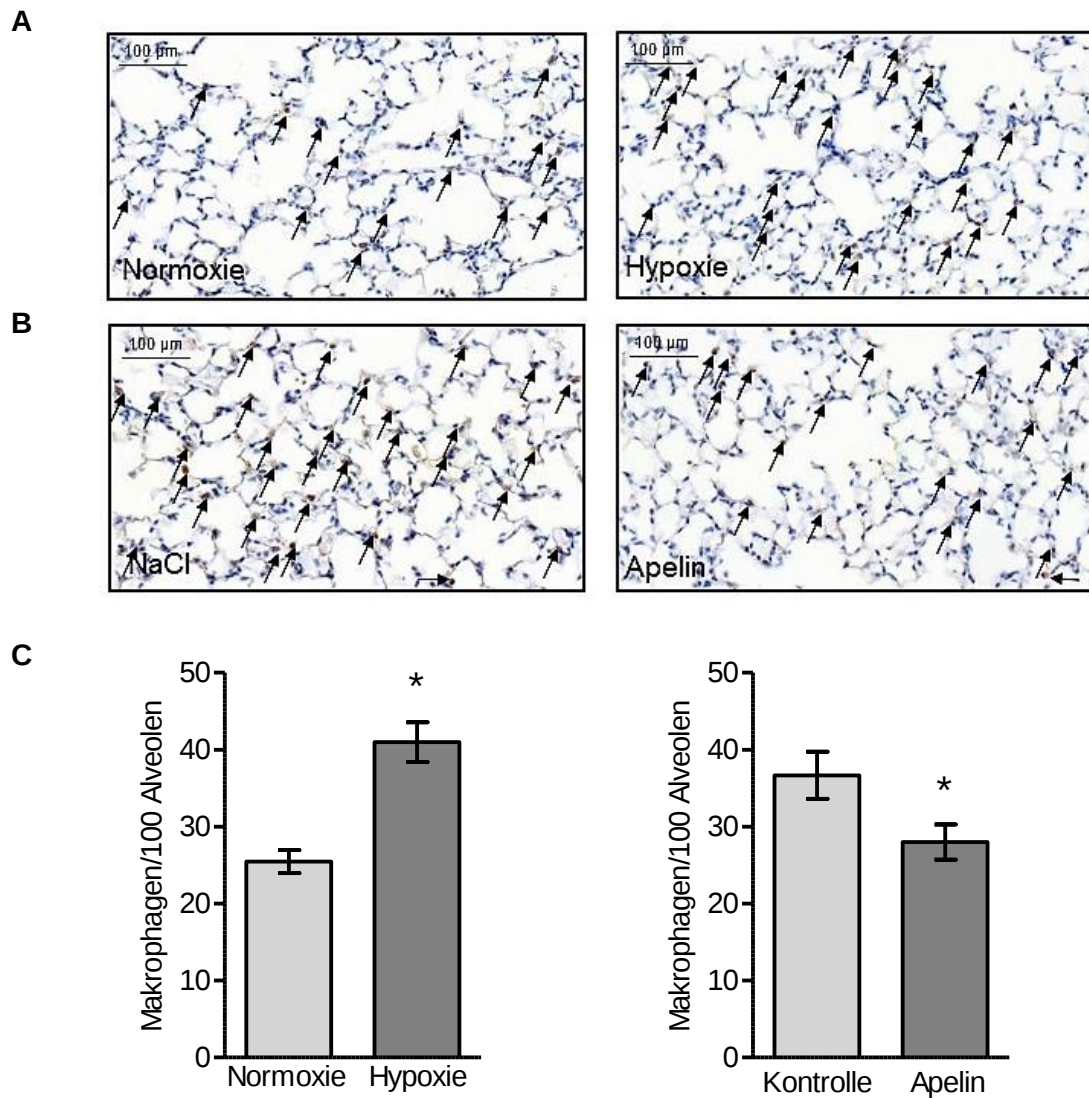


Abbildung 4.50: Immunhistochemische F4/80-Färbung im pulmonalen Gewebe von genetisch unveränderten Mäusen. **A.** Beispielfärbung von F4/80-markierten Makrophagen in einem definierten Lungenabschnitt von 100 Alveolen von Wildtyp-Tieren, die unter Normoxie und Hypoxie gehalten wurden. **B.** Beispielfarbung von Natriumchlorid- (NaCl) und Apelin-supplementierten (2 mg/kg KG·d) Wildtyp-Mäusen. **C.** Quantitative Auswertung der Makrophagenanzahl pro 100 Alveolen. Die Pfeile zeigen die F4/80-angefärbten Makrophagen. n=9 definierte Lungenabschnitte von 100 Alveolen aus jeweils drei Tieren; *p<0,05; zweiseitiger t-Test.

4.3.5 Involvierung des PI3K/AKT-Stoffwechselweges

Da die Wirkweise von Apelin bereits mehrfach mit dem PI3K/AKT-Signalweg assoziiert wurde, sollte untersucht werden, ob dieser Stoffwechselweg weiterhin den Einfluss Apelins auf die Makrophagenfunktion beeinflusst (Masri *et al.* 2004). Mithilfe des PI3K/AKT Pathscans® wurde die Phosphorylierung von Proteinen untersucht, die in diesen Signalweg involviert sind. Zur Analyse wurden sowohl die Zelllysate von unstimulierten M2-Makrophagen verwendet, als auch die Zelllysate von Zellen, die mit Apelin behandelt wurden.

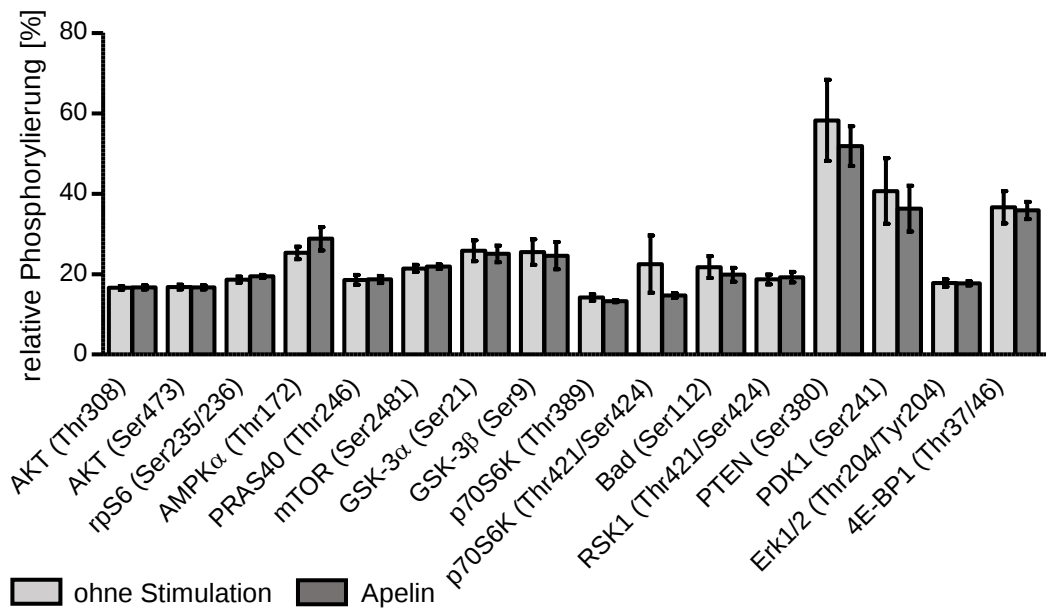


Abbildung 4.51: Relative Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/AKT-Stoffwechselweges in den Zellkulturüberständen unbehandelter und Apelin-behandelter M2-Makrophagen. Die Makrophagen, isoliert aus dem Blut von PAH-Patienten, wurden für 6 Stunden mit Apelin (10 pmol/L) behandelt. Die Analyse erfolgte mithilfe PathScan® Akt Signaling Antibody Array Kit durch Chemilumineszenz-Detektion. Die graphische Darstellung beruht auf MW±SEM. n=8; keine signifikanten Unterschiede. 4E-BP, *eukaryotic initiation factor 4E*; AKT, Proteinkinase B; AMPK, AMP-aktivierte Proteinkinase; Bad, *B-cell lymphoma 2-associated death promotor*; ERK, *extracellular-signal Regulated Kinase*; GSK, Glykogensynthase-Kinase; mTOR, *mechanistic target of rapamycin*; p70S6K, ribosomale Protein S6 Kinase; PDK, PI3-abhängige Proteinkinase; PI3, Phosphoinositid-3; PRAS40, Prolin-reiches AKT-Substrat 40 Kilodalton; PTEN, *Phosphatase and Tensin homolog*; rpS6, ribosomales Protein S6; RSK, Ribosomale Protein S6 Kinase. Abkürzungen der Aminosäuren, siehe Abkürzungsverzeichnis.

Anhand dieser Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von M2-Makrophagen mit Apelin keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der in den PI3K/AKT-Signalweg involvierten Proteine besitzt.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Rolle von Apelin in der Pathogenese der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie (PAH) unter besonderer Berücksichtigung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges untersucht. Die PAH wird durch einen erhöhten vaskulären Widerstand (PVR) und einen erhöhten mittleren pulmonal arteriellen Druck definiert (mPAP; Farber und Loscalzo 2004). Nach der Entdeckung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges, der zeigte, dass Stickstoffmonoxid (NO) den PVR und den Gefäßtonus beeinflusst, konnten Frostell und Pepke-Zaba zeigen, dass eine Verabreichung von NO an PAH-Patienten den PVR reduziert (Frostell *et al.* 1991; Pepke-Zaba 1991). Da die endotheliale NO-Synthase (NOS) ein nachgeschaltetes Zielmolekül von Apelin und seinem G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) APLNR darstellt, sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Apelin und dem L-Arginin-NO-Metabolismus analysiert werden (Medhurst *et al.* 2003; Chandra *et al.* 2011).

Die Arbeit setzt sich aus drei Abschnitten zusammen: Zunächst wurde ein möglicher Einfluss von Apelin auf den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg im Zellkulturmodell analysiert. Es wurden Humane Pulmonale Mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC) untersucht, die zur Simulation des PAH-ähnlichen Phänotyps unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen kultiviert wurden. Anschließend sollten die Ergebnisse im Mausmodell verifiziert werden sowie der Einfluss einer Hypoxie-Exposition und einer Apelin-Behandlung auf den Hämatokrit, hämodynamische Parameter und eine Rechtsherzhypertrophie untersucht werden. Um zu analysieren, welchen Einfluss die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) 1 in diesem Zusammenhang spielt, wurden neben Wildtyp-Mäusen auch *Ddah1*-defiziente Mäusen eingeschlossen. Im letzten Abschnitt der Dissertation wurde der Zusammenhang zwischen Apelin und immunmodulativen Mechanismen sowie dem Kollagen-Metabolismus anhand von M2-differenzierten Makrophagen, die aus dem Blut von PAH-Patienten und gesunden Probanden gewonnen wurden, untersucht.

Apelin kommt in verschiedenen aktiven Formen vor, die sich in ihrer Aktivität und in der Anzahl der Aminosäuren unterscheiden. (Pyr¹-) Apelin-13, die Isoform mit der höchsten Aktivität, wird vor allem im Herz, in der Lunge und im Gefäßsystem exprimiert und besitzt positiv inotrope sowie NO-vermittelte vasodilative Eigenschaften (Gurzu *et al.* 2006; Salcedo *et al.* 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die höchste Expression des APLNR in der Lunge im Vergleich zu anderen Organsystemen bei Mäusen nachgewiesen werden. Analysen von Alastalo, Chandra, Falcão-Pires und Kollegen zeigen, dass Apelin-defiziente Mäuse, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren, verglichen mit ihren Wildtyp-Geschwistern einen stärker ausgeprägten PAH-ähnlichen Phänotyp aufwiesen, welcher durch Apelin-Supplementation nivelliert werden konnte (Falcão-Pires *et al.* 2009; Alastalo *et al.* 2011;

Chandra *et al.* 2011). Patienten, die an einer PAH erkrankt sind, zeigen außerdem reduzierte Apelin-Konzentrationen im Serum und Endothel im Vergleich zu gesunden Probanden (Goetze *et al.* 2006; Falcão-Pires *et al.* 2009). Auch im Rahmen einer Studie, die zwischen 2010 und 2014 in der II. Medizinischen Klinik, Abteilung für Pneumologie, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt wurde, konnten im Plasma von PAH-Patienten, verglichen mit gesunden Probanden, reduzierte Apelin-Konzentrationen gemessen werden. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage der weiteren Untersuchungen an der Beteiligung Apelins am Pathomechanismus der PAH.

5.1 Hypoxie als Modell einer Pulmonalen Arteriellen Hypertonie

Als Hypoxie bezeichnet man einen Zustand, der auftritt, sobald ein Gewebe nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird. Sauerstoff spielt unter anderem als Oxidationsmittel bei der ATP-Gewinnung in den Mitochondrien eine Rolle und ist weiterhin als Substrat an vielen enzymatischen Prozessen beteiligt. Ein Mangel an Sauerstoff stellt einen zentralen Pathomechanismus der PAH dar (Rabinovitch *et al.* 1979). Erstmals konnten Euler und Liljestrand zeigen, dass eine alveoläre Hypoxie in einer Vasokonstriktion pulmonaler muskulierter Gefäße resultiert, um die Perfusion anzupassen (Euler und Liljestrand 1946). Folglich wird das Blut zu den sauerstoffreichen Alveolen umgelenkt, die alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz sinkt und der Sauerstoffpartialdruck wird normalisiert. Innerhalb der ersten Minuten einer Hypoxie-Exposition entsteht eine akute alveoläre Hypoxie, die zu einer reversiblen, physiologischen Vasokonstriktion führt. Nach mehreren Stunden folgt eine protrahierte Hypoxämie, die schließlich in einer chronischen Hypoxie resultiert, welche durch irreversible pulmonal-vaskuläre Umbauprozesse und der Entwicklung eines PAH-ähnlichen Phänotyps charakterisiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Hypoxie-Modell verwendet, um im endothelialen Zellkulturmodell und im Tierversuch einen PAH-ähnlichen Phänotyp zu erzeugen. HPMEC wurden unter 5% O₂ kultiviert, während die Tiere, um das Wohlergehen zu gewährleisten, unter reduzierten Sauerstoffbedingungen von 10% O₂ gehalten wurden (Gomez-Arroyo *et al.* 2012; Ahmad *et al.* 2013). Der Allgemeinzustand der Tiere wurde täglich überprüft und als weiteres Merkmal des Befindens der Mäuse wurde wöchentlich das Gewicht dokumentiert. Die unter hypoxischen Bedingungen gehaltenen Mäuse zeigten in der ersten Woche der Hypoxie-Exposition eine Gewichtsreduktion von 3,9%, während die unter Normoxie gehaltenen Tiere stetig an Gewicht gewannen. Ein Unterschied hinsichtlich des Genotyps der Mäuse konnte nicht festgestellt werden. Im weiteren Verlauf der Hypoxie-Exposition haben die Tiere wieder an Gewicht gewonnen, bis zum Ende des vierwöchigen Versuchszeitraumes konnten aber nur wenige Tiere ihr Ausgangsgewicht wieder

erreichen. Der Gewichtsverlust der unter Hypoxie gehaltenen Tiere könnte dadurch bedingt sein, dass diese Mäuse durch die veränderten Sauerstoffbedingungen zunächst Symptome wie Fatigue, Schwäche und Kurzatmigkeit aufwiesen. Dies ließ sich auch an dem Verhalten der Tiere erkennen. In den ersten drei bis vier Tagen der Hypoxie-Exposition zeigten die Tiere ein Isolationsverhalten und wiesen eine eingeschränkte Motorik auf. Das Fell der Tiere war stumpf und abgestäubt. Der primär schlechte Zustand der Tiere könnte das Fressverhalten der Tiere negativ beeinflusst haben, wodurch die Gewichtsabnahme zu erklären sein könnte (van den Borst *et al.* 2013).

5.1.1 Regulation von Apelin und dem Apelin-Rezeptor

Die regulativen Mechanismen von Apelin und seinem Rezeptor APLNR sind noch weitgehend ungeklärt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass der *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) die Apelin-Expression in Kardiomyozyten und Adipozyten steigert (Ronkainen *et al.* 2007; Geiger *et al.* 2011). HIF-1 ist ein sauerstoffsensibler Transkriptionsfaktor, der durch Interaktion mit endogenen *hypoxia-responsive elements* (HRE) die Expression von HRE-assoziierten Genen reguliert. HREs konnten mittels *in-silico* Analyse auf dem Apelin-Promotor nachgewiesen werden, wenn auch die genauen Mechanismen der hypoxieabhängigen Regulation durch Apelin noch weitgehend unbekannt sind (Cox *et al.* 2006; Eyries *et al.* 2008). Weitere Studien haben gezeigt, dass eine gesteigerte Expression von Apelin durch hypoxische Bedingungen in Endothelzellen und endothelialen Vorläuferzellen induziert wird (Zhang *et al.* 2015). Eine Ausschaltung des HIF-1 α -Gens konnte einer Hypoxie-assoziierten Induktion der Apelin-Expression vorbeugen, sodass von einer Beteiligung von HIF-1 α an der Apelin-Regulation auszugehen ist (Eyries *et al.* 2008; Sheikh *et al.* 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 24-stündige Hypoxie-Exposition von Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC) in einer gesteigerten Apelin-Expression resultiert. Wurden jedoch Wildtyp- und *Ddah1*-defiziente Mäuse über einen Versuchszeitraum von vier Wochen sauerstoffreduzierten Bedingungen ausgesetzt, konnten, gegensätzlich zu den Versuchen des Zellkulturmodells, am Ende des Versuches keine veränderten Apelin-Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden. Analog zu diesen Ergebnissen haben Chandra und Kollegen in einem Mausversuch gezeigt, dass die mRNA Expression von Apelin in den Lungen von Mäusen nach einer einwöchigen Hypoxie-Exposition erhöht, nach drei Wochen unter sauerstoffreduzierten Bedingungen wieder reduziert war (Chandra *et al.* 2011). Diese Ergebnisse lassen eine initiale hypoxieabhängige Hochregulation von Apelin als einen Kompensationsmechanismus vermuten. Durch eine vermehrte Expression von Apelin, welches vasodilative Eigenschaften besitzt, wird der durch Hypoxie hervorgerufenen Vasokonstriktion entgegengewirkt, welche mit dem Euler-Liljestrand-Mechanismus zu erklären ist (Euler und Liljestrand 1946). In Gegenwart von alveolärer

Hypoxie verengen sich kleine pulmonale Arterien, um den alveolären Gasaustausch zu verbessern und das Ventilations-Perfusions-Verhältnis aufrechtzuerhalten (Sylvester *et al.* 2012). Diese Regulation könnte durch einen HIF-1 α -assoziierten Mechanismus zu erklären sein. So konnten Wang und Kollegen in ihrer Arbeit zeigen, dass die HIF-1 α -Expression in den ersten 24 Stunden einer Hypoxie-Exposition ansteigt, in den folgenden 14 Tagen aber wieder reduziert wird (Wang *et al.* 2007a). Die Diskrepanz zwischen der hypoxieabhängigen Apelin-Regulation in HPMEC sowie Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen könnte sowohl durch die unterschiedlich ausgeprägte Hypoxie als durch die verschiedenen Expositionszeiten bedingt sein. Während die HPMEC für 24 Stunden unter 5% Sauerstoff kultiviert wurden, wurden die Mäuse über einen Versuchszeitraum von vier Wochen reduzierten Sauerstoffbedingungen von 10% ausgesetzt. Weiterhin stellt das Mausmodell einen komplexen Organismus dar, in dem, insbesondere im Zusammenspiel mit verschiedenen Zellsystemen, weitere Prozesse an der Apelin-Regulation beteiligt sein könnten. Im Rahmen des Zellkulturmodells wurden die Apelin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand analysiert, während im Mausmodell die Plasmakonzentrationen untersucht wurden. Endopeptidasen im Plasma können Apelin zu inaktiven Formen spalten, die mittels ELISA-Analyse nicht nachgewiesen werden können. Da Apelin eine kurze Halbwertszeit von unter fünf Minuten besitzt, könnte die Degradation von Apelin im Plasma zum Zeitpunkt der Analyse bereits fortgeschritten gewesen sein (Barnes *et al.* 2013).

Neben der Hypoxie-bedingten Regulation von Apelin konnte auch eine HIF-1 α -abhängige veränderte Expression des G-Protein gekoppelten APLNR nachgewiesen werden (Han *et al.* 2008). Die APLNR Expression war sowohl in den HPMEC nach 24-stündiger Hypoxie-Exposition als auch in den Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Tieren nach vierwöchiger Haltung unter sauerstoffreduzierten Bedingungen, verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe, erhöht. Auch diese gesteigerte Expression des APLNR könnte durch einen regulativen Kompensationsmechanismus bedingt sein, um der Hypoxie-assoziierten Vasokonstriktion entgegenzuwirken. Als Referenzgen wurde in den Analysen der HPMEC die Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) bestimmt. Xiao *et al.* haben kürzlich nachgewiesen, dass *GAPDH* durch Hypoxie-Exposition beeinflusst wird (Xiao *et al.* 2017). Ob diese veränderte Expression von *GAPDH* die Hypoxie-bedingte gesteigerte Expression von APLNR im Zellkulturmodell beeinflusst, muss in weiteren Analysen untersucht werden. Im Rahmen des Mausmodells wurde als Referenzgen die Expression des Ribosomalen Proteins L13A (*rpl13a*) analysiert, welches nachweislich durch Hypoxie-Exposition unbeeinflusst bleibt (Xiao *et al.* 2017).

5.1.2 Regulation des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges

In der Pathogenese der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie spielt der L-Arginin-NO-Stoffwechselweg eine wichtige Rolle. Eine Beeinträchtigung des NO-Signalweges wird mit einer PAH assoziiert und stellt ein pharmakologisches Ziel dar (Machado *et al.* 2004). NO wird durch die NOS aus der Aminosäure L-Arginin gebildet und stimuliert die lösliche Guanylylcyclase (sGC), die die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert. Durch die Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen wird die intrazelluläre Calcium- (Ca^{2+}) Konzentration reduziert, was in einer Relaxation der Gefäßmuskulatur und der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus resultiert (Arnold *et al.* 1977; Katsuki und Murad 1977). Die Bildung von NO kann durch hohe Konzentrationen der methylierten Arginine Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und L- ω -N^G-Monomethylarginin (L-NMMA), kompetitive Inhibitoren der NOS, inhibiert werden (Rees *et al.* 1990; Vallance *et al.* 1992). Das Symmetrische Dimethylarginin (SDMA) ist kein Inhibitor der NOS, reduziert aber, genau wie die anderen Methylarginine, durch kompetitive Hemmung des Aminosäuretransporters CAT die intrazelluläre Verfügbarkeit von L-Arginin (Closs *et al.* 1997). Es ist unumstritten, dass NO in der gesunden Lunge eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase und des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses spielt. Giaid und Saleh konnten nachweisen, dass Patienten, die an einer PAH leiden, eine reduzierte NOS-Aktivität aufweisen, was in einem Ungleichgewicht des Perfusions-Ventilations-Verhältnisses resultiert (Giaid und Saleh 1995). Anhand von klinischen und experimentellen Daten konnte gezeigt werden, dass eine Verabreichung von NO der pulmonal-arteriellen Vasokonstriktion entgegenwirkt und den PVR von PAH-Patienten reduziert (Frostell *et al.* 1991; Pepka-Zaba 1991). Die beiden Isoformen der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, DDAH1 und DDAH2, regulieren über die katalytische Hydrolyse von ADMA die NO-Bioverfügbarkeit. ADMA ist als Inhibitor der NOS als kardiovaskulärer Risikomarker bekannt, der mit unterschiedlichen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems und einer erhöhten Mortalität assoziiert wird (Böger *et al.* 2009). Eine Überexpression der DDAH-Enzyme konnte die nachteiligen Auswirkungen von ADMA antagonisieren und vaskuläre Schäden beheben (Dayoub *et al.* 2003; Jacobi *et al.* 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Induktion des PAH-ähnlichen Phänotyps ein Hypoxie-Modell genutzt und die Expression der DDAH-Isoformen untersucht. Dabei wurde die Expression NO-modulierender Enzyme sowohl im endothelialen Zellkulturmodell als auch im Rahmen eines Tierversuchs analysiert. Es wurden sowohl Wildtyp-Mäuse, die eine unveränderte pulmonale *Ddah1* und *Ddah2* Expression aufwiesen, als auch *Ddah1*-defiziente Mäuse analysiert, die bei ausgeschalteter *Ddah1* eine unveränderte Expression der *Ddah2* zeigten. *Ddah1*-defiziente Mäuse weisen ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen auf, welche auf ihre *Ddah1*-Defizienz und damit assoziierte chronisch erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen

zurückzuführen sind (Goonasekera *et al.* 1997; Usui *et al.* 1998; Miyazaki *et al.* 1999). Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, konnte die höchste *Ddah1* mRNA Expression in Wildtyp-Mäusen in der Niere, die ausgeprägteste *Ddah2* mRNA Expression in der Lunge nachgewiesen werden (Leiper *et al.* 1999). Aufgrunddessen wurde in den folgenden Versuchen ein Proteinlysate der Niere als Positivkontrolle der *Ddah1* Proteinexpression im Immunoblot verwendet. Als Positivkontrolle der *Ddah2* Proteinexpression wurde ein Proteinlysate der Lunge genutzt. Die *Ddah1*-Defizienz führte im Vergleich zu den genetisch unveränderten Tieren zu einem Anstieg der zirkulierenden ADMA-Plasmakonzentration, während die SDMA-Plasmakonzentration unverändert blieb. Das lässt unterschiedliche Regulationsmechanismen von ADMA und SDMA vermuten und könnte mit der Annahme zu erklären sein, dass für SDMA weitere Abbauwege existieren. So konnte bereits im Rahmen einer Genom-weiten Assoziationsstudie eine Verbindung von SDMA und der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2 (AGXT2) gezeigt werden (Lüneburg *et al.* 2014). Die absolute Plasma-Konzentration von L-Arginin, welches als Substrat und Hemmstoff der NOS fungiert, war in den Tieren beider Genotypen unverändert, was auf eine *Ddah1*-unabhängige L-Arginin-Freisetzung schließen lässt. Bildete man das Verhältnis aus den Konzentrationen von L-Arginin und ADMA, so konnte ein reduziertes L-Arginin/ADMA-Verhältnis in den *Ddah1*-defizienten Tieren nachgewiesen werden. Das intrazelluläre L-Arginin/ADMA-Verhältnis beeinflusst die NOS-Aktivität, da ADMA und L-Arginin um die Bindestelle der NOS und um den Transport über den Aminosäuretransporter CAT in die Zelle konkurrieren (Teerlink *et al.* 2009). Eine Reduktion dieses Verhältnisses lässt in den *Ddah1*-defizienten Tieren auf eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit schließen.

Eine Hypoxie-Exposition über 24 Stunden im Zellkulturmodell beziehungsweise über vier Wochen in den Wildtyp-Mäusen resultierte in einer reduzierten Expression der *DDAH1* in den HPMEC und im pulmonalen Gewebe der Tiere. Die Expression der *DDAH2* hingegen war im Zellkulturmodell auf transkriptioneller Ebene nach der Hypoxie-Exposition erhöht, wohingegen im Tiermodell kein Unterschied festzustellen war. Die unterschiedliche Expression der *DDAH2* nach Hypoxie-Exposition ist auch in der Literatur umstritten. So konnten Iannone und Kollegen eine reduzierte Hypoxie-assoziierte *DDAH2* Expression im pulmonalen endothelialen Zellkulturmodell zeigen, während die Arbeitsgruppe um Lambden eine durch Hypoxie-Exposition gesteigerte *Ddah2* Expression im Mausmodell fand (Iannone *et al.* 2014; Lambden *et al.* 2016). Weiterhin könnte diese Diskrepanz in der *DDAH2* Expression im Zellkultur- und Tiermodell auch auf die Verwendung unterschiedlicher Referenzgene zurückzuführen sein. Im Zellkulturmodell wurde als Referenzgen GAPDH benutzt, dessen Expression durch Hypoxie verändert wird. Im Tiermodell wurde *rpl13a* als Referenzgen verwendet, welches durch eine Hypoxie-Exposition unbeeinflusst bleibt (Xiao *et al.* 2017). Die unterschiedliche Expression der *DDAH2* in den verschiedenen Modellen kann auch darauf

zurückzuführen sein, dass die Mäuse einen komplexen Organismus darstellen, in dem weitere Stoffwechselwege eine Rolle spielen, die die Expression der *Ddah2* regulieren könnten. Außerdem unterschieden sich die Modelle in der Sauerstoffkonzentration sowie der Hypoxie-Expositionszeit. Mäuse, die weniger als 10% Sauerstoff zur Verfügung haben, zeigten in der Arbeit von Gillmore *et al.* eine Gewichtsreduktion von über 25% innerhalb der ersten Woche unter Hypoxie-Exposition, was auf eine starke Belastung der Tiere hindeutet (Gillmore und Gordon 1975). Um die Belastung der Tiere so gering wie möglich zu halten, wurden die Tiere im Rahmen dieser Arbeit Sauerstoffkonzentrationen von 10% ausgesetzt, während die Zellen unter 5% Sauerstoff kultiviert wurden. Die Proteinexpression der *DDAH2* konnte nur im Tiermodell nachgewiesen werden, wo der Antikörper trotz hoher Proteinkonzentrationen nur eine schwache Bande zeigte. Das könnte auf eine geringe Affinität des Antikörpers zurückzuführen sein.

Analog zu den Ergebnissen der Hypoxie-abhängigen, veränderten DDAH Expression konnten in diesen Modellen nach Hypoxie-Exposition erhöhte ADMA-Konzentrationen im Zellkulturüberstand und im Plasma der Wildtyp-Mäuse nachgewiesen werden. Die *Ddah1*-defizienten Mäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eine gesteigerte ADMA-Plasmakonzentration, die durch Hypoxie-Exposition nicht weiter gesteigert werden konnten. Eine reduzierte Expression der *DDAH1* unter Hypoxie-Exposition resultierte somit in gesteigerten ADMA-Konzentrationen im Zell- und im Tiermodell, was durch eine reduzierte Metabolisierung von ADMA durch die DDAH1 bedingt ist. Eine gesteigerte Hypoxie-assoziierte Expression der *DDAH2* im Zellkulturmodell konnte die ADMA-Konzentration hingegen nicht beeinflussen.

In jüngster Zeit wird der Einfluss der DDAH2 auf den Metabolismus von ADMA und L-NMMA kritisch diskutiert. Da in *Ddah1*-defizienten Mäusen trotz unveränderter DDAH2 Expression kein enzymatischer Abbau der Methylarginine nachgewiesen wurde, wird die DDAH1 als Enzym betrachtet, welches allein für den Abbau der Methylarginine verantwortlich ist (Hu *et al.* 2011). Eine Korrelation zwischen der Regulation von L-Arginin und ADMA sowie der Aktivität der DDAH1, nicht aber der DDAH2, konnte sowohl in einem gesunden Patientenkollektiv als auch im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen hergestellt werden (Lüneburg *et al.* 2014). Dennoch konnten Wang *et al.* zeigen, dass die DDAH2 an der NO-Regulation beteiligt ist, indem eine Überexpression des Enzyms zwar die NO-Bioverfügbarkeit steigerte, die ADMA-Konzentration aber unverändert blieb (Wang *et al.* 2007b). Eine gesteigerte *DDAH2*-Expression in HPMEC unter hypoxischen Bedingungen könnte somit durch einen Kompensationsmechanismus bedingt sein. Dass dieser Effekt nicht im Tiermodell nachzuweisen war, könnte durch weitere regulatorische Mechanismen im komplexen Organismus oder durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen im Zellkultur- und

Tiermodell begründet sein. Die Konzentration von L-Arginin im Plasma der Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Tiere konnte nur in den Wildtyp-Mäusen durch Hypoxie-Exposition reduziert werden. Bildet man aber das Verhältnis von L-Arginin zu ADMA, so konnte durch eine vierwöchige Hypoxie-Behandlung in den Tieren beider Genotypen eine Reduktion des Verhältnisses im Vergleich zu den unbehandelten Tieren gemessen werden. Eine Hypoxie-Exposition resultierte somit unabhängig vom Genotyp in einer reduzierten Verfügbarkeit von NO. Die Konzentration von SDMA blieb in beiden Versuchsmodellen unter Hypoxie unbeeinflusst, möglicherweise da für SDMA weitere Metabolisierungswege existieren (Lüneburg *et al.* 2014).

Neben den DDAH-Enzymen spielt auch die NOS3 im L-Arginin-NO-Stoffwechsel eine übergeordnete Rolle. Die NOS3 katalysiert die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin und ist somit direkt an der NO-Bioverfügbarkeit beteiligt. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Hypoxie-Exposition von HPMEC in einer gesteigerten NOS3 mRNA Expression und somit auch in einer gesteigerten Freisetzung von NO, gemessen als Nitrit, resultiert. Fagan und Kollegen konnten eine gesteigerte pulmonale *Nos3* mRNA Expression mit einer vermehrten NO-Bioverfügbarkeit unter Hypoxie-Exposition ebenso im Tiermodell zeigen (Fagan *et al.* 2001). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die gesteigerte *Nos3* mRNA Expression auf einen Kompensationsmechanismus zurückzuführen ist. Der damit assoziierte Mechanismus ist noch unklar, ein Hypoxie-assoziiertes *response element* (HRE) auf dem *Nos3*-Promotor konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Hoffmann und Kollegen vermuten eine Beteiligung des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors *activator protein-1* (Hoffmann *et al.* 2001).

5.1.3 Hämatokrit, hämodynamische Parameter und Rechtsherzhypertrophie im Tiermodell

Der Einfluss einer vierwöchigen Hypoxie-Exposition von Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen wurde durch physiologische und histologische Untersuchungen analysiert.

Eine Hypoxie-assoziierte PAH wird mit einer Vasokonstriktion kleiner pulmonaler Gefäße und vaskulären Umbauprozessen assoziiert (Humbert *et al.* 2004; Pietra *et al.* 2004). Diese Vasokonstriktion könnte durch eine veränderte Regulation von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren bedingt sein. So konnten Barnes *et al.* zeigen, dass PAH-Patienten eine gesteigerte pulmonale Endothelin-Expression bei gleichzeitig verminderter NO- und Prostazyklin- (PGI_2) Synthese aufweisen (Barnes 1994). Organismen, die einer chronischen Hypoxie-Exposition ausgesetzt sind, zeigen einen Anstieg des Hämatokritwertes im Blut, um durch eine Steigerung der Erythrozytenzahl die Sauerstoffversorgung der Peripherie zu verbessern (Höpfl *et al.* 2003). Mit der Bestimmung des Hämatokrits lässt sich die Adaptation

des Organismus an reduzierte Sauerstoffverhältnisse, wie hier chronischer Hypoxie, feststellen. Ein Anstieg des Hämatokrits könnte die in PAH-Patienten vorliegende unzureichende Sauerstoffversorgung der Peripherie kompensieren. Tiere, die keine *Ddah1* exprimieren, weisen im Vergleich zu den genetisch unveränderten Tieren eine erhöhte Plasmakonzentration des endogenen NOS3-Inhibitors ADMA auf, was in einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit und somit in einer Vasokonstriktion resultiert (Millatt *et al.* 2003; Kielstein *et al.* 2005). Daraus folgt ein geringerer Sauerstoffpartialdruck (pO_2), der zu einer vermehrten Synthese von Erythropoetin in den Nierentubuli führt und die Bildung von Erythrozyten im Knochenmark stimuliert (Höpfl *et al.* 2003). Eine Hypoxie-Exposition resultierte in den Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen in einem gesteigerten Hämatokritwert. Um eine Hypoxie-bedingte unzureichende Sauerstoffversorgung in der Peripherie der Mäuse auszugleichen, folgte möglicherweise eine Vasokonstriktion zur Anpassung des Perfusions/Ventilations-Verhältnisses sowie vaskuläre Umbauprozesse. Der reduzierte pO_2 könnte auch hier mit einer gesteigerten Bildung von Erythrozyten und einem daraus resultierenden Anstieg des Hämatokrits assoziiert sein.

Eine PAH geht weiterhin mit einem erhöhten mittleren rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSP) einher. Menschen, die in hochgelegenen Gebieten leben, zeigen einen gesteigerten RVSP, der mit einer erhöhten Expression von Vasokonstriktoren wie Endothelin assoziiert werden konnte (Groves *et al.* 1987; Bärtzsch *et al.* 2001). Die Tiere, die im hier verwendeten Mausmodell unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren nach einer vierwöchigen Hypoxie-Exposition einen erhöhten RVSP. Eine akute Hypoxie führt zu einer kompensatorischen Vasokonstriktion, um das Perfusions/Ventilations-Verhältnis zu steigern und so die Sauerstoffversorgung der Peripherie zu verbessern (Euler und Liljestrand 1946). Liegt eine chronische Hypoxie vor, so wird diese weiterhin mit vaskulären Umbauprozessen in kleinen pulmonalen Gefäßen assoziiert, die mit einem gesteigerten PVR einhergehen und einen Anstieg des RVSP zur Folge haben (Humbert *et al.* 2004; Pietra *et al.* 2004). Weiterhin zeigt eine Hypoxie-Exposition eine Dysregulation von vasodilatativen und vasokonstriktiven Faktoren. So wird eine Hypoxie-Exposition mit einer reduzierten PGI_2 -Synthese bei gleichzeitig gesteigerter Expression des Vasokonstriktors Endothelin in Endothelzellen in Verbindung gebracht (Madden *et al.* 1986; Gertler und Ocasio 1993). Ein Genotyp-assoziiertes Unterscheid konnte im vorliegenden Tiermodell nicht nachgewiesen werden. Eine *Ddah1*-Defizienz wirkt sich vor allem negativ auf die NO-Bioverfügbarkeit aus, die wiederum in *Ddah1*-defizienten Tieren in vasokonstriktiven Prozessen resultiert. NO stellt aber nicht den einzigen endogenen Vasodilatator dar. So spielen weiterhin PGI_2 und Prostaglandin E_2 (PGE_2) eine Rolle in der Regulation der Gefäßhomöostase. Ein Kompensationsmechanismus, der bei reduzierter NO-Bioverfügbarkeit die PGI_2 oder PGE_2 -Konzentrationen steigert, könnte eine Ursache für den unveränderten

RVSP in Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Tieren darstellen. Es konnte folglich keine Veränderung des RVSP in Abhängigkeit von der *Dadh1* festgestellt werden (Chester *et al.* 2017).

Um reduzierte Sauerstoffverhältnisse zu kompensieren, kommt es zu einer gesteigerten Inotropie des Herzens, um mehr Blut in die Lunge zu pumpen und so die Sauerstoffversorgung in der Peripherie zu gewährleisten. Es folgt eine Hypertrophie des rechten Ventrikels, um die Druck- und Volumenüberlastung zu kompensieren (Essop 2007). Die genaue Entstehung einer Hypoxie-assoziierten Rechtsherzhypertrophie ist jedoch unbekannt (Maggiorini und Léon-Velarde 2003; Selvetella *et al.* 2004). Neben den hämodynamischen Parametern wurden die Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Tiere auf das Vorliegen einer Rechtsherzhypertrophie untersucht. Dabei wurden genotypabhängige und Hypoxie-bedingte Unterschiede analysiert. Zur Untersuchung diente der Fulton Index, der das Verhältnis des Gewichtes des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel und Septum darstellt, sowie etablierte Parameter wie das Körpergewicht und die Tibialänge der Tiere, auf die das Gewicht des rechten Ventrikels bezogen wird. Die Kardiomyozytenfläche diente als weiterer Hypertrophiemarker. Die *Ddah1*-defizienten Tiere zeigten im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern unter Normoxie einen gesteigerten Fulton-Index. Die weiteren Hypertrophie-Indices zeigten bei unveränderten Sauerstoffbedingungen hinsichtlich des Genotyps keine Unterschiede. Die Geschlechter in beiden Gruppen waren unterschiedlich verteilt, sodass das unterschiedliche Körpergewicht und Körpergröße von männlichen und weiblichen Tieren die Hypertrophie-Indices beeinflussen könnten. Eine Korrelation des Fulton-Index mit dem RVSP zeigte, dass ein erhöhter Fulton-Index mit einem gesteigerten RVSP einhergeht. Die Wildtyp-Tiere zeigten im Vergleich zu den *Ddah1*-defizienten Mäusen bei einem reduzierten Fulton-Index einen geringeren RVSP. Als weiterer Marker zur Untersuchung einer Rechtsherzhypertrophie diente die Analyse der rechtsventrikulären Kardiomyozytenfläche. Diese war in den unter Normoxie gehaltenen *Ddah1*-defizienten Mäusen verglichen mit den Wildtyp-Tieren reduziert. Die Fläche der linksventrikulären Kardiomyozyten zeigte keine Genotyp-assoziierten Unterschiede. Laut der vorliegenden Daten scheint sich eine *Ddah1*-Defizienz zwar negativ auf das Gewicht des rechten Ventrikels auszuwirken, die durchschnittliche Fläche der Kardiomyozyten blieb von der *Ddah1* jedoch unbeeinflusst.

Setzte man die Mäuse für vier Wochen einer Hypoxie-Exposition aus, so konnte eine Rechtsherzhypertrophie gemessen werden. Eine Hypoxie-Exposition resultierte in einem gesteigerten RVSP, der gleichzeitig eine Volumen- und Drucküberlastung des rechten Ventrikels anzeigt. Als Kompensation folgte möglicherweise die Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie. Die *Ddah1*-defizienten Tiere zeigten unter hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen, verglichen mit den Wildtyp-Tieren, eine gesteigerte

Rechtsherzhypertrophie, die anhand des Gewichtes des rechten Ventrikels analysiert wurde. Eine *Ddah1*-Defizienz verschlechterte somit eine Hypoxie-bedingte Rechtsherzhypertrophie, wenn auch der RVSP vom Genotyp unbeeinflusst blieb. Studien haben gezeigt, dass der RVSP nicht den einzigen Regulator einer Rechtsherzhypertrophie darstellt (Fan *et al.* 2005). So resultiert eine Hypoxie-Exposition in einer Hochregulation von HIF-1 α , das mit vaskulären Umbauprozessen und der Ausbildung einer rechtsventrikulären Hypertrophie korreliert (Liu *et al.* 2017). HIF-1 α könnte durch Regulation seiner Ziel-Gene, die unter anderem an Proliferationsprozessen beteiligt sind, ebenso an der Ausbildung einer Hypertrophie des rechten Ventrikels beteiligt sein (Manalo *et al.* 2005). Die Fläche der Kardiomyozyten des rechten Ventrikels war in allen Versuchsgruppen nach vierwöchiger Hypoxie-Exposition erhöht. Bildete man das Verhältnis aus der Kardiomyozytenfläche des rechten Ventrikels zu der des linken Ventrikels und Septum, so zeigte sich unabhängig vom Genotyp der Mäuse eine Steigerung des Verhältnisses nach vierwöchiger Haltung unter Hypoxie-Exposition. Die Daten deuten darauf hin, dass möglicherweise aufgrund einer Volumen- und Drucküberlastung und einer gesteigerten HIF-1 α -Expression eine rechtsventrikuläre Hypertrophie resultiert, um diese Überlastung zu kompensieren. Das *Ddah1*/ADMA-System scheint in der Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie unter Hypoxie-Exposition beteiligt zu sein, da gezeigt werden konnte, dass die Abwesenheit des ADMA-metabolisierenden Enzyms unter Hypoxie-Exposition die Hypertrophie-Indices bei unveränderter Kardiomyozytenfläche verstärkt.

5.1.4 Pulmonale Gefäß- und Alveolarveränderungen im Tiermodell

Die PAH geht mit verschiedenen Veränderungen der Pulmonalstruktur einher. So konnte bei erkrankten Personen neben einer Intimafibrose, Hypertrophie der Media und einer Hyperplasie der Adventitia auch eine *de novo* Muskularisierung kleiner Pulmonalgefäße festgestellt werden. Diese Veränderungen der Pulmonalstruktur führen zu einer Rarefizierung kleiner pulmonaler Gefäße sowie zu einer pulmonalen Gefäßobliteration (Olschewski *et al.* 2001). Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass eine Hypoxie-induzierte PAH zu Veränderungen des Alveolargewebes führt (Hu *et al.* 2014). In den Lungen von Probanden, die im Rahmen der Studie „Operation Everest II“ hypobaren Bedingungen ausgesetzt waren, konnte eine verstärkte Expression von α -SMA in der Gefäßwand kleiner Pulmonalarterien, die normalerweise wenig α -SMA exprimieren, nachgewiesen werden. Analysen zeigen in größeren Gefäße eine Hypoxie-assoziierte verstärkte Intima-Media- und Adventitiadicke, die auf Hypoxie-assoziierte vaskuläre Umbauprozesse hindeutet (Groves *et al.* 1987; Houston *et al.* 1987). Die im Rahmen dieser Arbeit explantierten Lungen der Hypoxie-behandelten Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäuse wurden zur Analyse der pulmonalen Gefäß- und Alveolarveränderungen histologisch analysiert. So konnte in den Wildtyp-Mäusen durch Hypoxie-Exposition eine erhöhte Intima-Mediadicke der Pulmonal- und Bronchialarterien

gezeigt werden. Die *Ddah1*-defizienten Tiere wiesen durch Hypoxie-Exposition eine unveränderte Intima-Mediadicke auf. Die *Ddah1*-defizienten Mäuse zeigten, verglichen mit den Wildtyp-Tieren, schon unter Normoxie-Haltung einen Trend zu einer gesteigerten Intima-Mediadicke, welcher möglicherweise die unveränderte Intima-Mediadicke bedingt. Die Verdickung der Media entsteht sowohl durch hypertrophe Veränderungen, eine vermehrte Proliferation glattmuskulärer Zellen als auch durch eine Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine (Stenmark *et al.* 2006). Es wurde bereits beschrieben, dass eine Hypoxie-assoziierte Verdickung der Media durch eine Proliferation glatter Muskelzellen bedingt ist, die auf eine reduzierte Verfügbarkeit von NO zurückzuführen sein könnte (Frid *et al.* 2004). Die Adventitiadicke blieb in diesem Tiermodell von der Hypoxie-Exposition unbeeinflusst. Unterschiede hinsichtlich des Genotyps der Tiere wurden nicht festgestellt, sodass eine Beteiligung der *Ddah1* an Proliferationsprozessen der Intima-Media ausgeschlossen werden kann.

Mittels immunhistochemischer α -SMA- und CD31-Färbung wurde die Muskularisierung der Gefäße analysiert. Die *Ddah1*-defizienten Tiere zeigten im Vergleich mit ihren Wildtyp-Geschwistern weniger unmuskularisierte Gefäße bei einer gleichzeitig gesteigerten Anzahl voll muskularisierter Gefäße. Unabhängig vom Genotyp konnte in allen Versuchsgruppen durch die Hypoxie-Exposition eine Steigerung der Anzahl voll muskularisierter Gefäße bei gleichzeitiger Reduktion der Anzahl nicht- oder nur teilweise muskularisierter pulmonaler Gefäße gezeigt werden. Weiterhin zeigten Hypoxie-exponierte Tiere eine geringere Gesamtanzahl an Gefäßen pro definiertem Lungenabschnitt sowie einen reduzierten *Radial alveolar count* (RAC), der auf eine geschädigte Alveolarstruktur hinweisen könnte. Die Daten lassen darauf schließen, dass eine Hypoxie-Exposition möglicherweise vaskuläre Umbauprozesse begünstigt, die durch eine *Ddah1*-Defizienz augmentiert werden.

Die Veränderungen pulmonaler Gefäße sind durch Proliferations- und Migrationsprozesse bedingt. Die strukturellen Veränderungen werden mit einer gesteigerten Muskularisierung und einer vermehrten Synthese von Bindegewebsstrukturen in Verbindung gebracht. Eine gesteigerte Kollagensynthese konnte bereits mit einer PAH assoziiert werden (Hislop und Reid 1976; Kerr *et al.* 1987). In diesem Tiermodell konnte unabhängig vom Genotyp der Tiere eine durch Hypoxie hervorgerufene Steigerung der pulmonalen *Col4a1* mRNA Synthese gezeigt werden, die mit der Hypoxie-bedingten Verdickung der Intima-Media assoziiert werden kann. Die *Ddah1* scheint laut der vorliegenden Daten an der Regulation von *Col4a1* unbeteiligt zu sein.

Um die Regulation von Apelin zu untersuchen sollte weiterhin überprüft werden, ob eine Hypoxie-Exposition zur Induktion des PAH-Phänotyps den

Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B- (PI3K/AKT) Signalweg beeinflusst, der bereits mit Apelin assoziiert werden konnte. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung einiger Proteine, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, durch die Kultivierung der HPMEC unter reduzierten Sauerstoffbedingungen, reduziert wurde. Daraus könnte geschlossen werden, dass der Phänotyp, ähnlich dem einer PAH, den PI3K/AKT-Signalweg beeinträchtigt, der in vielen physiologischen Zusammenhängen eine übergeordnete Rolle spielt.

5.2 Apelin als Modulator autokriner Mechanismen

Das apelinerge System konnte bereits mit unterschiedlichen physiologischen Funktionen in Zusammenhang gebracht werden; insbesondere das kardiovaskuläre System ist als eines der wichtigsten Ziele von Apelin und seinem Rezeptor APLNR bekannt. Ein hypotensiver Effekt über einen NO-abhängigen Mechanismus sowie eine positiv inotrope Wirkung konnte mit dem apelinergen System in Verbindung gebracht werden (Hosoya *et al.* 2000). Zhu und Kollegen konnten in einem Probandenkollektiv von 1.031 Probanden eine negative Korrelation zwischen Apelin-Plasmakonzentrationen und dem Blutdruck finden (Zhu *et al.* 2013). Im Plasma von Patienten, die an einer PAH erkrankt sind, wurden erniedrigte Apelin-Konzentrationen gemessen (Papadopoulos *et al.* 2013). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von Apelin auf den Phänotyp einer PAH untersucht werden. Dazu wurde sowohl das beschriebene Hypoxie-basierte endotheliale Zellmodell als auch ein Mausexperiment benutzt, in dem alle Mäuse hypoxischen Bedingungen zur Induktion des PAH-ähnlichen Phänotyps ausgesetzt waren. Den Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen wurde eine osmotische Minipumpe implantiert, über die den Mäusen mit einer konstanten Freigaberate über vier Wochen Apelin oder NaCl verabreicht wurde. Um die optimale Apelin-Konzentration zu finden, wurde den Tieren zunächst über je eine osmotische Minipumpe unterschiedliche Apelin-Konzentrationen beziehungsweise NaCl als Kontrolle appliziert. Wöchentlich wurde die Apelin-Plasmakonzentration der Tiere gemessen. Im Vergleich zu der Versuchsgruppe, die als Kontrolle NaCl verabreicht bekam, stieg durch die Apelin-Behandlung die Apelin-Plasmakonzentration zunächst an, nach 21 Tagen sank die Konzentration in allen vier Versuchsgruppen unter die jeweiligen Ausgangswerte vor der Implantation der Minipumpen wieder ab. Das könnte dadurch bedingt sein, dass sich die Methode der Blutabnahme der verschiedenen Abnahmezeitpunkte unterschied. So wurde während der ersten Abnahmen eine retroorbitale Abnahmetechnik verwendet, während die letzte Abnahme nach Elimination der Tiere unter Narkose kardial erfolgte. Die Analyse von arteriellem und venösem Blut im Vergleich zeigte jedoch keine Unterschiede (ergänzende Daten, Abschnitt 8.1.4). Weiterhin könnten die Apelin-Plasmakonzentrationen negativ mit dem Alter der Tiere korrelieren. Die Tiere, die im Versuch zur Konzentrationsfindung Apelin mit einer täglichen Freigaberate von 2 oder 2,5 mg/kg KG erhielten, wiesen die höchsten und vergleichbare

Apelin-Plasmakonzentrationen über den Versuchszeitraum auf. Für die folgenden Versuche wurde aufgrunddessen eine tägliche Freigabe von 2 mg/kg KG gewählt. Zur Überprüfung der Funktionalität der Minipumpen und zur Beobachtung der Veränderungen der Apelin-Plasmakonzentrationen über den Versuchszeitraum wurde auch in den Wildtyp- und den *Ddah1*-defizienten Mäusen, die mit Apelin oder NaCl supplementiert wurden, vor Beginn und nach Ende des vierwöchigen Versuchszeitraumes die Apelin-Plasmakonzentration analysiert. Im Plasma der Apelin-supplementierten Wildtyp-Tiere konnte im Vergleich zu den Kontroll-Tieren, die NaCl appliziert bekamen, ein Anstieg der Apelin-Konzentrationen gemessen werden. In den *Ddah1*-defizienten Tieren konnte lediglich ein Trend zu einer erhöhten Apelin-Plasmakonzentration nach vierwöchiger Apelin-Applikation nachgewiesen werden. Das könnte mit einer nach vier Wochen abnehmenden Funktionalität der Minipumpen zusammenhängen, die, wie im Vorversuch gezeigt, zuvor eine optimale Funktionalität zeigten. Außerdem könnte die Implantation der osmotischen Minipumpen in den *Ddah1*-defizienten Tieren fehlerhaft durchgeführt worden sein, sodass die Funktionalität beeinträchtigt wurde. Weiterhin könnte das Apelin über Endopeptidasen in den *Ddah1*-defizienten Mäusen vermehrt abgebaut worden sein. Aufgrunddessen sollen die Ergebnisse, die in den Apelin-supplementierten *Ddah1*-defizienten Tieren erzielt wurden, kritisch betrachtet werden.

Das Körpergewicht stellt einen wichtigen Prädiktor des Wohlergehens der Tiere dar, sodass neben der täglichen Kontrolle der Tiere, die die Überprüfung des Allgemeinzustandes und des Spontanverhaltens umfasste, auch wöchentlich das Körpergewicht der Mäuse bestimmt wurde. Alle Tiere haben innerhalb der ersten Woche der Hypoxie-Exposition an Gewicht verloren (Ø 9,4%), ein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen wurde nicht festgestellt. Die Reduktion des Körpergewichtes könnte, wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, mit einer reduzierten Futteraufnahme aufgrund von Dyspnoe und Fatigue assoziiert sein.

5.2.1 Regulation von APLNR

Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor APLNR wurde zunächst als *orphan receptor* identifiziert (O'Dowd *et al.* 1993). Die Regulation des GPCR ist bisher noch weitgehend unbekannt. Untersuchungen haben gezeigt, dass APLNR durch akuten und wiederholten Stress verstärkt exprimiert wird (O'Carroll *et al.* 2003). Wang *et al.* konnten weiterhin belegen, dass der endogene Ligand des GPCR die Expression von APLNR im Gastrointestinaltrakt reguliert (Wang *et al.* 2009). Um zu untersuchen, ob Apelin auch die pulmonale APLNR Expression beeinflusst, wurden zunächst HPMEC unter Normoxie- und Hypoxie-Exposition mit Apelin behandelt und die APLNR mRNA Expression wurde analysiert. Eine Hypoxie-Exposition induzierte, wie bereits in Abschnitt 5.1.1 gezeigt, eine gesteigerte APLNR-Expression; unter Apelin-Behandlung konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Im Tiermodell konnte durch

Hypoxie-Exposition die pulmonale *Aplnr* mRNA Expression in allen Versuchsgruppen gesteigert werden. Behandelte man die Tiere mit Apelin oder NaCl-Lösung, so wurde in den Wildtyp-Tieren, denen Apelin verabreicht wurde, eine reduzierte *Aplnr* mRNA Expression gemessen. In den *Ddah1*-defizienten Tieren konnte durch die Apelin-Behandlung keine veränderte *Aplnr* mRNA Expression nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Regulation des *Aplnr* in den Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen könnte dadurch bedingt sein, dass in den *Ddah1*-defizienten Tieren nicht genug Apelin in den systemischen Kreislauf gelangte, um einen Effekt hervorzurufen (siehe Abschnitt 5.2). In den *Ddah1*-defizienten Tieren fällt der Unterschied in der *Aplnr* mRNA Expression zwischen Apelin- und NaCl-behandelten Mäusen geringer aus als in den Wildtyp-Mäusen. Das könnte möglicherweise auf einen Kompensationsmechanismus zurückzuführen sein, um durch eine gesteigerte *Aplnr* mRNA Expression der Vasokonstriktion und den Proliferationsprozessen entgegenzuwirken, die in den *Ddah1*-defizienten Tieren aufgrund der Abwesenheit des ADMA-abbauenden Enzyms vorherrschen. Unter Hypoxie-Exposition wird *Aplnr* HIF-1 α -abhängig hochreguliert, möglicherweise um der Hypoxie-assoziierten Vasokonstriktion entgegenzuwirken, da eine Aktivierung des *Aplnr* unter anderem über eine erhöhte *Nos3*-Expression in einer gesteigerten NO-Synthese resultiert (Ishida *et al.* 2004; Jia *et al.* 2007). Dass unter Apelin-Supplementation keine Hypoxie-assoziierte gesteigerte *Aplnr* mRNA Expression gemessen werden konnte, könnte mit einer Überstimulation des APLNR zusammenhängen. Der Effekt eines Liganden hängt stets proportional mit der Konzentration aktivierter Rezeptoren zusammen, welche wiederum mit der Gesamtkonzentration des Rezeptors, des Liganden und der Affinität des Liganden assoziiert sind. Dieser Zusammenhang lässt sich mithilfe der Michaelis-Menten-Formel darstellen (Michaelis und Menten 1913):

$$[PR] = \frac{\left[R_{\text{gesamt}} \right] \times [P]}{K_D + [P]}$$

In niedrigen Konzentrationen verhält sich die Konzentration des gebundenen Liganden (PR) proportional zur Wirkung. Liegen hohe Konzentrationen des Liganden (P) vor, so sind die meisten Bindungsstellen der Rezeptoren bereits besetzt und trotz Konzentrationssteigerung des Liganden kann kein weiterer Effekt erzielt werden. Durch eine anhaltende Liganden-Stimulation wird die GPCR-Dichte häufig durch Phosphorylierungen und daraus resultierenden Konformationsänderungen herabreguliert, um eine Überstimulation zu verhindern.

Da eine Hypoxie-Exposition nicht nur die mRNA Expression von APLNR, sondern auch die Apelin-Expression steigert, zeigt, dass der Ligand in ausreichender Menge vorhanden ist. Eine zusätzliche exogene Stimulation mit dem Liganden kann, wie oben beschrieben, zu einer Überstimulation führen und somit in einer Herabregulation des Rezeptors resultieren.

5.2.2 Regulation des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges

Dass Apelin den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg beeinflusst, konnten bereits mehrere Arbeitsgruppen zeigen (Jia *et al.* 2007; Andersen *et al.* 2011). Tatemoto und Kollegen fanden einen Zusammenhang zwischen dem apelinergen System und dem L-Arginin-NO-Stoffwechselweg, indem sie einen hypotensiven Effekt von Apelin in Ratten beobachteten, der durch den NOS-Inhibitor L-N^G-Nitroargininmethylester aufgehoben werden konnte (Tatemoto *et al.* 2001). Im Mausmodell konnte weiterhin eine Apelin-induzierte Phosphorylierung der NOS3 beschrieben werden (Ishida *et al.* 2004). Weitere Arbeiten zeigen, dass Apelin die Aktivität der NOS3 stimuliert und die NO-Konzentration im Serum erhöht (Jia *et al.* 2007; Azizi *et al.* 2013). Dass eine Apelin-Stimulation die Expression der NOS3 steigert, konnte auch im endothelialen Zellkulturmodell unter Normoxie-Exposition im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Eine Kultivierung der Zellen unter Hypoxie-Exposition zeigte im Vergleich zu den unter unveränderten Sauerstoff-Bedingungen kultivierten HPMEC eine gesteigerte NOS3 Expression, die durch Apelin-Supplementation nicht weiter gesteigert werden konnte. Analog dazu wurde eine erhöhte Nitrit-Konzentration im Überstand der unter Hypoxie kultivierten Zellen gemessen, welche indirekt auf eine gesteigerte Freisetzung von NO hinweist. In hohen Konzentrationen hemmt NO die DDAH-Isoformen, sodass erhöhte ADMA-Konzentrationen resultieren könnten, die über eine NOS-Inhibition die Apelin- und Hypoxie-induzierte NOS3 Expression begrenzen (Jia *et al.* 2007). Unter Apelin-Supplementation konnte sowohl im Zellkulturmodell als auch in den Wildtyp-Mäusen eine gesteigerte pulmonale Expression der DDAH1 gezeigt werden. Analog dazu resultierte eine Behandlung mit Apelin im Zellkulturmodell in einer reduzierten ADMA-Konzentration bei unveränderten SDMA-Konzentration im Zellkulturüberstand. Vergleicht man die unsupplementierten Zellen mit den Apelin-behandelten Zellen, so zeigt sich dass eine Hypoxie-Exposition in einer gesteigerten ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand resultierte. Die Zellen, die mit Apelin behandelt wurden, blieben durch die Hypoxie-Exposition unbeeinflusst. Im Tiermodell konnte dieser Effekt in den Wildtyp-Tieren verifiziert werden. So blieb die ADMA-Plasmakonzentration durch eine Apelin-Behandlung in den genetisch unveränderten Mäusen unbeeinflusst, während die NaCl-supplementierten Tiere, wie bereits in Abschnitt 5.1.2 gezeigt, durch die Hypoxie-Exposition eine gesteigerte ADMA-Plasmakonzentration zeigten. Eine Hypoxie-Exposition resultierte, wie auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, in einer Vasokonstriktion sowie in irreversiblen vaskulären Umbauprozessen, die mit einer gesteigerten ADMA-Synthese einhergehen (Böger *et al.* 1998). Da Apelin vasodilative Eigenschaften besitzt, könnte sich eine Apelin-Behandlung protektiv auf die Gefäßhomöostase auswirken und durch eine gesteigerte DDAH1 Expression die ADMA-Plasmakonzentration reduzieren. Dass die durch Apelin induzierte reduzierte ADMA-Freisetzung unter hypoxischen Bedingungen nur in den Wildtyp-Mäusen zu

beobachten war, könnte mit der Defizienz des ADMA-abbauenden Enzyms in den genetisch veränderten Mäusen zu erklären sein. Die Abwesenheit der *Ddah1* resultiert bereits unbehandelt in chronisch erhöhten ADMA-Konzentrationen (Hu *et al.* 2011). Eine Apelin-Behandlung reduziert die ADMA-Konzentrationen möglicherweise über eine erhöhte *Ddah1* Expression. Da die genetisch veränderten Mäuse keine *Ddah1* exprimieren, kann eine Apelin-Supplementation die ADMA-Konzentrationen nicht auf diese Weise beeinflussen. Eine Apelin-Behandlung resultierte weiterhin, verglichen mit einer NaCl-Supplementation, in einem gesteigerten L-Arginin/ADMA-Verhältnis in genetisch unveränderten Tieren. Die *Ddah1*-defizienten Tiere zeigten ein stark reduziertes L-Arginin/ADMA-Verhältnis, welches häufig mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert wird, das durch Apelin-Behandlung nicht beeinflusst werden konnte. Dies lässt sich möglicherweise erneut dadurch erklären, dass Apelin die ADMA-Konzentrationen *Ddah1*-abhängig reguliert, sodass dieser Effekt in den genetisch veränderten Tieren nicht gezeigt werden konnte.

Die SDMA-Plasmakonzentration war in allen Versuchsgruppen nach vierwöchiger Hypoxie-Exposition erhöht. Anhand der hier vorliegenden Daten, lässt sich diese Beobachtung nicht erklären. Wie bereits im Vorversuch gezeigt, resultierte eine Hypoxie-Exposition in den NaCl-supplementierten Wildtyp-Mäusen in einer Reduktion der Plasma-L-Arginin-Konzentrationen. Eine Apelin-Supplementation veränderte die L-Arginin-Plasmakonzentrationen nicht. Die Beeinflussung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels durch Apelin kann demnach weiterhin durch eine vermehrte Synthese von L-Arginin bedingt sein, welches als Substrat der NOS an der NO-Synthese beteiligt ist. In den *Ddah1*-defizienten Mäusen blieb diese Beobachtung aus, sodass die L-Arginin-Bioverfügbarkeit durch Apelin vermutlich abhängig von der *Ddah1* reguliert werden könnte.

Eine durch Apelin-Behandlung gesteigerte Expression der DDAH2 konnte nur in den HPMEC, nicht aber im pulmonalen Gewebe der Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Tiere gezeigt werden. Diese Diskrepanz könnte damit zu erklären sein, dass das murine Modell einen komplexen Organismus darstellt, in dem neben dem L-Arginin-NO-Stoffwechselweg viele weitere Signalwege und neben Endothelzellen viele weitere Zellsysteme beteiligt sind. So kann auch die *Ddah2* Expression im Lungengewebe der Maus mit weiteren Signalwegen assoziiert sein. Die Zellen und Mäuse wurden verschiedenen Bedingungen ausgesetzt, die sich sowohl in der Sauerstoffkonzentration als auch in der Hypoxie-Expositionszeit unterschieden. Weiterhin wurden zur Analyse der DDAH-Expression unterschiedliche Referenzgene verwendet. Das im Zellkulturmodell verwendete Referenzgen GAPDH, zeigt in der Arbeit von Xiao und Kollegen eine Beeinflussung durch Hypoxie, welche weiterhin die unterschiedlichen Ergebnisse im Zellkultur- und Tiermodell erklären könnte (Xiao *et al.* 2017). Das im Tiermodell zur Auswertung der Expression benutzte Referenzgen *Rpl13a* bleibt durch Hypoxie-Exposition

unbeeinflusst. Ob die DDAH2 neben der DDAH1 auch eine Rolle im apelinergen System spielt, muss in weiterführenden Analysen untersucht werden.

Um zu überprüfen, ob Apelin neben der gesteigerten Expression der DDAH1 auch die Aktivität des Enzyms beeinflusst, wurden HPMEC vor der Apelin-Behandlung mit dem unspezifischen DDAH-Inhibitor Ebselen inkubiert und anschließend wurde die Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand analysiert (Linsky *et al.* 2011). Eine Apelin-Behandlung führte zu einer gesteigerten Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand, die indirekt auf eine gesteigerte NO-Freisetzung schließen lässt. Durch eine Ebselen-Vorinkubation blieb dieser Effekt jedoch aus, was auf eine apelinabhängige Steigerung der DDAH1-Aktivität hindeuten könnte. Da Ebselen einen unspezifischen DDAH-Inhibitor darstellt, der weitere Signalwege beeinflusst, sind weitere Analysen nötig, um diese Hypothese zu bestätigen (Schewe 2005).

5.2.3 Hämatokrit, hämodynamische Parameter und Rechtsherzhypertrophie im Tiermodell

Neben den durch die Apelin-Behandlung veränderten Expressionsmustern von NO-modulierenden Enzymen, wurden im Tiermodell physiologische und histologische Untersuchungen durchgeführt. Während die Apelin-Supplementation den Hämatokrit der Tiere aller Versuchsgruppen nicht beeinflussen konnte, konnte in den Wildtyp-Mäusen, verglichen mit ihren *Ddah1*-defizienten Geschwistertieren, ein reduzierter RVSP beobachtet werden. Die *Ddah1*-defizienten Tiere blieben von einer Apelin-Behandlung unbeeinflusst. Das lässt eine Beteiligung der *Ddah1* in der Regulation des RVSP durch Apelin vermuten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Apelin NO-abhängige vasodilative Eigenschaften besitzt (Tatemoto *et al.* 2001). Da eine Apelin-Behandlung in einer gesteigerten pulmonalen *Ddah1* Expression resultierte, die über einen erhöhten ADMA-Abbau eine NO-abhängige Vasodilation hervorruft, folgt möglicherweise durch eine Verabreichung von Apelin ein reduzierter RVSP. *Ddah1*-defiziente Tiere zeigten dagegen keine Expression der *Ddah1*, sodass dieser vasodilative Effekt ausblieb.

Die Analyse der Indices für eine rechtskardiale Hypertrophie zeigte, dass eine Behandlung mit Apelin sowohl in den Wildtyp- als auch in den *Ddah1*-defizienten Mäusen den Fulton-Index und das Verhältnis aus Gewicht des rechten Ventrikels und der Tibialänge reduziert. Bildete man das Verhältnis aus dem Gewicht des rechten Ventrikels und dem Körpergewicht der Tiere, so konnte eine Reduktion des Hypertrophie-Index nur in den Wildtyp-Tieren beobachtet werden. Das könnte an der Unspezifität des Hypertrophie-Index liegen, da das Körpergewicht eine sehr variable Größe darstellt. Analysen zeigten, dass die Gruppe der *Ddah1*-defizienten Mäuse, die Apelin appliziert bekamen, mehr männliche Tiere beinhaltete als die NaCl-Gruppe, die aus einem größeren Anteil weiblicher Tiere bestand. Dass die männlichen Tiere ein

höheres durchschnittliches Körpergewicht als die weiblichen Tiere aufweisen, könnte wiederum darauf hindeuten, dass der Hypertrophie-Index durch die Apelin-Behandlung unverändert blieb. Dass eine Apelin-Behandlung in einem reduzierten Fulton-Index und einem reduzierten Verhältnis aus dem Gewicht des rechten Ventrikels und der Tibiallänge in allen Versuchsgruppen resultierte, lässt auf eine *Ddah1*-unabhängige Regulation von Apelin hinsichtlich der Modulation einer Rechtsherzhypertrophie schließen. Ein Einfluss von Apelin konnte sowohl in den Wildtyp- als auch in den *Ddah1*-defizienten Tieren nachgewiesen werden, sodass davon ausgegangen werden könnte, dass trotz einer niedrigen Apelin-Plasmakonzentration der *Ddah1*-defizienten Mäuse die Apelin-Konzentration ausreichte, um apelinabhängige Veränderungen zu erzielen (siehe Abschnitt 5.2). Als weiterer Marker für eine Rechtsherzhypertrophie wurde die Kardiomyozytenfläche der Ventrikel analysiert. In allen Versuchsgruppen konnte eine Apelin-Behandlung im Vergleich zur NaCl-supplementierten Gruppe die Kardiomyozytenfläche sowohl im rechten als auch im linken Ventrikel und Septum reduzieren, wobei der Effekt im rechten Ventrikel in den Wildtyp-Tieren, verglichen mit ihren genetisch veränderten Geschwistern, stärker ausgeprägt war. Bildete man das Verhältnis der Zellfläche des rechten zum linken Ventrikel und Septum, so konnte eine apelinabhängige Reduktion nur in den Wildtyp-Tieren beobachtet werden. Anhanddessen könnte eine Beteiligung der *Ddah1* an der apelinabhängigen Regulation der Kardiomyozytenfläche vermutet werden. Da eine Apelin-Behandlung den RVSP *Ddah1*-abhängig senkt, könnte auch eine geringere Belastung des rechten Ventrikels resultieren, die sich wiederum in einer weniger ausgeprägten Kardiomyozytengröße in den Apelin-supplementierten Tieren widerspiegelt. Der RVSP blieb durch eine Apelin-Behandlung in den *Ddah1*-defizienten Tieren unbeeinflusst, sodass in den genetisch veränderten Tieren eine stärkere Belastung des rechten Ventrikels resultierte. Die Tiere, die das Verum appliziert bekamen, zeigten eine reduzierte Kardiomyozytenfläche, was auf einen protektiven Einfluss durch Apelin in Bezug auf eine Rechtsherzhypertrophie hindeuten könnte. Dass die Rechtsherzhypertrophie-Indices jedoch auch in den *Ddah1*-defizienten Mäusen, wenn auch nicht so stark ausgeprägt, durch Apelin-Behandlung reduziert werden, korreliert nicht mit der veränderten Kardiomyozytengröße. So könnten diese Indices, die das Gewicht des rechten Ventrikels widerspiegeln, vor allem auf *Ddah1*-unabhängige Mechanismen zurückzuführen sein.

5.2.4 Pulmonale Gefäß- und Alveolarveränderungen im Tiermodell

In Lungen von Patienten mit PAH finden sich Veränderungen der pulmonalen Gefäße wie einer Intimafibrose, Hypertrophie der Media oder auch *de novo* Muskularisierungen kleiner Pulmonalgefäße (Olschewski *et al.* 2001). Wie bereits in Abschnitt 5.1.4 beschrieben, führte eine Hypoxie-Exposition zu einer gesteigerten Intima-Mediadicke bei unveränderter

Adventitiastruktur. Zhang *et al.* konnten bereits zeigen, dass eine Apelin-Behandlung Proliferationsprozesse glatter Muskelzellen in einem hypoxischen Rattenmodell reduzieren kann (Zhang *et al.* 2014). Behandelte man die Tiere mit Apelin über einen Zeitraum von vier Wochen, so konnte in den Wildtyp-Mäusen eine reduzierte Intima-Mediadicke der Pulmonalarterien beobachtet werden. In den *Ddah1*-defizienten Mäusen konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Eine Hypoxie-Behandlung, der alle Tiere ausgesetzt waren, resultierte in einer gesteigerten Intima-Mediadicke, die laut der Arbeit von Frid und Kollegen durch eine reduzierte NO-Verfügbarkeit bedingt sein könnte (Frid *et al.* 2004). Dadurch, dass Apelin die *Ddah1* Expression beeinflusst, welche wiederum zu einer gesteigerten NO-Freigabe führt, könnte durch eine Behandlung mit Apelin die reduzierte Intima-Mediadicke der Pulmonalarterien bedingen. Die genetisch modifizierten Mäuse blieben aufgrund der *Ddah1*-Defizienz von der Apelin-Behandlung unbeeinflusst, sodass möglicherweise von einer Beteiligung der *Ddah1* an den medialen vasikulären Umbauprozessen auszugehen ist. Da der Unterschied aber sehr gering ausfiel, sind weitere Analysen notwendig, um die Hypothese zu bestätigen. Weder die Intima-Mediadicke der Bronchialarterien noch die Adventitiadicke wurden durch Apelin-Behandlung beeinflusst. Eine Apelin-Behandlung resultierte in den Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen in einem gesteigerten Anteil unmuskularisierter Pulmonalgefäße. Der Anteil muskularisierter Gefäße war in den genetisch veränderten Tieren erhöht. Ein gesteigerter RVSP, der unter Hypoxie-Exposition beobachtet wurde, geht mit einer vermehrten Muskularisierung der pulmonalen Gefäße einher, um möglicherweise dem hohen Druck entgegenzuwirken (Yamazato *et al.* 2009). Da eine Apelin-Applikation weiterhin den RVSP reduzieren konnte, konnte in den Apelin-behandelten Mäusen auch eine geringere Muskularisierung der Pulmonalgefäße gezeigt werden. Außerdem resultierte eine Behandlung mit Apelin in einer gesteigerten Gefäßanzahl pro definiertem Lungenabschnitt von 100 Alveolen, sodass Apelin auch mit einem protektiven Einfluss auf die Gefäßstruktur assoziiert werden könnte. Die Alveolarstruktur, analysiert anhand des *Radial alveolar count*, blieb durch die Apelin-Applikation unbeeinflusst.

Die strukturellen Veränderungen, die mit einer PAH einhergehen, werden häufig mit einer vermehrten Synthese von Bindegewebsstrukturen assoziiert (Hislop und Reid 1976; Kerr *et al.* 1987). Im hier verwendeten Tiermodell konnte durch eine Verabreichung von Apelin eine Reduktion der pulmonalen *Col4a1* mRNA Synthese in den Wildtyp-Mäusen gezeigt werden. Dass dieser Effekt nicht in den genetisch veränderten Tieren beobachtet werden konnte, lässt auf eine mögliche Beteiligung der *Ddah1* in der *Col4a1* mRNA Expression durch Apelin schließen.

Der PI3K/AKT-Stoffwechselweg wird häufig als möglicher Signalweg in der Regulation von Apelin beschrieben. Um zu analysieren, welchen Einfluss Apelin in diesem Zusammenhang

besitzt, wurde die durch Apelin-Behandlung veränderte Phosphorylierung von Proteinen, die an diesem Signalweg beteiligt, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Apelin-Behandlung sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie die Phosphorylierung der Glykogensynthase-Kinase- (GSK) 3 alpha und beta sowie der ribosomalen Protein S6 Kinase steigert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der PI3K/AKT Signalweg an der apelinergen Regulation beteiligt ist. Zur Verifizierung der Daten wurden HPMEC mit einem GSK-Inhibitor behandelt und die Expression der DDAH-Enzyme analysiert, was in einer gesteigerten Expression der DDAH2 bei unveränderter DDAH1-Expression resultierte. Die ADMA-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurden durch die Behandlung des GSK-3 Inhibitors reduziert. Die GSK stellt ein inhibitorisches Protein in diesem Signalweg dar, sodass eine Inhibition den nachgeschalteten Signalweg aktiviert. Dass diese Inhibition in einer gesteigerten Expression der DDAH2 und reduzierten ADMA-Konzentrationen resultiert, könnte darauf hindeuten, dass die DDAH2 ein Zielmolekül dieses Stoffwechselweges darstellt. Da dieser Effekt jedoch nicht hinsichtlich der DDAH1 Expression gezeigt werden konnte und der verwendete GSK-Inhibitor keine spezifische Inhibition hervorruft, bedarf es weitere Analysen, um diese Hypothese zu bestätigen.

5.3 Apelin als Modulator parakriner Mechanismen

Proliferations- und Migrationsprozesse sowie der Influx von inflammatorischen Zellen ins pulmonale Gewebe werden als weitere Ursache pulmonaler Gefäßveränderungen, die mit einer Muskularisierung und einer gesteigerten Synthese von Bindegewebsstrukturen charakterisiert sind, assoziiert. Die alternativ aktivierten Makrophagen (M2) sind neben der Synthese von Zytokinen auch an der Induktion der Synthese extrazellulärer Matrix beteiligt (Gratchev *et al.* 2001; Schnoor *et al.* 2008). Ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, die fibrillären Kollagene, werden von M2-Makrophagen gebildet und spielen eine Rolle in der Bildung artherosklerotischer Plaques (Weitkamp *et al.* 1999). Im vorliegenden Makrophagen-Modell wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von gesunden Probanden und PAH-Patienten isoliert und mittels M-CSF- und IL-4-Inkubation zu M2-Makrophagen differenziert. Zur Analyse der Polarisierung der Makrophagen in den M2a-Subtyp, wurden die Zellen auf spezifische Oberflächenmarker (CCL22, TGM2) untersucht, die nur in den M2-Makrophagen nachgewiesen werden konnten (ergänzende Daten, Abschnitt 8.1.4).

5.3.1 Regulation des Apelin-Rezeptors

Da bereits im Zellkulturmodell gezeigt werden konnte, dass eine Hypoxie-Exposition zu einer gesteigerten APLNR-Expression führt, sollte nun die APLNR-Expression auf der Oberfläche von *ex vivo* generierten M2-Makrophagen analysiert werden. PAH-Patienten zeigten eine reduzierte Apelin-Plasmakonzentration, während der APLNR auf der Makrophagenoberfläche vermehrt exprimiert wurde. Dies könnte mit einem Kompensationsmechanismus zu erklären sein, da reduzierte Apelin-Konzentrationen in einer reduzierten NO-abhängigen Vasodilatation resultieren.

5.3.2 Zytokinexpression

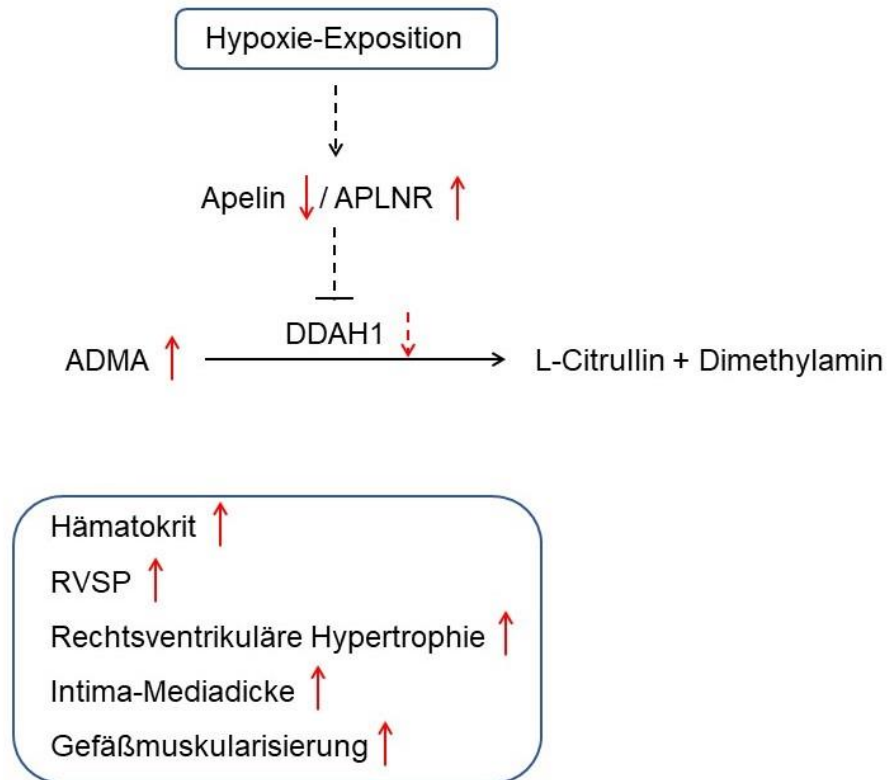
PAH-Patienten zeigen gesteigerte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, die bereits mit inflammatorischen Infiltraten assoziiert werden konnten (Cool *et al.* 1997; Sanchez *et al.* 2007). Tudor und Kollegen konnten weiterhin in plexiformen Läsionen inflammatorische Infiltrate, bestehend aus T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen, bei gleichzeitiger gesteigerter Intima- und Mediaproliferation nachweisen (Tudor *et al.* 1994; Stacher *et al.* 2012). Im Rahmen eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass alternativ aktivierte M2-Makrophagen unter hypoxischen Bedingungen Gene exprimieren, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind (Vergadi *et al.* 2011). Izzüt-Uysal und Kollegen konnten weiterhin einen Zusammenhang zwischen reduzierten TNF- α - und IL-6-Konzentrationen und Apelin herstellen (Izzüt-Uysal *et al.* 2017). In anderen Tiermodellen resultierte eine Apelin-Behandlung in einer verminderten Zytokin-Produktion (Horiuchi *et al.* 2003; Leeper *et al.* 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass M2-Makrophagen, isoliert aus dem Blut eines PAH-Patienten, im Vergleich zu den Makrophagen eines gesunden Probanden gesteigerte Zytokinkonzentrationen freisetzen. Zytokine wie IL-17E, CC-Chemokinligand (CCL) 1, Makrophagen-Chemoattraktorprotein (MCP) 1 und CXC-Chemokinligand (CXCL) 1 konnten dagegen im Zellkulturüberstand der Makrophagen, die die Kontrollgruppe darstellten, nicht nachgewiesen werden. Eine Apelin-Behandlung der Makrophagen resultierte in einer reduzierten Freisetzung der Zytokine in den Zellkulturüberstand von Makrophagen eines gesunden Probanden und eines PAH-Patienten. Durch eine Apelin-Behandlung der Makrophagen war die Expression von CCL1, IL-16, MCP1 und CXCL1 nicht mehr nachweisbar. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde im Anschluss die mRNA Expression von IL-13, IL-16 und CXCL1 von Makrophagen aus dem Blut von PAH-Patienten analysiert. Auch hier konnte eine reduzierte Zytokin-Expression beobachtet werden.

5.3.3 Kollagen-Metabolismus

Eine PAH ist unter anderem durch pulmonale Vasokonstriktion und vaskuläre Umbauprozesse charakterisiert. PAH-Patienten zeigen im Vergleich zu gesunden Probanden eine geringere Konzentration des vasodilatativen und antiproliferativen Moleküls NO. Damit assoziiert, konnte in PAH-Patienten ein vermehrtes Auftreten von Proliferationsprozessen, hypertrophen Prozessen und eine gesteigerte Expression des *Transforming growth factor-β* (TGF-β) sowie Proteinen der extrazellulären Matrix wie Elastin oder Fibronectin nachgewiesen werden (Chazova *et al.* 2000). Makrophagen sind neben der Synthese von Zytokinen auch an der Bildung extrazellulärer Matrix beteiligt (Gratchev *et al.* 2001; Schnoor *et al.* 2008). So konnten Stacher und Kollegen eine Korrelation zwischen inflammatorischen Infiltraten und vaskulären Umbauprozessen in Intima und Media von PAH-Patienten feststellen (Stacher *et al.* 2012). Makrophagenakkumulationen und -aktivierungen führen häufig zur Freisetzung von Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies und vasoreaktiven Molekülen, wie Endothelin und Eicosanoide, die eine entscheidende Rolle in vaskulären Umbauprozessen spielen (Abschnitt 5.1.2; Burke *et al.* 2009; Hall *et al.* 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Makrophagen unter anderem Fibronectin und Adiponektin freisetzen, die an der Bildung extrazellulärer Matrix beteiligt sind (Nathan 1987). Die Arbeitsgruppe um Zhang konnte bereits zeigen, dass eine Apelin-Behandlung Proliferationsprozesse glatter Muskelzellen in einem hypoxischen Rattenmodell reduzieren kann (Zhang *et al.* 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Überstand von M2-Makrophagen die Konzentration an fibrillären Kollagenen bestimmt, die einen wesentlichen Bestandteil extrazellulärer Matrix ausmachen. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen, isoliert aus dem Vollblut von PAH-Patienten, wesentlich mehr Kollagen freisetzen, was wiederum durch eine Behandlung mit Apelin reduziert werden kann. Auch Wang *et al.* konnten bereits eine Apelin-assoziierte Reduktion von TGF-β, einem Zytokin, welches unter anderem an Proliferationsprozessen beteiligt ist, nachweisen. Eine Beteiligung des TGF-β-Signalweges am apelinergen System wird vermutet. Eine Apelin-Behandlung zeigte somit in dem hier verwendeten Modell präventive Eigenschaften hinsichtlich vaskulärer Umbau- und Proliferationsprozesse.

Es konnte im Rahmen dieser Dissertation Apelin als mögliches Zielmolekül weiterer Forschung zur Entwicklung von Pharmakotherapieoptionen zur Behandlung der Pulmonalen Arteriellen Hypertonie gefestigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Apelin insbesondere hinsichtlich hämodynamischer Parameter eine entscheidende Rolle spielt und auch eine Rechtsherzhypertrophie sowie proliferative Prozesse positiv zu beeinflussen vermag. Der Einfluss der Hypoxie-Exposition sowie der Apelin-Behandlung sind in Abbildung 5.1 graphisch dargestellt. Eine ausgeprägte Beteiligung der DDAH bezüglich der protektiven Eigenschaften Apelins konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

A



B

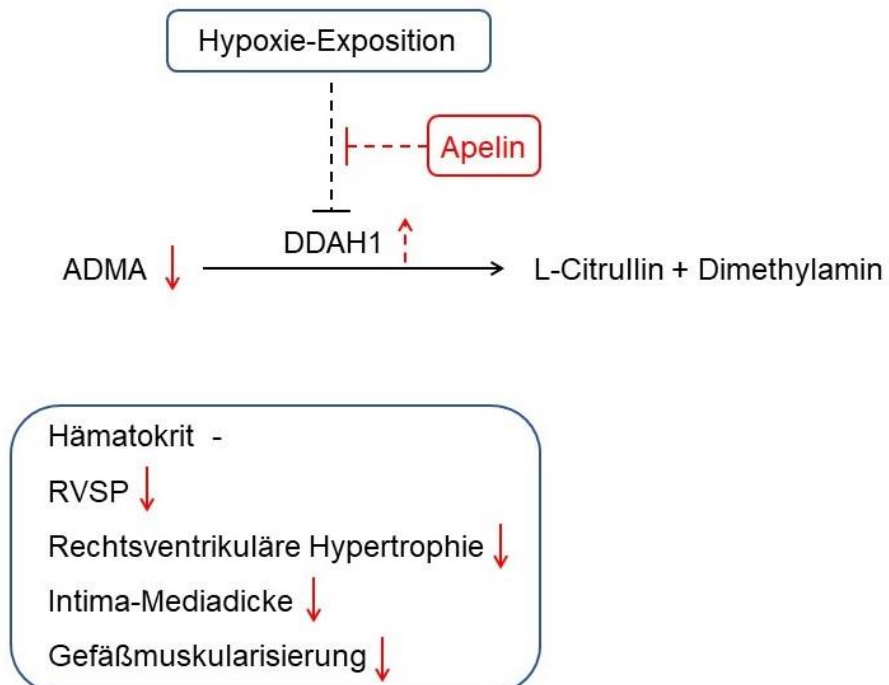


Abbildung 5.1: Graphische Darstellung der Ergebnisse. **A.** Einfluss einer Hypoxie-Exposition und **B.** einer Apelin-Behandlung auf den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg sowie hämodynamische Parameter im Tiermodell.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Substanzen

[² H ₆]-ADMA	-	Eigene Herstellung
L-[² H ₇]-Arginin	-	Euriso-TOP GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Acetonitril (AcN)	H: 225, 302+312+332, 319 P: 210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Acetylchlorid	H: 225, 314 P: 210, 260, 280, 305+351+338, 370+378, 403+235	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Agarose, Standard	-	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure	H: 226, 302, 314, 331 P: 210, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 403+233	Fluka Chemie, Steinheim, Deutschland
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	H: 272, 302, 315, 317, 319, 334, 335 P: 261, 280, 302+352, 305+351+338, 332+313, 337+313	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
(Pyr ¹ -) Apelin (<i>human, bovine, mouse, rat</i>)	-	Bachem AG, Bubendorf, Schweiz
Betaisodona® Lösung (Povidon-Iod)	-	Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland
Bis-Acrylamid-Lösung 40%, Rotiphorese® Gel 40	H: 350, 340, 361f, 301, 372, 332, 312, 319, 315, 317 P: 201, 280, 301+310, 305+351+338, 308+313	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	H: 360 P: 280, 308+313	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V, ≥98%	-	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Bradford Reagenz	H: 226, 332, 314, 370 P: 210, 303, 361+353, 305+351+338, 310, 405, 501	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Buprenorphin-HCl, Buprenovet®	H: 302, 332, 334 P: 260, 305, 351, 313	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Butanol für HPLC	H: 226, 302, 315, 318, 335, 336 P: 210, 280, 302+352, 305+351+338, 310	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform, ≥99%	H: 302, 315, 319, 331, 351, 361d, 372 P: 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Cryo-SFM Einfriermedium	-	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Cutasept® F	-	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
2,3-Diaminonaphthalin (DAN)	H: 302, 315, 319, 350, 335 P: 201, 280, 301+312+330, 305+351+338, 308+313	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	-	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DNA-Loading Dye, 6x	-	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ebselen, ≥98%	H: 301, 331, 373, 410 P: 261, 273, 301+310, 311, 501	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
<i>Endothelial Cell Growth Medium MV</i>	-	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure, 100%	H: 226, 290, 314 P: 210, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, ≥ 99%	H: 225, 319 P: 210, 240, 305+351+338, 403+233	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	-	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland

Fetales Kälberserum (FBS)	-	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung 4%, Roti®-Histofix 4%	H: 302, 317, 341, 350 P: 261, 280, 302+352, 308+313	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gibco™ RPMI Medium 1640	-	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Glycerol	-	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	-	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
GSK-3-Inhibitor I	-	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Heparin-Natrium 250.000 I.E.	-	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
HEPES-BSS	-	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Interleukin 4 (IL-4)	-	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Isofluran, Forene®	H: 319, 335, 336 P: 264, 280, 235+2351+338, 337+313, 261, 271, 304+340, 312, 403+233, 405, 501	Abbott GmbH & Co. KG, Hannover, Deutschland
<i>Lymphocyte Separation Medium 1077</i>	-	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i> , human, rekombinant	-	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
2-Mercaptoethanol	H: 301, 310, 315, 317, 318, 331, 373, 410 P: 273, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Metamizol-Natrium, 500 mg/mL	-	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Methanol (MeOH)	H: 255, 301, 311, 331, 370 P: 210, 280, 301+310, 303+361+353, 308+311	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

Milchpulver	-	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	H: 300, 310, 373, 410 P: 273, 280, 301+310, 302+352, 310, 405	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	-	Avantor Materials B.V., Deventer, Niederlande
Natriumchlorid (NaCl), 0,9%	-	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	H: 302, 315, 318, 412 P: 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 332+313	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH), Plätzchen	H: 290, 314 P: 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit (NaNO ₂)	H: 272, 301, 400 P: 273, 309+310	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; 9,55 g/L)	-	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/10 mg/mL)	H: 317, 334, 360, 371 P: 302+352, 304+340, 201, 260, 333+313, 261	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ponceau S	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> Tabletten, PhosStop	H: 302 P: 264, 270, 301+312, 330, 501	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Proteinase K	H: 334 P: 261, 342+311	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
2-Propanol	H: 225, 319, 336 P: 210, 261, 305+351+338	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RBC <i>Lysis Buffer</i> , 10x	H: 400, 411 P: 273, 391, 501	BioLegend, San Diego, CA, USA
Roti®-GelStain	-	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Salzsäure (HCl), 37 %	H: 290, 314, 335 P: 280, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff, flüssig (N ₂)	H: 281 P: 281, 336+315, 403	TMG, Krefeld, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	H: 225, 302+332, 314 P: 210, 240, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trichloressigsäure	H: 314, 335, 410 P: 273, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	H: 315, 319, 335 P: 280, 302+352, 305+351+338	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin / EDTA (0,04%/ 0,03%)	-	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Trypsin Neutralizing Solution</i>	-	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Urethan	H: 302, 350 P: 201, 308+313	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Wasser, demineralisiert (dH ₂ O)	-	Eigene Herstellung
Wasser, für HPLC	-	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

6.1.2 Geräte

ABI Prism® 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Abzug, VintAIR 9000	Vinitex Laboratoriuminrichtungen BV, Sint-Oedenrode, Niederlande
<i>ADVantage Pressure Volume System</i>	Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA
Analysenwaage, CP 225 D	Sartorius Lab Instruments, Göttingen, Deutschland
Autoclav, EVO 120	MediTech Service GmbH, Norderstedt, Deutschland
ChemiDoc Touch™ Imaging System	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Dewartransportgefäß Typ 1B	KGW Isotherm, Karlsruhe, Deutschland
Durchflusszytometer LSR Fortessa	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Eismaschine, Scotsman® AF103	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
Elektrophoresekammer, Sub-Cell® GT	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr, Bieberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank, -80 °C	Sanyo Electric Co., Osaka, Japan
Gelträger, <i>Sub-Cell GT UV-Transparent Gel Tray</i> + 15-well Kamm	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Heizblock, <i>dry bath</i> FB 15103	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlaggregat	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Bieberach an der Riß, Deutschland

LC-MS/MS (Varian 1200L Triple Quadrupole MS)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Luftsauerstoffmessgerät, GMH3691	Greisinger, Regenstauf, Deutschland
Magnetrührer, Combimag RCT	IKA-Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mastercycler® ep gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mehrfachdispenser, HandyStep®	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Messsschieber, digital (0-100 mm)	Pollin Electronic, Pförring, Deutschland
Mikroskop, Axiokop 2	Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop, Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland
Mini Protean® 3 System, Glasplatten	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini Protean® 3 System, 10-well Kamm	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini Protean® 3 System, 15-well Kamm	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini TransBlot® Cell	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
MiniVent® Maus-Ventilator, Typ 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Mirax MIDI® Digital Slide Scanner	Carl Zeiss MicroImaging, Oberkochen, Deutschland
NanoDrop® ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PH-Meter, Five-Easy™ FE20	Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Deutschland
Pipetten, Eppendorf <i>reference</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

Pipetten, Eppendorf <i>research pro</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe, accu-jet® pro	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Plattformschüttler, Titramax 101	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Präzisionswaage, BP3100S	Sartorius Lab Instruments, Göttingen, Deutschland
Rasierer, Aesculap Exacta GT 415	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Reagenzglasschüttler, REAX top	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
SEALSAFE® Plus Käfige, GM500	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Spannungsgerät, Biometra PowerPack P25	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Spannungsgerät, PowerPac Basic	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Sterile Werkbank, Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tageslichtlampe	Lumie, Cambridge, UK
Taumelrollenmischer, RM5-V30	CAT, Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Tecan Safire II Basic	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Tecan Sunrise™	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TissueLyser®	Quiagen, Hilden, Deutschland
Vevo Compact Dual Anesthesia System	Visualsonics, Toronto, Kanada

Wärmeplatte, <i>Vevo Mouse Handling Table</i>	Visualsonics, Toronto, Kanada
Wasseraufbereitungssystem, <i>Ultra-pure Milli-Q</i>	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge, Rotina 35 R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge, Haemaokrit 20	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zählkammer, Neubauer 0,100 mm; 0,0025 mm ²	Marienfeld Superior, Lauda Königshofen, Deutschland
Zentrifugen, <i>Centrifuge</i> 5415 D, 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, Rotina 35 R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland

6.1.3 Software

Axiovision Rel, Version 4.8	Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland
Citavi 5	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Graph Pad Prism® 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Image J®	National Institute of Health, Bethesda, MD, USA
Image Lab™ Software	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
lox 2.9.5.68	Emka Technologies, Paris, Frankreich
Magellan™ Data Analysis Software	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Microsoft Office (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft, Redmond, WA, USA
Mirax MIDI control software, Version 1.10	Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland
ND-1000, Version 3.8.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Panoramic Viewer	3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn
Primer-BLAST	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MA, USA
SDS, Version 2.4	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Varian MS Workstation, Version 6.9	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

6.1.4 Verbrauchsmaterialien

96-well-Platte, schwarz	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
96-well-Platte, transparent	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
96-well Polypropylenplatte	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
384-well Multiply®-PCR-Platte	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Autosamplergefäße	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Azlet®-Pumpen, Modell 1004	DURECT Cooperation, Cupertino, CA, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen, 8 mL, Rundboden	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen, 15 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Filterpapier, Whatman™	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
Glasgeräte	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Handschuhe, Nitril	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Haematokrit-Kapillaren	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Haematokrit-Versiegelungskit	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Kanülen, Sterican® (20G / 27G / 30G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kapillarröhrchen	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland

Material und Methoden

Kryogefäße 1,6 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Microvette® 500 K3E	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Multiply®-µStripPro 8er-Ketten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
MultiScreen 96-well Filterplatte	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Nahtmaterial, Dafilon blau 4/0, 45 cm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Nitrozellulosemembran, Whatman™	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Parafilm	American National Can™, Greenwich, CA, USA
Pasteur-Pipetten	Brand GmbH + Co- KG, Wertheim, Deutschland
PCR-Klebefolien, optisch klar	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, 10 µL, 100 µL, 1000 µL, 5000 µL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Polaris C18-Ether (50x2 mm)	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
RNAse ZAP® Wipes	Ambion GmbH, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Skalpellklinge BAYHA®, steril	Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
S-Monovetten® EDTA	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen, Omnifix®, 1 mL, 10 mL, 20 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

VenflonPro Safety Venenverweilkatheter	BD, Heidelberg, Deutschland
Venofix® A Venenpunktionsbesteck	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Wattestäbchen	Kart Beese Verbandstoffe GmbH & Co. KG, Barsbüttel, Deutschland
Wundclip-Applikator Reflex, 7mm	Cell Point Scientific, Gaithersburg, MD, USA
Wundclips Reflex, 7mm	Cell Point Scientific, Gaithersburg, MD, USA
Zellkulturflasche Standard, T 25, T 75, T175	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche Cell+, T25, T75	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale 6-well, Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale 6-well, Cell+	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellstofftupfer, Pur-Zellin 4,5x5 cm	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Zorbax SB-C8	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

6.1.5 Kits

Amersham® ECL Western Blotting Analysis System	-	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Apelin-12 (<i>Human, Rat, Mouse, Bovine</i>) EIA Kit	-	Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA
<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	H: 360, 351 P: 201, 202, 280, 308 + 313, 314	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>Human Cytokine Array Kit, Panel A</i>	-	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
KAPA® 2G <i>Fast Genotyping Mix with dye</i>	H: 301, 370 P: 270, 264, 310, 312, 330	KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA
Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	-	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
NucleoSpin® RNA Isolation Kit	H: 225, 319, 335, 351, EUH019, EUH066 P: 201, 202, 210, 261, 264, 271, 280, 304+340, 305+351+338, 308+313, 312, 337+313, 370+378, 403+235, 405	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
PathScan® Akt Signaling Antibody Array Kit	-	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
RNAzol® B	H: 302, 312+332, 314, 341, 373, 411 P: 201, 280, 303+361+353, 304+340, 310, 305+351+338, 50	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland
Sircol™ Soluble Collagen Assay	H: 314 P: 264, 280, 301+330+331, 305+351+338, 501	Biocolor, Carrickfergus, UK

6.1.6 Lösungen und Puffer

Lösung	Zusammensetzung		
Acetonitril, 80%	Acetonitril	80% (v/v)	80 mL
	Wasser für HPLC		ad 100 mL
Agarosegel, 1%	Agarose	1% (m/v)	1 g
	Roti® GelStain	5‰ (v/v)	5 µL
	TBE-Puffer, 0,5x		ad 100 mL
APS, 10%	APS	10% (m/v)	1 g
	dH ₂ O		ad 10 mL
Blockierlösung	BSA/Milchpulver	5% (m/v)	2,5 g
	TBS-T		ad 50 mL
Butanolische Salzsäure (1 mol/L)	Acetylchlorid	10% (v/v)	100 mL
	Butanol		ad 1 L
<i>Digestion Buffer</i>	NaCl	250 mmol/L	14,6 g
	SDS	0,2% (m/v)	2,0 g
	EDTA	5 mmol/L	2,0 g
	Tris-HCl	100 mmol/L	12,11 g
	dH ₂ O		ad 1 L
2,3-Diaminonaphthalin, 100 mmol/L	2,3-Diaminonaphthalin		15,82 mg
	DMSO		ad 1 mL
EDTA, 0,5 mol/L	EDTA		146,12 g
	dH ₂ O		ad 1 L
Ethanol, 70%	Ethanol	70% (v/v)	70 mL
	dH ₂ O		ad 100 mL
FACS-Puffer	NaN ₃	3 mol/L	0,1 g
	BSA		0,5 g
	PBS		ad 500 mL
LC-MS/MS-Probenpuffer	Methanol	50% (v/v)	50 mL
	dH ₂ O		ad 100 mL
<i>Low-TE Buffer</i>	EDTA	0,5 mmol/L	14,61 mg
	Tris-HCl	5 mmol/L	60,57 mg
	dH ₂ O		ad 100 mL

Material und Methoden

<i>Lower</i> Tris-Puffer, pH 8,8	Tris-HCl	1,5 mol/L	18,17 g
	SDS, 20%	2% (v/v)	2 mL
	dH ₂ O		ad 100 mL
Lysis-Puffer	SDS	20% (v/v)	2 mL
	Proteaseinhibitor		1 Tablette
	dH ₂ O		ad 10 mL
NaOH, 2 mol/L	NaOH	4% (m/v)	2 g
	dH ₂ O		50 mL
NaNO ₂ , 10 mmol/L	NaNO ₂		13,8 mg
	dH ₂ O		ad 2 mL
PBS-Tween (PBS-T)	Tween 20	1% (v/v)	10 mL
	PBS		ad 1 L
Ponceau S-Lösung	Ponceau S	0,1% (m/v)	0,1 g
	Essigsäure	5% (v/v)	5 mL
	dH ₂ O		ad 100 mL
Sammelgel, 4%	Glycerin/H ₂ O, 50%		1,285 mL
	Bis-Acrylamid, 40%		0,2 mL
	Upper Tris-Puffer		0,5 mL
	TEMED		2 µL
	APS 10% (m/v)		15 µL
<i>Sample Buffer</i>	Glycerin/H ₂ O, 50%	20% (v/v)	2 mL
	SDS, 20%	15% (v/v)	1,5 mL
	Upper Tris-Puffer	12,5% (v/v)	1,25 mL
	2-Mercaptoethanol	5% (v/v)	0,5 mL
	dH ₂ O		ad 10 mL
SDS-PAGE Laufpuffer	Tris-Glycin-Puffer, 10x	10% (v/v)	100 g
	SDS, 20%	20% (v/v)	5 mL
	dH ₂ O		ad 1 L
SDS-Puffer, 0,2%	SDS	0,2% (v/v)	0,1 g
	Proteaseinhibitor		1 Tablette
	dH ₂ O		ad 50 mL
SDS-Puffer, 20%	SDS	20% (v/v)	20 g
	dH ₂ O		ad 100 mL

TBE-Puffer, 10x	Tris-HCl	0,9 mol/L	109,03 g
	Borsäure	0,89 mol/L	55,03 g
	EDTA, 0,5 mol/L	4% (v/v)	40 mL
	dH ₂ O		ad 1 L
TBS, 10x, pH 7,6	Tris-HCl	0,2 mol/L	24,23 g
	NaCl	1,37 mol/L	80,0 g
	dH ₂ O		ad 1 L
TBS-Tween (TBS-T)	Tween 20	1% (v/v)	10 mL
	TBS, 1x		ad 1 L
Transferpuffer	Tris-Glycin-Puffer, 10x		100 mL
	Methanol		200 mL
	dH ₂ O		ad 1 L
Trenngel, 12,5%	Glycerin/H ₂ O, 50%		2,69 mL
	Bis-Acrylamid, 40%		1,95 mL
	Lower Tris-Puffer		1,58 mL
	TEMED		3 µL
	APS, 10% (m/v)		32 µL
Trenngel, 15%	Glycerin/H ₂ O, 50%		2,34 mL
	Bis-Acrylamid, 40%		2,30 mL
	Lower Tris-Puffer		1,58 mL
	TEMED		3 µL
	APS, 10% (m/v)		32 µL
Tris-Glycin-Puffer, 10x	Tris-HCl	25 mmol/L	302,85 mg
	Glycin	0,2 mol/L	1,5 g
	dH ₂ O		ad 100 mL
<i>Upper</i> Tris-Puffer, pH 6,8	Tris-HCl	0,5 mol/L	6,06 g
	SDS, 20%	2% (v/v)	2 mL
	dH ₂ O		ad 100 mL

6.1.7 Antikörper

6.1.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Anwendung	Spezies	Klonalität	Hersteller
APC <i>Anti-human</i> APJ (FAB856A)	FACS	Maus	Monoklonal	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
APC <i>Anti-human</i> CD45 (FAB1430A)	FACS	Maus	Monoklonal	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Apelin-Rezeptor (PA5-21306)	Immunoblot	Kaninchen	Polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Beta Tubulin (ab6046)	Immunoblot	Kaninchen	Polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
DDAH1 (C-term.; AP2898b)	Immunoblot	Kaninchen	Polyklonal	Abgent, San Diego, CA, USA
DDAH2 (ab1383)	Immunoblot	Ziege	Polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
eIF4e (9742)	Immunoblot	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
FITC <i>Anti-human</i> CD11b (301305)	FACS	Maus	Monoklonal	BioLegend, San Diego, CA, USA
FITC <i>Anti-human</i> CD45 (304005)	FACS	Maus	Monoklonal	BioLegend, San Diego, CA, USA
PE <i>Anti-human</i> CD14 (201805)	FACS	Maus	Monoklonal	BioLegend, San Diego, CA, USA
PE <i>Anti-human</i> CD45 (304007)	FACS	Maus	Monoklonal	BioLegend, San Diego, CA, USA

6.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Anwendung	Spezies	Klonalität	Hersteller
<i>Anti-goat IgG</i>	Immunoblot	Affe	Polyklonal	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
<i>Anti-rabbit IgG</i>	Immunoblot	Ziege	Polyklonal	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA

6.1.8 DNA- und Proteinmolekulargewichtsmarker

GeneRuler™ 100 bp	DNA <i>ladder</i>	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
GeneRuler™ 1 kb	DNA <i>ladder</i>	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Protein <i>ladder</i> (10-170 kDa)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Protein <i>ladder</i> (10-250 kDa)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

6.1.9 Biologisches Material

6.1.9.1 Endotheliales Zellkulturmodell

Humane Pulmonale Mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC) sind primäre, adhärenente Endothelzellen, gewonnen aus der Lunge eines weiblichen 56-jährigen Spenders, die von der Firma Promocell bezogen wurden. Die verwendeten Zellen besitzen eine Populationsverdopplungszeit von 21,5 Stunden und eine Viabilität von 78%. Für die meisten Experimente dieser Arbeit wurden die HPMEC Zellen in der Passage 3-8 verwendet.

Die Zellen, die zur Langzeitkonservierung in flüssigem Stickstoff eingefroren waren, wurden bei 37 °C aufgetaut und in *Endothelial Cell Growth Medium MV*-Komplettmedium (Tabelle 6.1) bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte in einer T75 Zellkulturflasche kultiviert.

Tabelle 6.1: Zusammensetzung *Endothelial Cell Growth Medium MV*-Komplettmedium, 500 mL.

<i>Endothelial Cell Growth Medium MV</i>		470 mL
<i>Supplement Mix</i>	2,5% (v/v)	25 mL
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)	5 mL

Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt. Bei Erreichen einer 80% igen Konfluenz wurden die Zellen mit HEPES-BSS-Puffer gewaschen und zur Ablösung vom Boden der Zellkulturflasche kurzzeitig mit 3 mL Trypsin/EDTA (5 min, 37 °C) behandelt. Um den Verdau zu stoppen wurde anschließend die gleiche Menge *Trypsin Neutralizing Solution* hinzugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit der Zellsuspension vermengt, welche in ein 15 mL Falcon-Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Zellen wurden bei 800 U/min zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in *Endothelial Cell Growth Medium MV*-Komplettmedium resuspendiert und mit einer Zelldichte von 25.000 Zellen/cm² auf eine 6-well Zellkulturplatte ausgesät.

Zur weiteren Kultivierung wurden die HPMEC im Verhältnis von 1:3 gesplittet und weiterhin in T75-Zellkulturflaschen kultiviert.

Die Zellen wurden mit Apelin (10 pmol/L), Ebselen (20 µmol/L) und dem GSK-Inhibitor I (50 µmol/L) behandelt. Die Inkubation erfolgte über sechs Stunden. Zellen, die sowohl mit Apelin als auch mit Ebselen behandelt werden sollten, wurden zunächst für 30 Minuten mit Ebselen behandelt und anschließend für 6 Stunden mit Apelin und Ebselen inkubiert.

Zur Langzeitkonservierung wurde ein Zellpellet mit 1 mL Cryo-SFM Einfriermedium versetzt und in einem 2-Propanol-haltigen Einfriergefäß für zwei Stunden bei -20 °C und für acht Stunden bei -80 °C heruntergekühlt, um anschließend in einem Tank, gefüllt mit flüssigem Stickstoff, langfristig aufbewahrt zu werden.

6.1.9.2 Patientendaten

Für die Untersuchungen an M2-Makrophagen wurden Blutproben von PAH-Patienten und gesunden Probanden eingesetzt. Für die Patienten ergaben sich keinerlei zusätzliche Risiken und Belastungen. Nach adäquater Aufklärung der Patienten durch Dr. Lars Harbaum wurde eine entsprechende Einwilligung abgegeben. Das Patientenkollektiv setzte sich aus ambulant behandelten Patienten zusammen, bei denen eine Form der Pulmonalen Hypertonie in der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik, Abteilung für Pneumologie, des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf diagnostiziert wurde. Es wurden Patienten im Alter von 17 bis 80 Jahren (Ø 53 Jahre) eingeschlossen, die sich laut der WHO-Klassifizierung in Klasse II oder höher befanden. 72,8% der Patienten waren weiblich.

6.1.9.3 Tiermodell

Die Mausversuche wurden nach Antragstellung vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Genehmigungs-Nummer 02/16) und erfolgten gemäß der aktuell geltenden tierschutzrechtlichen Bedingungen des Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um C57BL/6J Mäuse, bei denen das *Ddah1* Gen global ausgeschaltet wurde. Die Generierung dieser *Ddah1*-defizienten Mäuse (*Ddah1*^{-/-}; *Ddah1-Knockout*) erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. YinJie Chen¹ der Universität Minnesota, USA. Es handelt sich um eine globale *Ddah1*-Defizienz, die unter Verwendung des loxP-Systems und Flankierung des Exon 4 generiert wurde (Hu *et al.* 2011). Die *Ddah1*^{flox/flox}-Mäuse wurden mit Protamin-Cre transgenen Tieren gekreuzt, wodurch die Heterozygotie der *Ddah1*-defizienten Mäuse erzielt wurde (*Ddah1*^{+/-}). Anschließend wurde nach Inzucht-Verpaarung der heterozygoten Tiere der homozygote Zustand erreicht. Als Kontrolle dienten genetisch unveränderte C57BL/6J-Mäuse.

Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet und während des Versuches in der Barriere 1 des Campus Forschung, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, in SEAL-SAFE® Plus-Käfigen gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter (Altromin GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und Wasser. Das Wohlbefinden der Tiere wurde täglich kontrolliert und dokumentiert. Alle drei Tage wurde das Wasser der Tiere

ausgetauscht, bei Bedarf wurde der Futtervorrat aufgefüllt. Weiterhin wurde einmal wöchentlich der Käfig gereinigt und den Tieren neues Nestmaterial zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden bei 20 ± 2 °C bei einer Luftfeuchte von 45-65% gehalten und unterlagen einem Tag/Nacht-Zyklus mit einer Lichtphase von 6:00 bis 18:00 Uhr. Die Umgebungsluft der Tiere, die unter unveränderten Sauerstoffbedingungen gehalten wurden, wies einen Sauerstoffgehalt von 20,95% auf. Die Umgebungsluft der Versuchsgruppe, die für vier Wochen unter Hypoxie-Exposition gehalten wurde, zeigte einen reduzierten Sauerstoffgehalt. Diese Versuchsgruppe wurde in speziellen, modifizierten SEAL-SAFE® Plus-Käfigen gehalten, die sowohl an die Luftdruck- als auch an die Stickstoffversorgung angeschlossen waren (Abbildung 6.1). Ein Mischventil sorgte für die Durchmischung der Gase, sodass ein Sauerstoffgehalt von $10 \pm 1\%$ in den Käfigen resultierte. Die Konzentration wurde während des gesamten Versuches mithilfe eines Sauerstoffmessgerätes überwacht. Die Tiere wurden im Alter von neun Wochen für die tierexperimentellen Versuche verwendet und verblieben für vier Wochen im Versuch.

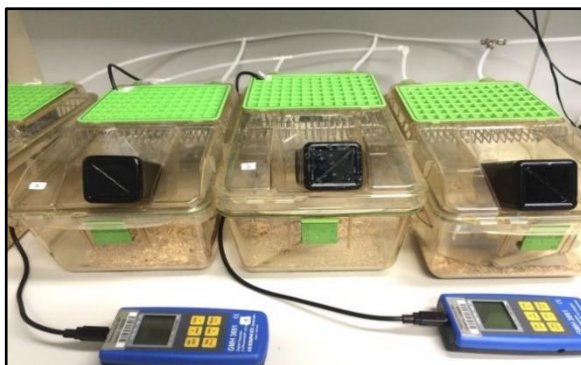


Abbildung 6.1: Modifizierte Hypoxie-Käfige mit integrierten Sauerstoffmessgeräten. Die luftdichten Käfige wurden zur Gewährleistung eines konstanten Sauerstoffgehaltes von 10% sowohl an die Druckluft als auch an die Stickstoffzufuhr angeschlossen. Der Sauerstoffgehalt wurde mittels Sauerstoffmessgeräten kontrolliert.

6.2 Methoden

6.2.5 Proteinanalytische Methoden

6.2.5.1 Zellyse zur Proteinanalytik

Die adhärenenten HPMEC wurden nach Entfernen des Zellkulturmediums dreimal mit eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit 80 µL kaltem Lysispuffer versetzt. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturplatte gelöst und in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Mittels Insulinspritze und Kanüle (27G) wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen geschert und anschließend für 30 Minuten auf Eis gelagert. Das Lysat wurde bei 4 °C für 10 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert und der Protein-enhaltende Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. 1 µL der Proteinlösung wurde für die anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. Die Proteine wurden nach der Extraktion bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

6.2.5.2 Bradford-Proteinbestimmung

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford handelt es sich um eine kolorimetrische Methode, die auf der Komplexbildung eines Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit den basischen und aromatischen Aminosäuren der Proteine beruht. Der Farbstoff zeigt in seiner roten, protonierten Form ein Absorptionsmaximum von 470 nm, welches durch Proteininteraktion bathochrom nach 595 nm verschoben wird (blaue, unprotonierte Form des Bradford-Reagenz). Die Quantifizierung des Proteingehaltes einer unbekannten Probe erfolgt durch Messung der Absorption bei 595 nm, die sich proportional zum Proteingehalt verhält (Bradford 1976).

Neben den Proben unbekannter Konzentration wurde der Proteingehalt eines Standardproteins, bovines Serumalbumin (BSA), in aufsteigenden Konzentrationen von 0-0,5 mg/mL, gemessen, um eine Kalibriergerade zu erstellen. 100 µL Bradford-Reagenz, 1:4 mit PBS verdünnt, wurde in eine 96-well Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 10 µL Standardprotein beziehungsweise verdünnter Probe versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption mithilfe des Photometers Tecan Safire II-Basic® bestimmt. Anhand der Kalibriergeraden konnte die Proteinkonzentration unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren ermittelt werden. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert.

6.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteinproben entsprechend ihrer molekularen Masse (kDa) erfolgte mittels einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wurde eine Migration des negativ geladenen SDS-Protein-Komplex in Richtung Anode hervorgerufen. Durch den Molekularsiebeffekt erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine.

Zur Durchführung dieser Methode wurde zunächst ein Trenngel (pH 8,8), welches der eigentlichen Größenauftrennung der Proteine dient, sowie ein Sammelgel (pH 6,8), das zur Proteinkonzentrierung verwendet wird, nach folgendem Schema zwischen zwei Glasplatten gegossen, wobei ein in das Sammelgel eingeführter Kamm zur Bildung von Geltaschen diente (Tabelle 6.2):

Tabelle 6.2: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele einer SDS-PAGE.

	Sammelgel 4%	Trenngel 12,5%	Trenngel 15%
Glycerol/dH ₂ O, 50%	1,285 mL	2,69 mL	2,34 mL
Bis-Acrylamid, 40%	0,2 mL	1,95 mL	2,30 mL
<i>Upper</i> Tris-Puffer	0,5 mL	-	-
<i>Lower</i> Tris-Puffer	-	1,58 mL	1,58 mL
TEMED	2 µL	3 µL	3 µL
APS, 10%	15 µL	32 µL	32 µL

Entsprechend des Molekulargewichtes der zu trennenden Proteine wurde die Bis-Acrylamidkonzentration des Trenngels angepasst. Für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 15 und 60 kDa wurde ein 12,5% iges Bis-Acrylamidgel verwendet, für Proteine bis zu 40 kDa wurde ein Gel benutzt, welches einen Bis-Acrylamidgehalt von 15% aufwies.

Zur Probenvorbereitung wurden gleiche Mengen Protein mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 8 µL aufgefüllt und mit 8 µL *Sample Buffer* sowie 2 µL *DNA-Loading Dye* versetzt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und 10 Minuten bei 4 °C und 13.000 U/min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Proteinansatz beziehungsweise 5 µL eines Molekulargewichtsmarkers in die Taschen des Sammelgels pipettiert, welches sich in einer mit kaltem SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekommer befand. Bei einer Spannung

von 80 V wurden die Proteine für 15 Minuten im Sammelgel konzentriert und im Anschluss bei 150 V aufgetrennt, bis die gewünschte Trennung der Proteine erfolgt war.

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

6.2.5.4 Immunoblot

Der Immunoblot beschreibt eine molekularbiologische Methode, die dem Nachweis von Proteinen aus einem Proteingemisch dient.

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektronentransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dafür wurde das Gel von den Glasplatten entfernt und die Nitrozellulosemembran in Transferpuffer inkubiert, um die Bindungsstellen mithilfe des enthaltenen Methanols zu aktivieren. Für den Transfer wurde das Gel luftblasenfrei kathodenseitig auf die aktivierte Nitrozellulosemembran aufgelegt und, wie in Tabelle 6.3 beschrieben, mit dem Filterpapier und den Schwämmen zwischen den Elektroden angeordnet. Die Kammer wurde mit kaltem Transferpuffer gefüllt und mit einem Kühlaggregat ergänzt. Die Proteine wurden während einer Stunde bei 400 mA auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Tabelle 6.3: Anordnung der Membranen und Filter zwischen den Elektroden für den Proteintransfer.

Kathode (-)
Schwamm
Whatman® Filterpapier (3x)
Gel
Nitrozellulosemembran
Whatman® Filterpapier (3x)
Schwamm
Anode (+)

Um den erfolgreichen und gleichmäßigen Transfer zu überprüfen und die Proteinmengen abzuschätzen, wurden die auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine mit einer Ponceau-Rot-Färbung sichtbar gemacht, indem die Membran für 10 Minuten in dieser Lösung geschwenkt wurde. Der Farbstoff bindet reversibel an die positiv geladenen Aminosäuren der Proteine. Nach dem Entfärben der Proteine mit TBS-T Lösung wurden die Proteinbanden mittels Immundetektion identifiziert. Dafür wurden spezifische Antikörper verwendet, die an die Epitope

der entsprechenden Proteine binden. Zunächst wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren. Nach Waschen der Membran in TBS-T Lösung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierlösung über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde dreimal mit TBS-T Lösung gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen und anschließend mit dem Sekundärantikörper in Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 6.4 aufgeführt. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde der Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenzreaktion (ECL, *enhanced chemiluminescence*) erfasst und mithilfe des ChemiDoc Touch™ Imaging System detektiert. Der Sekundärantikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) konjugiert, welche die Reduktion des Substrates katalysiert und eine Lumineszenz erzeugt.

Tabelle 6.4: Im Immunoblot verwendete Primär- und Sekundärantikörper, Verdünnungen und erwartete Proteingröße.

Primärantikörper	Verdünnung	Blockierlösung	Größe [kDa]
Apelin-Rezeptor	1:500	5% BSA in TBS-T	42
Beta Tubulin	1:2000	5% Milchpulver in TBS-T	55
eIF4e	1:1000	5% Milchpulver in TBS-T	25
DDAH1	1:1000	3% BSA in PBS-T	35
DDAH2	1:500	5% Milchpulver in TBS-T	30

Sekundärantikörper	Verdünnung	Blockierlösung
Anti-goat IgG	1:000	5% Milchpulver in TBS-T
Anti-rabbit IgG	1:000	5% Milchpulver in TBS-T

6.2.5.5 Apelin-ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der Apelin-Konzentration in Maus- und Patientenplasma sowie in den Zellkulturüberständen wurde ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet. An eine Mikrotiterplatte adsorbtiv gebundene Antikörper, die gegen das Antigen gerichtet sind, binden das Apelin, an welches sich ein zweiter HRP-gekoppelter Antikörper anlagert. Durch Zugabe eines spezifischen Substrates, das 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), entsteht durch Katalyse der HRP ein blaues Chromogen. Durch Zugabe von Salzsäure (HCl; 2 mol/L) resultiert eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von 650 nm nach 450 nm. Die Messung der Extinktion mithilfe einer Standardkurve diente der quantitativen Analyse der Apelin-Konzentration.

Es wurde zur Analyse das Apelin-12 Chemiluminescent EIA Kit der Firma Phoenix Pharmaceuticals unter Einsatz von 50 µL Probe nach Angaben des Herstellers verwendet.

6.2.5.6 Pathscan® Akt Signaling Antibody Array Kit

Zur Analyse der Phosphorylierung von Proteinen, die am PI3K/AKT-Signalweg beteiligt sind, wurde das Pathscan® Akt Signaling Antibody Array Kit verwendet. Zellen, unter Normoxie- oder Hypoxie-Exposition kultiviert, wurden mit Apelin inkubiert (10 nmol/L, 6 hrs) und die Überstände wurden auf einen *multi-well* Glasobjektträger, mit Nitrozelluloseblöcken beschichtet, gegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden und mehreren Waschschritten wurde ein Antikörpermischung auf den Objektträger gegeben und für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss folgte die Zugabe eines HRP-konjugiertem Antikörpers. Nach weiteren Waschschritten wurde auf den Objektträger ein Detektionsreagenz gegeben, sodass mittels Chemilumineszenzreaktion die Phosphorylierung der Proteine detektiert werden konnte. Die Analyse wurde mittels ChemiDoc® Touch ausgewertet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

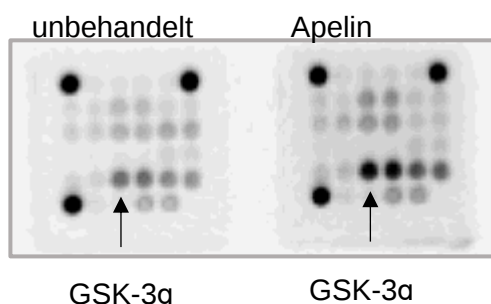


Abbildung 6.2: Chemilumineszenz-Film des Pathscan® Akt Signaling Antibody Array Kit. Die dunkel gefärbten Areale zeigen die Antikörper-Detektion phosphorylierter Proteine des PI3K/AKT-Signalweges. Links sind die unbehandelten HPMEC dargestellt, die rechte Abbildung zeigt die Zellen, die mit Apelin behandelt wurden. Die Pfeile zeigen die Phosphorylierung der GSK-3α.

6.2.5.7 Human Cytokine Array® Panel A

Zur Analyse der Zytokine aus dem Zelllysats wurde das Human Cytokine Array® Panel A nach Angaben des Herstellers benutzt. Nach Blockier- und Waschschritten wurde das mit einem Antikörpercocktail vermengte Zelllysats auf eine Nitrozellulosemembran, beschichtet mit Antikörpern gegen die zu analysierenden Zytokine, aufgebracht. Nach einer Inkubation über Nacht wurde die Membran gewaschen und nach Zugabe von HRP-konjugierten Antikörpern und einem Detektionsreagenz konnten die Zytokine durch Chemilumineszenz-Reaktion mithilfe des ChemiDoc® Touch detektiert werden.

6.2.6 DNA-Analysen

6.2.6.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Um den Genotyp der neugeborenen Mäuse zu bestimmen, wurden Mausschwanzbiopsien entnommen, aus denen genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) extrahiert wurde. Zur Lösung des Gewebes sowie zur Freisetzung der DNA wurden die Biopsien mit 200 µL *Digestion Buffer* unter Zusatz von 2 µL Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55 °C und 650 U/min auf einem Orbitalschüttler geschüttelt. Um zelluläre Bestandteile zu entfernen, wurde die Lösung für 15 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert. Zum DNA-enthaltenden Überstand wurden 1,5 mL 2-Propanol gegeben, um die DNA zu fällen. Durch Zentrifugation wurde die DNA pelletiert und im Anschluss mit 75% igem Ethanol gewaschen. Nach Entfernen des Ethanols wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und restliche Ethanol-Rückstände wurden vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt. Das DNA-Pellet wurde in 100 µL *Low-TE Buffer* aufgenommen und durch eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C und 550 U/min auf dem Orbitalschüttler gelöst. Die DNA wurde im Anschluss mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, siehe Abschnitt 6.2.2.2) amplifiziert.

Die DNA wurde bei 4 °C gelagert.

6.2.6.2 Klassische Polymerase-Kettenreaktion

Bei der klassischen PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion, *polymerase chain reaction*) handelt es sich um eine häufig verwendete Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Bei der Genotypisierung wurden die jeweiligen Genabschnitte amplifiziert. Die PCR wurde nach Anleitung des Herstellers nach dem KAPA® 2G Fast genotyping Mix with dye durchgeführt. Je Probe wurde ein Mastermix, bestehend aus 9,75 µL nukleasefreiem Wasser, 12,5 µL KAPA Polymerase Green sowie 0,125 µL eines jeden Primers hergestellt und mit 1 µL DNA versetzt. Die Isolierung der DNA aus Mausschwanzbiopsien ist in Abschnitt 6.2.2.1 beschrieben. Das

Temperaturprogramm zur DNA-Amplifikation sowie die Sequenzen der verwendeten Primer sind in den Tabellen 6.5 und 6.6 beschrieben.

Tabelle 6.5: Temperaturprogramm für die PCR zur Genotypisierung von Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen.

	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
Aktivierung der Polymerase	95	03:00
Denaturierung	95	00:15
Primerhybridisierung	55	00:10
Elongation	72	00:10
Finale Elongation	72	05:00
Abkühlung	4	∞

35 Zyklen

Tabelle 6.6: Verwendete Primer für die PCR zur Genotypisierung.

Primer	Primersequenz (5'→3')
<i>Forward Ddah1 Wildtyp</i>	AATCTGCACAGAAGGCCCTCAA
<i>Reverse Ddah1 Wildtyp</i>	ATTGTTACAAGCCCTTAACGC
<i>Forward Ddah1 Knockout</i>	TGCAGGTCGAGGGACCTAATAACT
<i>Reverse Ddah1 Knockout</i>	AACCACACTGCTCGATGAAGTTCC

6.2.6.3 DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse des Genotyps der Tiere wurde eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die Nukleinsäuren der Größe nach aufgetrennt wurden. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren erfolgt bei angelegter Spannung eine Migration durch das Agarosegel in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Molekülgröße, der angelegten Spannung sowie der Konzentration und damit der Porengröße des Agarosegels.

Zunächst wurde ein 1% iges Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer, unter Zusatz von 5% Roti®GelStain, hergestellt. Das im Roti®GelStain enthaltende Benzimidazol bindet an die Nukleinsäuren und wird unter ultraviolettem Licht (UV-Licht) zur Fluoreszenz angeregt, welche zur Analyse detektiert wird. 20 µL des PCR-Produktes (siehe Abschnitt 6.2.2.2) beziehungsweise 5 µL des DNA-Molekulargewichtsmarker GeneRuler™ 100 bp wurden in die

Geltaschen des Agarosegels pipettiert. Die DNA wurde dann durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 60 Minuten in einer mit 1x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt.

Das in Abschnitt 6.2.2.2. beschriebene Wildtyp Primer-Paar (*Ddah1*^{+/+}) amplifiziert DNA-Fragmente des Wildtyp-Allels mit einer Größe von 270 bp, während die *Ddah1*-Knockout-Primer (*Ddah1*^{-/-}) das 110 bp Fragment des *Ddah1*-defizienten Allels amplifizieren. Aus der DNA heterozygoter Mäuse wurden beide Fragmente vervielfältigt (Abbildung 6.3).

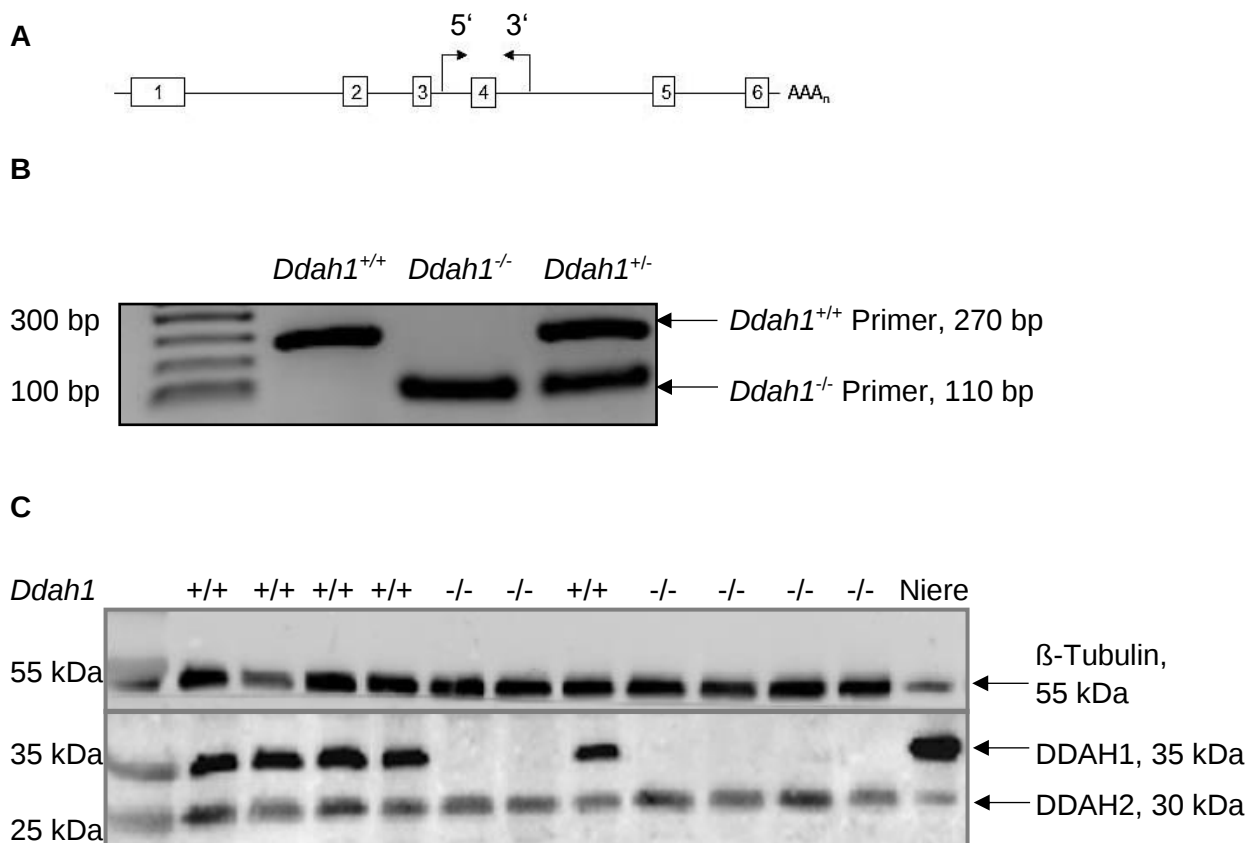


Abbildung 6.3: Analyse des Genotyps von Wildtyp-Mäusen (*Ddah1*^{+/+}), *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}) sowie heterozygoten Tieren (*Ddah1*^{+/-}). **A.** Schematische Darstellung des murinen *Ddah1*-Gens. Die Primer sind durch Pfeile gekennzeichnet. **B.** Amplifikation der DNA-Fragmente mittels klassischer PCR und anschließender DNA-Gelelektrophorese. **C.** Die DDAH1 und DDAH2 Proteinexpression wurde außerdem mittels Immunoblot und anschließender Antikörperdetektion gegen die DDAH1 und DDAH2 analysiert.

6.2.7 RNA-Analysen

6.2.7.1 RNA-Isolation

6.2.7.1.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Zur Isolierung der Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus Gewebeproben wurde das NucleoSpin® RNA Isolation Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei diesem Verfahren wird die Bindungseigenschaft der RNA an einer Silikagel-Membran genutzt und in Kombination mit der Mikrozentrifugaltechnik verwendet.

30 mg Gewebe wurde in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße eingewogen, mit 350 µL Lysis-Puffer versetzt und mithilfe von Stahlkugeln bei 30 Hz für zweimal 30 Sekunden im TissueLyser® homogenisiert. Das homogenisierte Gewebe wurde auf einer Silikat-Filtersäule aufgetragen und durch Zentrifugationsschritte aufgereinigt. Durch Zugabe von 70% igem Ethanol bildeten sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen RNA und OH-Silikat-Molekülen, welche eine selektive Bindung der RNA an die Membran bewirkten. Die gebundene RNA wurde mit einer DNase-Lösung inkubiert, um eventuell vorhandene genomische DNA abzubauen. Unter Zugabe von Waschpuffer wurde die RNA durch Zentrifugation gewaschen, um Salze, Proteine und weitere zelluläre Bestandteile zu entfernen. Anschließend wurde die RNA mit 20 µL RNase-freiem Wasser von der Säulenmembran eluiert.

Die RNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

6.2.7.1.2 RNA-Isolation aus Zellen

Nach Erreichen eines subkonfluenten Zustandes wurden die adhärenen Zellen, kultiviert im 6-well-Format, von der Oberfläche der Zellkulturplatte gelöst und in ein 15 mL Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1.200 U/min zentrifugiert, um den Überstand vom Zellpellet zu trennen. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die RNA-Extraktion wurde mit dem RNAzol® B-Kit nach den Herstellerangaben durchgeführt. Zur Zelllyse wurden 800 µL RNAzol® B zu dem Zellpellet gegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermengt. Anschließend wurden 200 µL Chloroform hinzugegeben, sodass sich zwei Phasen bildeten, die mittels eines Reagenzglasschüttlers vermengt wurden. Nach einer Inkubation von 15 Minuten auf Eis wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 U/min zentrifugiert. Die Fällung der RNA aus der wässrigen Phase fand mittels 2-Propanol-Behandlung über Nacht bei -20 °C statt. Bei 4 °C und 12.000 U/min wurde die RNA anschließend für 30 Minuten pelletiert und nach zweimaligem Waschen mit 75% igem Ethanol in 20 µL nukleasefreiem Wasser gelöst.

Bis zu weiteren Analyse wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

6.2.7.2 Quantitative Nukleinsäureanalyse

Die Konzentration sowie die Reinheit der isolierten RNA-Proben wurde photometrisch mithilfe des NanoDrop® ND-1000 Spektrometers aus 1 µL RNA bestimmt. Die Berechnung der RNA-Konzentration konnte durch Absorptionsmessung bei 260 nm durchgeführt werden. Die Absorptionseinheit A_{260} entspricht 40 µg einzelsträngiger RNA/mL. Daraus folgt:

$$c \left[\frac{\mu\text{g RNA}}{\text{mL}} \right] = A_{260} \times 40$$

Weiterhin wurde die Absorption bei 230 nm sowie bei 280 nm gemessen, um mögliche Verunreinigungen zu detektieren. Proben, die einen $A_{260}/280$ -Quotienten von über 2,0 aufwiesen, zeigten eine Phenol- oder Proteinverunreinigung und wurden aus weiteren Analysen ausgeschlossen. Der $A_{260}/230$ -Quotient dient als weiterer Maßstab für die Reinheit der RNA und liegt zwischen 1,8 und 2,2. Ein niedrigerer Quotient zeigt Verunreinigungen, die bei 230 nm absorbiert werden.

6.2.7.3 RNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Integrität der RNA wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Analog zur DNA-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 6.2.2.3.) handelt es sich hierbei um eine molekularbiologische Methode, bei der Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Verwendet wurde ein 1% iges Agarose-Gel in 0,5x TBE-Puffer, welches zur Detektion der RNA unter UV-Licht mit 0,05‰ Roti®GelStain versetzt wurde. Zur Probenaufbereitung wurden 500 µg RNA zur Visualisierung während der Elektrophorese mit 3 µL 6x DNA-Loading Dye versetzt, auf 10 µL mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt und zur Denaturierung für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die RNA-Lösung beziehungsweise 5 µL des Größenmarker GeneRuler™ 1 kb wurde in die Geltaschen gegeben und für 60 Minuten bei einer Spannung von 5 V/cm Gellänge aufgetrennt.

Die Integrität der RNA ließ sich anhand einer klaren Trennung der 28 S Bande von der 18 S Bande, die die unterschiedlich großen Einheiten ribosomaler RNA (rRNA) darstellen, unter UV-Licht analysieren. Der Quotient 28 S/18 S liegt bei einer intakten RNA bei 2, teilweise ist auch die 5 S rRNA Einheit erkennbar.

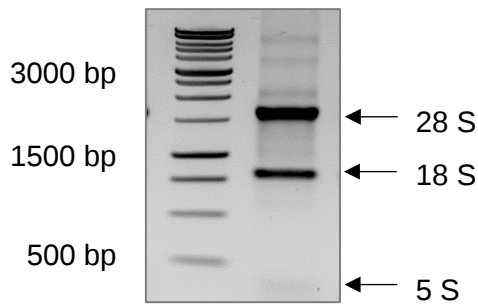


Abbildung 6.4: RNA-Gelelektrophorese zur Analyse der RNA-Integrität. Eine klare Auftrennung der 28 S von der 18 S RNA-Bande lässt auf eine integrale RNA schließen.

6.2.7.4 Reverse Transkription

Um die isolierte RNA (Abschnitt 6.2.3.1.2) durch reverse Transkription (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®] verwendet. 2 µg RNA wurden mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µL aufgefüllt und mit 10 µL MasterMix (Tabelle 6.6) in 0,5 mL Reaktionsgefäßen vermengt. Die RT erfolgte nach dem in Tabelle 6.7 dargestelltem Temperaturschema.

Tabelle 6.7: Zusammensetzung des MasterMixes zur Reversen Transkription mittels High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®].

Komponente	Volumen [µL/Reaktion]
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP Mix (100 mmol/L)	0,8
10x RT Random Primers	2,0
MultiScribe [™] Reverse Transcriptase	1,0
RNAse Inhibitor	1,0
Wasser, nukleasefrei	3,2
Gesamtvolumen	10,0

Tabelle 6.8: Temperaturprogramm zur Reversen Transkription.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	25	37	85	4
Zeit [min]	10	120	5	∞

Bis zur weiteren Analyse wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

6.2.7.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Genexpression wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mithilfe des ABI Prism® 7900HT sequence detection system bestimmt. Die Durchführung erfolgte mittels Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix Kit nach Herstellerangaben. SYBR Green I ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in Doppelstrang-DNA interkaliert und dessen Fluoreszenz-Signal (Exzitation bei 494 nm, Emission bei 521 nm) sich proportional zur DNA-Konzentration verhält.

Die durch reverse Transkription generierte cDNA wurde 1:8 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und mittels spezifischer Primer-Paare in einer Konzentration von 250 nmol/L in Doppelbestimmung amplifiziert (Tabelle 6.9). Je Probe wurden 5 µL Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix mit den jeweiligen Primer-Paaren vermengt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 10 µL aufgefüllt. 9 µL dieses Ansatzes wurden in einer 384-well Multiply®-PCR-Platte vorgelegt und mit 1 µL verdünnter cDNA versetzt. Die Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 6.10 dargestellt. Eine Negativkontrolle, die anstelle der DNA nukleasefreies Wasser enthielt, wurde jeder qPCR beigelegt.

Tabelle 6.9: Sequenzen und Fragmentgrößen der zur quantitativen PCR verwendeten Primer.

Primer	Primersequenz (5'→3')	Fragmentgröße (bp)
<i>Forward</i> hAPLNR	TTCTGCAAGCTCAGCAGCTA	207
<i>Reverse</i> hAPLNR	GGTGCGTAACACCATGACAG	
<i>Forward</i> hCCL2	TCAAACCTGAAGCTCGCACTCT	119
<i>Reverse</i> hCCL2	CATTGATTGCATCTGGCTGAG	
<i>Forward</i> hCCL22	TCACCTTCAGTGTCGTGACC	119
<i>Reverse</i> hCCL22	TCCTCTTCCGAGTCCAGGTA	
<i>Forward</i> hDDAH1	CCATCCACCTTTTCCAGTTC	168
<i>Reverse</i> hDDAH1	CCATCCACCTTTTCCAGTTC	
<i>Forward</i> hDDAH2	ACAAGGACCCCCGCTAAAA	63
<i>Reverse</i> hDDAH2	AAGGGAGTCCCCGTCTTCAA	
<i>Forward</i> hGAPDH	TCCAAAATCAAGTGGGGCGA	115
<i>Reverse</i> hGAPDH	TGATGACCCTTTTGGCTCCC	
<i>Forward</i> hIL-13	TGAGGAGCTGGTCAACATCA	76
<i>Reverse</i> hIL-13	CAGGTTGATGCTCCATACCAT	
<i>Forward</i> hIL-16	CCTTTGGCTCCTCTCAACTG	111
<i>Reverse</i> hIL-16	CAGAAAACCGTCCTTCCTCA	
<i>Forward</i> hTGM2	CACTTTCTGATTCCCTGTATGACTGTG	103
<i>Reverse</i> hTGM2	ACCCTTGACCGACTTCAGCTTG	
<i>Forward</i> mApInr	GGAAGATGATGGTTACAACACTAC	204
<i>Reverse</i> mApInr	AGGCTGGCAATGAAGATG	
<i>Forward</i> mCol4a1	TCGGCAGGAGAGAAGGGT	195
<i>Reverse</i> mCol4a1	GCCAGGTAAGCCAGGTTG	
<i>Forward</i> mDdah1	CAATAGGGTCCAGCGAATCTGC	86
<i>Reverse</i> mDdah1	GGGTACAGTGAGCTTGTCATAACG	
<i>Forward</i> mDdah2	GAGCTGAGATCGTGGCAGACA	196
<i>Reverse</i> mDdah2	GGGAGGGTCAGAGAGGCGTAG	

<i>Forward mRpl13a</i>	AAACGCGGATGGTGGTTCCT	118
<i>Reverse mRpl13a</i>	GCTGTCACTGCCTGGTACTT	

Tabelle 6.10: Amplifikationsbedingungen der qPCR zur quantitativen Genanalyse.

	Temperatur	Zeit [min:s.]	
Aktivierung der Polymerase	95	10:00	
Denaturierung	95	00:15	45 Zyklen
Hybridisierung/Elongation	60	01:00	
Denaturierung	95	00:15	
Dissoziation	60	01:00	
	95	00:15	
Abkühlung	4	∞	

Die analysierten Daten wurden jeweils auf die endogene Kontrolle Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) im Zellkulturprojekt und auf das Ribosomale Protein L13A (*Rpl13a*) im Tierversuch normalisiert (Xiao *et al.* 2017). Der *cycle threshold* (Ct-Wert), der den Beginn des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenz anzeigt, wurde verwendet, um mittels der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ die relative mRNA Expression zu analysieren. ΔCt wurde ermittelt, indem der Mittelwert des Ct-Wertes des Gens der endogenen Kontrolle von dem des zu analysierenden Gens subtrahiert wurde. Um $\Delta\Delta Ct$ zu erhalten, wurde der Mittelwert der ΔCt -Werte der Referenzgruppe von dem ΔCt -Wert einer jeden Probe subtrahiert. Ausgehend davon, dass jeder Zyklus der qPCR das Produkt verdoppelt, lässt sich mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ auf die relative mRNA Expression des entsprechenden Gens im Vergleich zur Referenzgruppe schließen. Die Expression der Referenzgruppe wurde gleich eins gesetzt (Livak und Schmittgen 2001).

6.2.8 Fluorimetrische Bestimmung der Nitritkonzentration im Überstand von HPMEC

Die Bestimmung der Nitritkonzentration im Überstand von HPMEC erfolgte zur indirekten Ermittlung der NO-Synthese der Zellen. NO reagiert aufgrund seiner kurzen Beständigkeit zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-), sodass die Messung der NO_2^- -Konzentration auf die

NO-Konzentration im Überstand schließen lässt. Die Bestimmung der NO_2^- -Konzentration erfolgte mithilfe eines modifizierten Griess-Assays (Griess 1864).

Es wurde eine Standardreihe aus einer 10 mmol/L Natriumnitrit-Stammlösung hergestellt, indem diese zunächst in einem Verhältnis von 1:100 mit Zellkulturmedium verdünnt wurde. Diese Lösung (100 $\mu\text{mol/L}$) wurde im Folgenden im Verhältnis von 1:1 bis zu einer Endkonzentration von 1,56 $\mu\text{mol/L}$ weiter verdünnt. 100 μL der unbekannten Proben beziehungsweise der Standardreihe wurden in eine schwarze 96-well Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 100 μL einer Lösung versetzt, die aus der 2,3-Diaminonaphthalin-Stammlösung (DAN; 100 mmol/L) unter Zusatz von 1% HCl bestand. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion, bei der das DAN zum fluoreszierenden 1-Naphthotriazol umgesetzt wurde, durch Zugabe von 100 μL Natriumhydroxid-Lösung (NaOH; 2 mol/L) gestoppt. Die Fluoreszenz wurde mithilfe des Tecan II Safire Basic-Fluorometers bei einer Exitation von 355 nm und einer Extinktion von 460 nm mittels Standardreihe berechnet.

6.2.9 Bestimmung der Kollagen-Konzentration im Überstand

Zur Bestimmung der Konzentration von löslichem Kollagen im Zellkultur-Überstand wurde das Sircol™ Soluble Collagen Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Durch Bildung eines farbigen Komplexes aus löslichem Kollagen und des Farbstoffes Sirius-Red erfolgt eine quantitative Bestimmung des Kollagen-Gehaltes durch Absorptionsmessung. Die Proben sowie Kollagen-Standards wurden mit Sircol™ Dye Reagent, welches den roten Sirius-Red-Farbstoff enthält, versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach Abzentrifugation des Überstandes und mehreren Waschschritten, bei denen der ungebundene Farbstoff entfernt wurde, wurde der gebundene Farbstoff durch Zugabe eines Alkali-Reagents wieder in Lösung gebracht und in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt. Die Intensität der roten Färbung verhält sich bei 555 nm proportional zum Kollagengehalt der unbekannten Probe, welcher mittels Standardkurve ermittelt wurde.

6.2.10 Instrumentelle Analytik

6.2.10.1 Bestimmung der ADMA-, SDMA- und L-Arginin-Konzentrationen

Die Konzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin in Plasma-Proben und Zellkulturüberständen wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometriedkopplung (LC-MS/MS) analysiert. 100 µL einer methanolischen Lösung des internen Standards (2 µmol/L [$^2\text{H}_6$]-ADMA, 50 µmol/L L-[$^2\text{H}_7$]-Arginin) wurde in eine MultiScreen 96-well Filterplatte vorgelegt und mit 25 µL der zu messenden Proben beziehungsweise der Kalibrierlösungen ergänzt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur während einer kontinuierlichen Durchmischung auf einem Orbitalschüttler wurde die Filterplatte für 10 Minuten bei 2.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert, um die methanolische Phase in eine Polypropylenplatte zu eluieren, die sich unter der MultiScreen 96-well Filterplatte befand. Im Anschluss wurde die methanolische Phase bei 80 °C auf einem Heizblock abgedampft. 100 µL einer butanolischen Salzsäure-Lösung (1 mol/L) wurde zu den Proben pipettiert und die Platte wurde für 30 Minuten bei 65 °C inkubiert. In diesem Schritt werden die Aminosäuren zu ihren Butylestern derivatisiert, um die chromatographische Retention zu optimieren. Die Salzsäure wurde im Anschluss bei 80 °C auf dem Heizblock entfernt. Die Probe wurde in 100 µL LC-MS/MS Probenpuffer aufgenommen und erneut durch eine MultiScreen 96-well Filterplatte zentrifugiert. Die Proben wurden auf einer C18 Säule durch Wechselwirkungen der Analyten mit der Teicoplanin-benetzten Säule retiniert, was zu einer Abtrennung der unterschiedlichen Arginine von der biologischen Matrix führte. Die Quantifizierung der Analyten wurde im Anschluss mithilfe des gekoppelten Massenspektrometers bestimmt. Die chromatographischen und massenspektrometrischen Parameter sind in den Tabellen 6.11 und 6.12 dargestellt.

Tabelle 6.11: Chromatographische Parameter zur Analyse von L-Arginin, Asymmetrischem Dimethylarginin und Symmetrischem Dimethylarginin mittels LC-MS/MS.

Chromatographische Parameter

<i>Autosampler</i>	Varian, Palo Alto, CA, USA
HPLC-System	Varian PrpStar model 210
Trennsäule	Teicoplanin (Sigma Aldrich, 1 mm IDx20 mm)
Mobile Phase	A: 0,1% Ameisensäure B: Acetonitril
Fließmittel-Gradient	67/33, v/v, isokratisch
Fließmittel-Geschwindigkeit	0,3 mL/min
Messzeit	3 min
Injektionsvolumen	10 µL

Tabelle 6.12: Massenspektrometrische Parameter zur Analyse von L-Arginin, Asymmetrischem Dimethylarginin und Symmetrischem Dimethylarginin mittels LC-MS/MS-Analyse.

Massenspektrometrische Parameter

System	Varian 1200L Triple Quadrupole MS
Software	Varian MS Workstation Software 6.9
Ionisierung	ESI+
Kollisionsgas	Argon, 2 Pa
Trärgas	Stickstoff, 90 L/hr

Anhand der Peakflächenverhältnisse der einzelnen Analyten und internen Standards konnten die Analyten mithilfe einer Standardkurve quantifiziert werden.

6.2.10.2 Analytik von ex vivo generierten M2 Makrophagen

6.2.10.2.1 Generierung von M2-Makrophagen

Zur Gewinnung von ex vivo generierten M2-Makrophagen wurde zunächst Patienten, die an einer Pulmonalen Arteriellen Hypertonie (PAH) erkrankt sind, beziehungsweise gesunden Probanden Vollblut in EDTA-Monovetten abgenommen.

Mithilfe des *Lymphocyte Separation Medium 1077* wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zunächst durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Die Zellsuspension wurde durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 2.000 U/min vom Blutplasma getrennt, welches in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt wurde. 8 mL der Zellsuspension wurde dann mit 27 mL einer Mischung aus gleichen Teilen PBS und RPMI-Komplettmedium (RPMI, *Roswell Park Memorial Institute*; Tabelle 6.13) vermengt und langsam auf 15 mL *Lymphocyte Separation Medium 1077* in einem 50 mL Falcon-Röhrchen geschichtet, sodass sich zwei Phasen bildeten. Um die PBMC von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation bei 1.000 U/min für 30 Minuten bei ausgeschalteter Bremsfunktion durchgeführt. Entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt, befanden sich die PBMC im *Buffy Coat*, einer Zwischenschicht zwischen den nukeophilen und basophilen Zellen sowie restlichem Blutplasma. Diese Schicht wurde vorsichtig entnommen und mit PBS gewaschen, bevor die Zellen in RPMI-Komplettmedium aufgenommen wurden, das zur Makrophagen-Differenzierung mit 1 ng/mL *Macrophage Colony Stimulating Factor* versetzt wurde. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen auf eine 6-well Zellkulturplatte ausgesät. An den folgenden drei Tagen wurde das Medium täglich gewechselt, am dritten Tag wurde zusätzlich Interleukin-4 in einer Konzentration von 20 ng/mL hinzugefügt, um eine Polarisierung in Richtung M2-Makrophagen zu bewirken.

Tabelle 6.13: Zusammensetzung RPMI-Komplettmedium, 500 mL.

Gibco™ RPMI Medium 1640		445 mL
Fetales Kälberserum	10% (v/v)	50 mL
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)	5 mL

24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurde das Medium erneut gewechselt. Zusätzlich wurde die Hälfte der Zellen für 6 Stunden mit Apelin in einer Konzentration von 10 pmol/L stimuliert, um dessen Einfluss auf die Funktion der M2-Makrophagen zu untersuchen. Die

restlichen Zellen dienten als Negativkontrolle und wurden mit RPMI-Komplettmedium unter Zusatz von M-CSF sowie IL-4 versetzt.

Die Zellen wurden im Anschluss entweder auf transkriptioneller Ebene analysiert (siehe Abschnitt 6.2.3.1.2 und 6.2.3.5) oder es wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle untersucht (siehe Abschnitt 6.2.6.3).

Eine Einverständniserklärung aller Patienten zur Verwendung ihres Blutes zu Forschungszwecken nach Aufklärung durch Dr. Lars Harbaum liegt vor.

6.2.10.2.2 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) handelt es sich um eine analytische Methode, bei der unterschiedlich Fluoreszenz-markierte Zellen voneinander getrennt werden. Die Zellen passieren dabei einzeln einen Laserstrahl und erzeugen eine Streuung des Lichtes in unterschiedliche Richtungen, anhand der die Größe und Granularität der Zellen detektiert werden kann. Anhand des bei Durchtreten durch den Laserstrahl entstehenden Fluoreszenzsignals kann mittels verschiedenfarbiger Filter die Anzahl der Zellen ermittelt werden, die die zu analysierenden Merkmale besitzen.

Zuerst wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers von der Oberfläche der 6-well-Zellkulturschale gelöst und in ein FACS-Röhrchen überführt. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen, indem 1 mL PBS hinzugefügt wurde und die Zellen für 5 Minuten bei 3.500 U/min zentrifugiert wurden. Das entstehende Zellpellet wurde in 100 µL FACS-Puffer aufgenommen. Im Anschluss wurde zur Analyse der Expression von APLNR auf der Zelloberfläche eine Lösung fluoreszenzmarkierter Antikörper (Tabelle 6.14) hinzugefügt. Allophycocyanin (APC) emittiert rotes Licht (Extinktion bei 633 nm, Emission bei 680 nm), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) zeigt eine grüne Fluoreszenz (Extinktion bei 495 nm, Emission bei 519 nm) und Phycoerythrin (PE) zeigt nach Anregung bei 545 nm eine blaue Fluoreszenz (Emission bei 572 nm).

Tabelle 6.14: Verwendete Antikörper zur APLNR-Detektion mittels FACS-Analyse.

Färbung	Antikörper	Fluoreszenz	Volumen je Probe [μ L]
Isotypen	CD45	APC	5
	CD45	FITC	7
	CD45	PE	7
APLNR / CD11b / CD14	APLNR	APC	5
	CD11b	FITC	7
	CD14	PE	7

Die Zellen wurden zur Färbung für 30 Minuten mit dem Antikörpergemisch in Dunkelheit inkubiert und anschließend bei 3.500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in 300 μ L FACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Messung im Durchflusszytometer LSR Fortessa.

6.2.11 *In vivo* Untersuchungen im Tiermodell

Im Tierversuch sollte der Einfluss von Apelin auf den PAH-Phänotyp untersucht werden. Zunächst wurde in einem Vorversuch die optimale Apelin-Konzentration in Wildtyp-Mäusen ermittelt sowie der Einfluss von Hypoxie (10% Sauerstoff) im Vergleich zur Normoxie in Wildtyp- und *Ddah1*^{-/-}-Mäusen getestet. Im Hauptversuch erfolgte dann die Supplementation von Apelin sowohl in *Ddah1*^{-/-}-Tieren als auch in Wildtyp-Mäusen, die unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden (Tabelle 6.13).

Tabelle 6.15: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe. **A.** Analyse zur Konzentrationsfindung, **B.** Validierung des PAH-ähnlichen Phänotyps und **C.** Analyse zur Ermittlung des Einflusses von Apelin auf den PAH-Phänotyps in *Ddah1*-Wildtyp (*Ddah1*^{+/+}) und *Ddah1*-defizienten Mäusen (*Ddah1*^{-/-}).

A Vorversuch zur Konzentrationsfindung

NORMOXIE			
<i>Ddah1</i> ^{+/+}			
NaCl	1 mg/kg KG·d	2 mg/kg KG·d	2,5 mg/kg KG·d

B Vorversuch zur Untersuchung des Hypoxie-Effektes

NORMOXIE		HYPOXIE	
<i>Ddah1</i> ^{+/+}	<i>Ddah1</i> ^{-/-}	<i>Ddah1</i> ^{+/+}	<i>Ddah1</i> ^{-/-}

C Hauptversuch zur Untersuchung des Einflusses von Apelin

HYPOXIE			
<i>Ddah1</i> ^{+/+}		<i>Ddah1</i> ^{-/-}	
NaCl	Apelin	NaCl	Apelin

6.2.11.1 Implantation osmotischer Minipumpen

Um eine kontinuierliche Verabreichung von Apelin beziehungsweise 0,9% Natriumchlorid-Lösung (NaCl) zu gewährleisten, wurde den Tieren jeweils eine osmotische Minipumpe (Fa. Alzet, Modell 1004) mit einem Reservoirvolumen von 100 µL (Länge 1,5 cm, Gewicht 0,4 g) implantiert, die den Wirkstoff konstant über vier Wochen mit einer Freisetzungsgeschwindigkeit von 0,11 µL/hr freigibt. Es handelt sich hierbei um eine schonende Verabreichung, da die initiale Implantation lediglich einen minimalen Eingriff erfordert und keine weiteren Manipulationen an den Tieren erforderlich waren. Zur Analgesie erhielten die Tiere unmittelbar vor dem Eingriff eine einmalige Buprenorphin-Injektion (0,5 mg/kg KG). Die Pumpe wurde den Tieren unter Isofluran-Kurzzeitnarkose dorsal über einen 1 cm langen Hautschnitt subkutan implantiert. Anschließend wurde der Schnitt mit 7 mm Wundklammern verschlossen und mit Betaisodona®-Lösung desinfiziert. Postoperativ bekamen die Tiere über das Trinkwasser Metamizol-Natrium (125 mg/100 mL) zur weiteren Analgesie sowie Weichfutter über die folgenden drei Tage verabreicht. Die Tiere des Hauptversuches wurden am folgenden

Tag in modifizierte Hypoxie-Käfige umgesetzt, in denen ein verminderter Sauerstoffgehalt von 10% vorherrschte. Die Wundheilung sowie das Verhalten der Tiere wurde täglich überprüft und dokumentiert. Die Apelin- beziehungsweise NaCl-Lösung wurde mittels osmotischer Minipumpen kontinuierlich über vier Wochen im freilaufenden Tier verabreicht und im Anschluss an den Versuch wurde die Pumpe explantiert. Die Pumpen wurden einen Tag vor Versuchsbeginn mit einer Apelin- beziehungsweise NaCl-Lösung gefüllt und über Nacht bei 37 °C in 0,9% NaCl aufbewahrt. Zur Austestung der optimalen Konzentration wurden im Vorversuch Konzentrationen von 1 mg Apelin/kg KG·d ($c = 6,2 \times 10^{-3}$ mol/L; 0,9 mg/100 µL NaCl ausgehend von einem Maus-Körpergewicht von 25 g), 2 mg Apelin/kg KG·d ($c = 0,01$ mol/L; 1,9 mg/100 µL NaCl ausgehend von einem Maus-Körpergewicht von 25 g) und 2,5 mg Apelin/Kg KG·d ($c = 0,02$ mol/L; 2,4 mg/100 µL NaCl ausgehend von einem Maus-Körpergewicht von 25 g) verwendet. Weiterhin wurden Kontrolltiere eingeschlossen, denen Minipumpen, gefüllt mit 100 µL 0,9% iger NaCl, implantiert wurden. Im Hauptversuch wurde für die Tiere, die eine Apelin-Supplementation erhalten sollten, die mittlere Konzentration von 2 mg/kg KG·d gewählt; den Kontrolltieren wurde auch hier eine NaCl-gefüllte Pumpe implantiert.

6.2.11.2 Blutentnahme

Bei allen Tieren, die in den Tierversuch eingeschlossen wurden, wurde sowohl unmittelbar vor Beginn des Versuches als auch am Ende des Versuches retroorbital beziehungsweise kardial Blut entnommen. Bei den Tieren, die zur Konzentrationsfindung des zu supplementierenden Apelins bestimmt waren, wurde zusätzlich wöchentlich im Laufe des Versuches Blut entnommen. Zur retroorbitalen Blutabnahme wurde eine Glaskapillare unter drehenden Bewegungen in den Augenwinkel der Mäuse geschoben, bis sie den retroorbitalen Plexus punktierte. Das in die Kapillare entweichende Blut wurde mit einer EDTA-Microvette aufgefangen. Die kardiale Blutentnahme erfolgte im narkotisierten Tier mittels Spritze und Kanüle (30 G). Im Anschluss wurde das Blut für 20 Minuten bei 2.000 U/min zentrifugiert, um das Plasma von den zellulären Bestandteilen zu trennen. Das Plasma wurde abgetrennt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

6.2.11.3 Hämatokritmessung

Direkt im Anschluss an die Blutentnahme wurde das antikoagulierte Vollblut in ein Zentrifugationsröhrchen überführt, welches mit einem Hämatokrit-Versiegelungskit verschlossen wurde. Durch Zentrifugation (5 min, 2.000 U/min) wurden die Erythrozyten von restlichen Blutbestandteilen getrennt und der Hämatokrit konnte anhand einer Tabelle zum Ablesen des Hämatokrits bestimmt werden.

6.2.11.4 Rechtsherzkatheteruntersuchung

Nachdem sich die Tiere über 28 Tage im Versuch befanden wurde bei fünf randomisiert ausgewählten Tieren jeder Versuchsgruppe eine Rechtsherzkatheteruntersuchung durchgeführt, um den Druck in der rechten Herzkammer zu bestimmen. Dafür wurden die Tiere zuerst mittels intraperitonealer Urethan-Injektion (1,6 g/kg KG) narkotisiert. Die Mäuse wurden dorsal auf einer Wärmeplatte fixiert und durch endotracheale Intubation mittels Tracheostomie beatmet (200/min). Im Anschluss wurde die *Vena Jugularis Interna* freipräpariert und punktiert. Der Rechtsherzkatheter, der zur Analyse mit dem ADVantage® Pressure Volume System gekoppelt war, wurde eingeführt und bis in die rechte Herzkammer vorgeschoben.

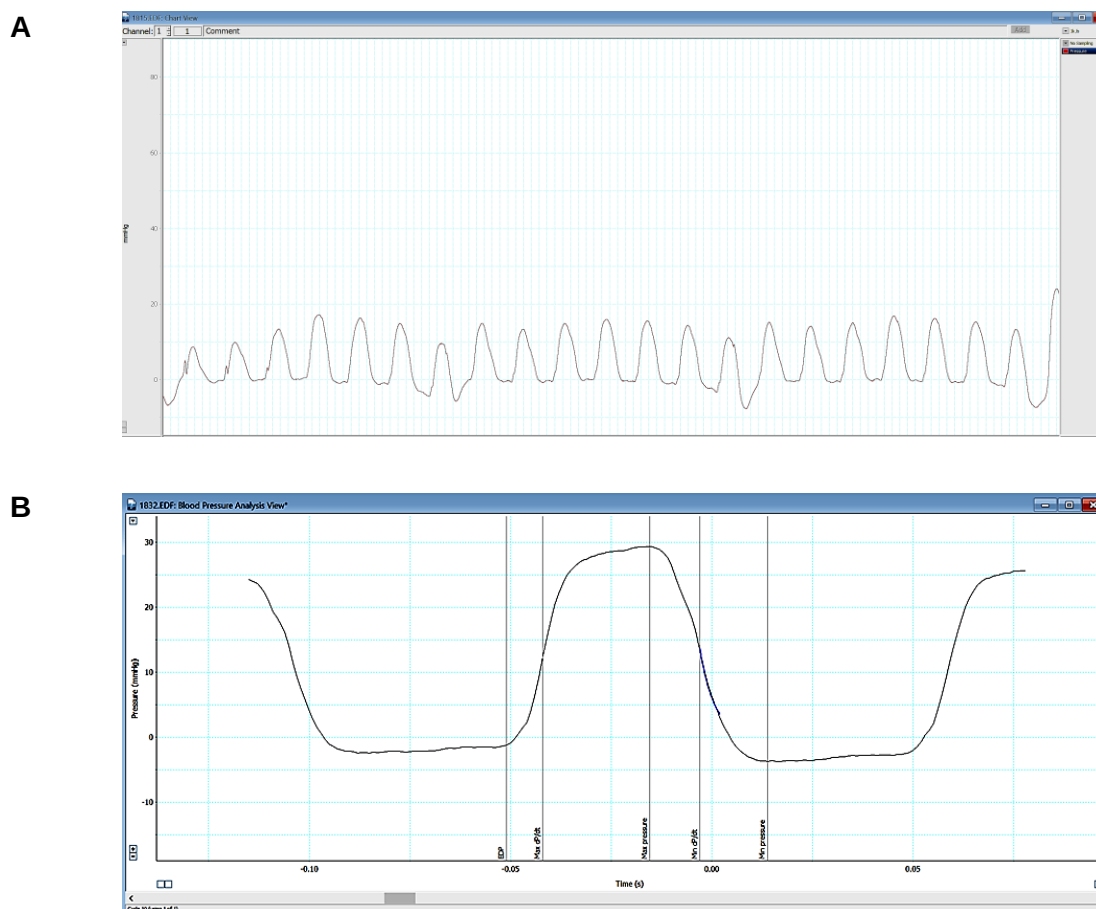


Abbildung 6.5: Beispielhafte Analyse des mittleren rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP). A. RVSP einer spontan atmenden Wildtyp-Maus. **B.** Vergrößerte Ansicht des RVSP innerhalb eines Herzzyklus..

Der Druck konnte dann erfasst und mittels der Software Iox 2.9.5.68 ausgewertet werden, indem der mittlere Druck berechnet wurde, der innerhalb von einer Minute bei gleichmäßigem Druck gemessen wurde (siehe Abbildung 6.5).

Die Durchführung der Rechtsherzkatheteruntersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Lars Harbaum durchgeführt. Im Anschluss an die Rechtsherzkatheteruntersuchung wurden die Tiere unter Narkose durch zervikale Dislokation getötet und ihre Organe wurden entnommen.

6.2.11.5 Auswiegen des rechten Herzens

Um zu ermitteln, ob bei den untersuchten Tieren eine Rechtsherzhypertrophie vorlag, wurde das Gewicht des rechten Ventrikels im Verhältnis zum Gewicht des linken Ventrikels und Septums beziehungsweise zur Tibiallänge oder zum Körpergewicht bestimmt. Dafür wurde nach der Tötung der Tiere das gesamte Herz entnommen und für 24 Stunden in 15 mL 4% iger Formaldehydlösung fixiert. Im Anschluss wurden die Herzen für mehrere Tage in 70% igem Ethanol gelagert. Weiterhin wurde die Tibia der Tiere freipräpariert und dessen Länge mithilfe eines digitalen Messschiebers bestimmt. Der rechte Ventrikel wurde vorsichtig vom linken Ventrikel, der noch mit dem Septum verbunden war, abpräpariert und beide Ventrikel wurden mithilfe einer Analysenwaage ausgewogen. Der Fulton-Index, der ein Maß für die Rechtsherzhypertrophie darstellt, wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{Fulton Index} = \frac{\text{Masse (rechter Ventrikel)}}{\text{Masse (linker Ventrikel + Septum)}}.$$

Zwei weitere Indices, die ein Maß für eine Rechtsherzhypertrophie darstellen, sind

$$\text{rechter Ventrikel/Körpergewicht} = \frac{\text{Masse (rechter Ventrikel)}}{\text{KG}} \text{ sowie}$$

$$\text{rechter Ventrikel/Tibiallänge} = \frac{\text{Masse (rechter Ventrikel)}}{\text{Tibiallänge}}.$$

6.2.11.6 Histologische Analyse

Zur histologischen Analyse wurde nach der Tötung der Tiere der Brustkorb geöffnet und entlang der Trachea die gesamte Herz-Lungen-Einheit entnommen. Im Anschluss wurde mithilfe einer 20 mL Spritze und einer Kanüle (20G) über die rechte Herzkammer das Blut mit PBS aus Herz und Lunge gespült. Der rechte Lungenflügel wurde mit Operationsfäden an der *vena pulmonalis* abgeschnürt und schließlich abgetrennt. Dieser diente zur RNA-Isolation und anschließender Genanalyse (siehe Abschnitt 6.3.2.1). Anschließend wurde der linke Lungenflügel über die Trachea mit 4% iger Formaldehydlösung perfundiert und ebenfalls mit einem Operationsfaden an der Trachea abgeschnürt. Der linke Lungenflügel sowie das Herz wurden bis zur histologischen Analyse in 4% iger Formaldehydlösung fixiert.

Die histologischen sowie die immunhistologischen Färbungen, die an Herz und Lunge vorgenommen wurden, wurden mit Standardmethoden von der *Core-Facility* Mauspathologie unter Leitung von Frau PD Dr. Susanne Krasemann am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. In Kooperation mit dem Institut für Anatomie und Morphologie unter Leitung von Prof. Dr. U. Schuhmacher wurden die fertigen Schnitte mithilfe des Mirax MIDI® *Digital Slide Scanner* eingescannt und konnten mithilfe des *Panoramic Viewer* ausgewertet werden.

6.2.11.6.1 Histologische Färbungen

Unter Standardbedingungen wurden die feingeweblichen Strukturen der Herzen und der Lungen mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung sichtbar gemacht. Diese dient als Übersichtsfärbung, bei der saure Strukturen wie Zellkerne und Ribosomen durch das Hämatoxylin blau gefärbt werden, während das Eosin saure Zellbestandteile wie Kollagen, Proteine und Mitochondrien rot färbt. Anhand der HE-Färbung wurde der *Radial Alveolar Count* (RAC; Emery and Mithal 1960), der ein Maß für die Alveolarmorphometrie anzeigt, berechnet. Zur RAC-Ermittlung wurde eine gerade Linie vom Zentrum der Bronchiolen bis zum nächsten Bindegewebsseptum gezogen und die Anzahl der von der Linie geschnittenen Alveolen gezählt.

Um in den Lungen elastische Fasern und Kollagenfasern anzufärben wurde die Elastika-van-Gieson-Färbung angewandt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Trichromfärbung, die Bindegewebe rot darstellt, während Muskelgewebe eine gelbe Färbung annimmt. Die Färbung erlaubt eine klare Unterscheidung zwischen der *lamina interna* und der *lamina externa*.

6.2.11.6.2 Immunhistochemische Färbungen

Um in den Gewebsschnitten spezifische Strukturen zu analysieren, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Mithilfe des α -SMA Antikörpers konnten Muskularisierungen, insbesondere muskularisierte Gefäße, sichtbar gemacht werden. Zur Auswertung wurde die Anzahl der voll muskularisierten Gefäße, der teilweise muskularisierten Gefäße sowie der nicht muskularisierten Gefäße eines definierten Lungenschnittes von 100 Alveolen bestimmt und mit der Gesamtanzahl der Gefäße ins Verhältnis gesetzt.

Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (CD31, *cluster of differentiation 31*) wird unter anderem auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Die Färbung mittels CD31-Antikörper stellt die Blutgefäße in der Lunge dar. Es wurde die Gesamtanzahl der Blutgefäße in einem definierten Lungenabschnitt von 100 Alveolen bestimmt.

Um die Makrophagen anzufärben wurde ein F4/80-Antikörper verwendet. In einem definierten Lungenausschnitt von 100 Alveolen wurden die angefärbten Gefäße ausgezählt.

6.2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 5. Die Ergebnisse wurden stets als arithmetischen Mittelwert (MW)±Standardfehler (SEM, $SE/\sqrt{n}$) angegeben. Wurden zwei Gruppen miteinander verglichen, so wurde zuerst ein Kolgomorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung durchgeführt. Bei normalverteilten Werten wurde ein zweiseitiger t-Test zur Analyse verwendet. Konnte nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden, so wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test zur Auswertung gewählt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (2-way-ANOVA-Test) gefolgt von einem Bonferroni-PostHoc-Test angewandt. Für alle Analysen wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt. Als Signifikanzniveau (p-Wert) wurde $p<0,05$ (*; #) definiert.

7 Literaturverzeichnis

- Abman SH, Chatfield BA, Hall SL, McMurtry IF (1990) Role of endothelium-derived relaxing factor during transition of pulmonary circulation at birth. *The American Journal of Physiology* **259**: H1921-7.
- Ahmad A, Ahmad S, Malcolm KC, Miller SM, Hendry-Hofer T, Schaack JB, White CW (2013) Differential regulation of pulmonary vascular cell growth by hypoxia-inducible transcription factor-1 α and hypoxia-inducible transcription factor-2 α . *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **49**: 78-85.
- Alastalo TP, Li M, Perez VJ, Pham D, Sawada H, Wang JK *et al.* (2011) Disruption of PPAR γ / β -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *The Journal of Clinical Investigation* **121**: 3735-3746.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases. Structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal* **357**: 593-615.
- Andersen CU, Hilberg O, Møllekjær S, Nielsen-Kudsk JE, Simonsen U (2011) Apelin and pulmonary hypertension. *Pulmonary Circulation* **1**: 334-346.
- Anderson G, Hakim TS, Sugimori K, Camporesi EM (1996) Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiological Measurement* **17**: 267.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 3203-3207.
- Ashley AE, Powers J, Chen M, Kundu R, Finsterbach T, Caffarelli A *et al.* (2005) The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovascular Research* **65**: 73-82.
- Azizi Y, Faghihi M, Imani A, Roghani M, Nazari A (2013) Post-infarct treatment with Pyr1-apelin-13 reduces myocardial damage through reduction of oxidative injury and nitric oxide enhancement in the rat model of myocardial infarction. *Peptides* **46**: 76-82.
- Badesch DB, Champion HC, Sanchez MAG, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A *et al.* (2009) Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **54**: S55-66.
- Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, Krichman AM, Farber HW, Frost AE *et al.* (2010) Pulmonary arterial hypertension. Baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* **137**: 376-387.
- Barnes GD, Alam S, Carter G, Pedersen CM, Lee KM, Hubbard TJ *et al.* (2013) Sustained cardiovascular actions of APJ agonism during renin-angiotensin system activation and in patients with heart failure. *Circulation*. **6**: 482–491.
- Barnes PJ (1994) Endothelins and pulmonary diseases. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **77**: 051-1059.
- Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaine S (2004) Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **43**: 40S-47S.
- Bärtsch P, Swenson ER, Maggiorini M (2001) Update. High altitude pulmonary edema. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **502**: 89-106.
- Bedford MT, Richard S (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular cell* **18**: 263-272.

- Benza RL, Miller DP, Barst RJ, Badesch DB, Frost AE, McGoon MD (2012) An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest* **142**: 448-456.
- Blumberg FC, Riegger, Günter AJ, Pfeifer M (2002) Hemodynamic Effects of Aerosolized Iloprost in Pulmonary Hypertension at Rest and During Exercise. *Chest* **121**: 1566-1571.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O *et al.* (1998) Asymmetric dimethylarginine (ADMA). A novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* **98**: 1842-1847.
- Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E (2009) Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality--an update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacological Research* **60**: 481-487.
- Bogle RG, MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P (1995) Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake. A mechanism for differential inhibition of NO synthases? *The American Journal of Physiology* **269**: C750-6.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 24-254.
- Burke DL, Frid MG, Kunrath CL, Karoor V, Anwar A, Wagner BD *et al.* (2009) Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **297**: L238-50.
- Chandra SM, Razavi H, Kim J, Agrawal R, Kundu RK, Jesus Perez V *et al.* (2011) Disruption of the apelin-APJ system worsens hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **31**: 814-820.
- Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM; Frost A, Tapson VF *et al.* (2001) Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension. A randomised placebocontrolled study. *The Lancet* **358**: 1119-1123.
- Chazova I, Robbins I, Loyd J, Newman J, Tapson V, Zhdaov V, Meyrick B (2000) Venous and arterial changes in pulmonary veno-occlusive disease, mitral stenosis and fibrosing mediastinitis. *European Respiratory Journal* **15**: 116.
- Chemla D, Castelain V, Herve P, Lecarpentier Y, Brimiouille S (2002) Haemodynamic evaluation of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* **20**: 1314-1331.
- Cheng X, Cheng XS, Pang CCY (2003) Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *European Journal of Pharmacology* **470**: 171-175.
- Chester AH, Yacoub MH, Maoncada S (2017) Nitric oxide and Pulmonary Hypertension. *Global Cardiology Science and Practice* **2**:14.
- Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE (1992) An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* **327**: 70-75.
- Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y, Kundu RK, Sheikh AY, Agrawal, R *et al.* (2008) Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation* **118**: 3343-3354.
- Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Förstermann U (1997) Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry* **1**: 65-73.

- Cool CD, Kennedy D, Voelkel NF, Tudor RM (1997) Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Human Pathology* **28**: 434-442.
- Cournand A, Riley RL, Breed ES, Baldwin ED, Richards DW, Lester MS, Jones M (1945) Measurement of cardiac output in man using the technique of catheterization of the right auricle or ventricle. *The Journal of Clinical Investigation* **24**: 106-116.
- Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA (2006) Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Developmental Biology* **296**: 177-189.
- D'Alonzo GE (1991) Survival in Patients with Primary Pulmonary Hypertension. *Annals of Internal Medicine* **115**: 343.
- Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang B *et al.* (2003) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis. Genetic and physiological evidence. *Circulation* **108**: 3042-3047.
- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC, Salemes N, Gogas J (1995) Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes. A causative factor of toxic anemia in breast cancer patients. *Anticancer Research* **15**: 1435-1446.
- Essop MF (2007) Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *The Journal of Physiology* **584**: 715-726.
- Euler US, Liljestrand G (1946) Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat. *Acta Physiologica Scandinavica* **12**: 301-320.
- Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F, Soubrier F (2008) Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circulation Research* **103**: 432-440.
- Fagan KA, Morrissey B, Fouty BW, Sato K, Harral JW, Morris KG *et al.* (2001) Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respiratory Research* **2**: 306.
- Falcão-Pires I, Gonçalves N, Henriques-Coelho T, Moreira-Gonçalves D, Roncon-Albuquerque R, Leite-Moreira, AF (2009) Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology* **296**: H2007-14.
- Fan C, Iacobas DA, Zhou D, Chen Q, Lai JK, Gavrilov O, Haddad GG (2005) Gene expression and phenotypic characterization of mouse heart after chronic constant or intermittent hypoxia. *Physiological Genomics* **22**: 292-307.
- Farber HW, Loscalzo J (2004) Pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine* **351**: 1655-1665.
- Forssmann W (1929) Die Sondierung des Rechten Herzens. *Klinische Wochenschrift* **8**: 2085-2087.
- Frid MG, Davie NJ, Stenmark KR (2004) Heterogeneity in Hypoxia-Induced Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation. Jason X.-J Yuan (Hg.): Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction, Bd. 252. *Kluwer Academic Publishers* (Developments in Cardiovascular Medicine), 449-469.
- Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM (1991) Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction [published erratum appears in *Circulation* 1991 Nov; 84(5): 2212]. *Circulation* **83**: 2038-2047.

- Furchgott RF (1983) Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation Research* **53**: 557–573.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376.
- Gaine SP, Rubin LJ (1998) Primary pulmonary hypertension. *The Lancet* **352**: 719-725.
- Galanth C, Hus-Citharel A, Li, B, Llorens-Cortès C (2012) Apelin in the control of body fluid homeostasis and cardiovascular functions. *Current Pharmaceutical Design* **18**: 789–798.
- Geiger K, Muendlein A, Stark N, Saely CH, Wabitsch M, Fraunberger P, Drexel H (2011) Hypoxia induces apelin expression in human adipocytes. *Hormone and Metabolic Research* **43**: 380-385.
- Gerasimovskaya E, Kratzer A, Sidiakova A, Salys J, Zamora M, Taraseviciene-Stewart L (2012) Interplay of macrophages and T cells in the lung vasculature. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **302**: L1014-22.
- Gertler JP, Ocasio VH (1993) Endothelin production by hypoxic human endothelium. *Journal of Vascular Surgery* **18** (2), S. 178-184.
- Ghafourifar P, Richter C (1997) Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Letters* **418**: 291-296.
- Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadaş B *et al.* (2004) Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension. A randomized prospective study. *Journal of the American College of Cardiology* **44**: 1488-1496.
- Ghofrani HA, Galiè N, Grimminger F, Grünig E, Humbert, M, Jing ZC *et al.* (2013) Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine* **369**: 330-340.
- Giaid A, Saleh D (1995) Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* **333**: 214-221.
- Gillmore JD, Gordon FB (1975) Effect of exposure to hyperoxic, hypobaric, and hyperbaric environments on concentrations of selected and aerobic and anaerobic fecal flora of mice. *Applied Microbiology* **29**: 358-367.
- Gilmour JR, Evans W (1946) Primary pulmonary hypertension. *J. Pathol.* **58**: 687-697.
- Glassford J, Yue P, Sheikh AY, Chun HJ, Zarafshar S, Chan DA *et al.* (2007) HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **293**: E1590-6.
- Goetze JP, Rehfeld JF, Carlsen J, Videbaek R, Andersen CB, Boesgaard S; Friis-Hansen L (2006) Apelin. A new plasma marker of cardiopulmonary disease. *Regulatory Peptides* **133**: 134-138.
- Gomez-Arroyo J, Saleem SJ, Mizuno S, Syed AA, Bogaard HJ, Abbate A *et al.* (2012) A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension. Problems and prospects. *American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **302**: L977-91.
- Goonasekera CD, Rees DD, Woolard P, Frend A, Shah V, Dillon MJ (1997) Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *Journal of Hypertension* **15**: 901-909.
- Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages. Mechanism and functions. *Immunity* **32**: 593-604.

- Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE (2001) Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **37**: 489-492.
- Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K, Goerdts S (2001) Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scandinavian Journal of Immunology* **53**: 386-392.
- Gray GA, Patrizio M, Sherry L, Miller AA, Malaki M, Wallace AF *et al.* (2010) Immunolocalisation and activity of DDAH I and II in the heart and modification post-myocardial infarction. *Acta Histochemica* **112**: 413-423.
- Griess P (1864) On a New Series of Bodies in Which Nitrogen is Substituted for Hydrogen. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **154**: 667-731.
- Groves BM, Reeves JT, Sutton JR, Wagner PD, Cymerman A, Malconian MK *et al.* (1987) Operation Everest II. Elevated high-altitude pulmonary resistance unresponsive to oxygen. *Journal of Applied Physiology*. **63**: 521-530.
- Gurzu B, Petrescu BC, Costuleanu M, Petrescu G (2006) Interactions between apelin and angiotensin II on rat portal vein. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **7**: 212-216.
- Halank M, Hoeper MM, Ghofrani HA, Meyer FJ, Stähler G, Behr J *et al.* (2017) Riociguat for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Results from a phase II long-term extension study. *Respiratory Medicine* **128**: 50-56.
- Hall S, Brogan P, Haworth SG, Klein N (2009) Contribution of inflammation to the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension in children. *Thorax* **64**: 778-783.
- Han S, Wang G, Qi X, Lee HM, Englander EW, Greeley GH (2008) A possible role for hypoxia-induced apelin expression in enteric cell proliferation. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **294**: R1832-9.
- Hatano S, Strasser T (1975) Primary pulmonary hypertension. Report. Geneva: World Health Organization.
- Hecht HH, Kuida H, Lange RL, Thorne JL, Brown AM (1962) Brisket disease. *The American Journal of Medicine* **32**: 171-183.
- Hislop A, Reid L (1976) New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *British Journal of Experimental Pathology* **57**: 542-554.
- Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M *et al.* (2013) Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **62**: D42-50.
- Hoeper MM, Huscher D, Pittrow D (2016) Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *International Journal of Cardiology* **203**: 612-613.
- Hoffmann A, Gloe T, Pohl U (2001) Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive. A comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *Journal of Cellular Physiology* **188**: 33-44.
- Höpfel G, Ogunshola O, Gassmann M (2003) Hypoxia and high altitude. The molecular response. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **543**: 89-115.
- Horiuchi Y, Fujii T, Kamimura Y, Kawashima K (2003) The endogenous, immunologically active peptide apelin inhibits lymphocytic cholinergic activity during immunological responses. *Journal of Neuroimmunology* **144**: 46-52.

- Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S *et al.* (2000) Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 21061-21067.
- Houston CS, Sutton JR, Cymerman A, Reeves JT (1987) Operation Everest II. Man at extreme altitude. *Journal of Applied Physiology* **63**: 877-882.
- Hu X, Atzler D, Xu X, Zhang P, Guo H, Lu Z *et al.* (2011) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **31**: 1540-1546.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM *et al.* (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **43**: 13S-24S.
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V *et al.* (2006) Pulmonary arterial hypertension in France. Results from a national registry. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **173**: 1023-1030.
- Huo H, Luo Z, Wang M, Yu X, Liao Z, Zhou X, Yue S (2014) MicroRNA expression profile in intrauterine hypoxia-induced pulmonary hypoplasia in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* **8**: 747-753.
- Iannone L, Zhao L, Dubois O, Duluc L, Rhodes CJ, Wharton J *et al.* (2014) miR-21/DDAH1 pathway regulates pulmonary vascular responses to hypoxia. *The Biochemical Journal* **462**: 103–112.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 9265-9269.
- Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S *et al.* (2004) Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 26274-26279.
- Izgüt-Uysal VN, Gemici B, Birsen I, Acar N, Üstünel I (2017) The effect of apelin on the functions of peritoneal macrophages. *Physiological Research* **66**: 489-496.
- Jacobi J, Sydow K, von Degenfeld G, Zhang Y, Dayoub H, Wang B *et al.* (2005) Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation* **111**: 1431-1438.
- Jensen R, Pierson RE, Braddy PM, Saari DA, Benitez A, Horton DP *et al.* (1976) Brisket disease in yearling feedlot cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **169**: 515-517.
- Jia YX, Lu ZF, Zhang J, Pan CS, Yang JH, Zhao J *et al.* (2007) Apelin activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Peptides* **28**: 2023-2029. D
- Kakimoto Y, Akazawa S (1970) Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *The Journal of Biological Chemistry* **245**: 5751-5758.
- Katsuki S, Murad F (1977) Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Molecular Pharmacology* **13**: 330-341.

- Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S *et al.* (2001) Molecular properties of apelin. Tissue distribution and receptor binding. *Biochimica et Biophysica Acta* **1538**: 162-171.
- Kerr JS, Ruppert CL, Tozzi CA, Neubauer JA, Frankel HM, Yu SY, Riley DJ (1987) Reduction of chronic hypoxic pulmonary hypertension in the rat by an inhibitor of collagen production. *The American Review of Respiratory Disease* **135**: 300-306.
- Kielstein JT, Bode-Böger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, Fliser D, Hoepfer MM (2005) Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **25**: 1414-1418.
- Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K (1993) Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**: 657-662.
- Klob J (1865) Endarteriitis pulmonalis deformans. *Wochenblatt der k. k. Gesellschaft der Ärzte in Wien*, **1865**: 357-361.
- Klötting C (2010) Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie. Reversibilität und therapeutische Effekte durch körperliches Training. Zugl.: Gießen, Univ., Diss., 2010. 1. Aufl. Giessen: VVB Laufersweiler.
- Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS (1993) Nitric oxide synthase in human and rat lung. Immunocytochemical and histochemical localization. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular biology* **9**: 371-377.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide. An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 4651-4655.
- Lambden S, Martin D, Tomlinson J, Mythen M, Leiper J (2016) Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 in the regulation of nitric oxide synthesis in animal and observational human models of normobaric hypoxia. *The Lancet* **387**: 62
- Lan B, Hayama E, Kawaguchi N, Furutani Y, Nakanishi T (2015) Therapeutic efficacy of valproic acid in a combined monocrotaline and chronic hypoxia rat model of severe pulmonary hypertension. *PloS One* **10**: e0117211.
- Lechner M, Lirk P, Rieder J (2005) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology. The two sides of the same coin. *Seminars in Cancer Biology* **15**: 277-289.
- Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, Schultz GM, Kundu RK, Ashley EA *et al.* (2009) Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *American journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology* **296**: H1329-35.
- Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P (1999) Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *The Biochemical Journal* **343**: 209-214.
- Lewis CE, Pollard, JW (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research* **66**: 605-612.
- Linsky T, Wang Y, Fast W (2011) Screening for dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibitors reveals ebselen as a bioavailable inactivator. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2**: 592-596.

- Liu W, Zhang Y, Lu L, Wang L, Chen M, Hu T (2017) Expression and Correlation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) with Pulmonary Artery Remodeling and Right Ventricular Hypertrophy in Experimental Pulmonary Embolism. *Medical Science Monitor* **23**: 2083-2088.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**: 402-408.
- Lüneburg N, Lieb W, Zeller T, Chen MH, Maas R, Carter AM *et al.* (2014) Genome-wide association study of L-arginine and dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for symmetric dimethylarginine. *Circulation. Cardiovascular Genetics* **7**: 864-872.
- MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H *et al.* (1996) Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *British Journal of Pharmacology* **119**: 1533-1540.
- Machado RF, Londhe Nerkar MV, Dweik RA, Hammel J, Janocha A, Pyle J *et al.* (2004) Nitric oxide and pulmonary arterial pressures in pulmonary hypertension. *Free Radical Biology & Medicine* **37**: 1010-1017.
- Madden MC, Vender RL, Friedman M (1986) Effect of hypoxia on prostacyclin production in cultured pulmonary artery endothelium. *Prostaglandins* **31**: 1049–1062.
- Maggiorini M, Léon-Velarde F (2003) High-altitude pulmonary hypertension. A pathophysiological entity to different diseases. *European Respiratory Journal* **22**: 1019-1025.
- Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ *et al.* (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* **105**: 659-669.
- Mantovani A, Sica A, Locati M (2007) New vistas on macrophage differentiation and activation. *European Journal of Immunology* **37**: 14-16.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* **13**: 453-461.
- Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y (2004) Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**: 1909-1911.
- McDermott JR (1976) Studies on the catabolism of NG -methylarginine, NG, NG -dimethylarginine and NG, NG -dimethylarginine in the rabbit. *The Biochemical Journal* **154**: 179-184.
- McLaughlin VV, Genthner DE, Panella MM, Rich S (1998) Reduction in pulmonary vascular resistance with long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in primary pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* **338**: 273-277.
- Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY *et al.* (2003) Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *The Journal of Neurochemistry* **84**: 1162-1172.
- Meng J, Li ZX, Jiang W, Xu C, Li YC, Huang J, Sun QM (2010) Relationship of Serum ADMA With pulmonary hypertension in patients on hemodialysis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* **39**: 242-246.
- Mereles D, Ehlken N, Kreuscher S, Ghofrani S, Hoeper MM, Halank M *et al.* (2006) Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation* **114**: 1482-1489.

- Michaelis L, Menten M (2013) The kinetics of invertin action. 1913. *FEBS Letters* **587**: 2712-2720.
- Migliaccio CT, Holian A (2010) Inflammatory Cells of the Lung: Macrophages. *Comprehensive Toxicology* **15**: 93-113.
- Millatt LJ, Whitley G, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, Johns RA (2003) Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **108**: 1493-1498.
- Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S; Okuda S; Imaizumi T (1999) Endogenous nitric oxide synthase inhibitor. A novel marker of atherosclerosis. *Circulation* **99**: 1141–1146.
- Molossi S, Clausell N, Rabinovitch M (1995) Reciprocal induction of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β activity mediates fibronectin synthesis in coronary artery smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology* **163**: 19-29.
- Moncada S, Higgs EA (2006) The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology* **147**: S193-201.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1989) Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemical Pharmacology* **38**: 1709-1715.
- Murad F, Arnold WP, Mittal CK, Braughler JM (1979) Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions for cyclic GMP. *Advances in Cyclic Nucleotide Research* **11**: 175-204.
- Nakajima T, Matsuoka Y, Kakimoto Y (1971) Isolation and identification of N-G-monomethyl, N-G, N-G-dimethyl- and N-G,N' G-dimethylarginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. *Biochimica et Biophysica Acta* **230**: 212-222.
- Nathan CF (1987) Secretory products of macrophages. *The Journal of Clinical Investigation* **79**: 319-326.
- Newman JH, Trembath RC, Morse JA, Grunig E, Loyd JE, Adnot S *et al.* (2004) Genetic basis of pulmonary arterial hypertension. Current understanding and future directions. *Journal of the American College of Cardiology* **43**: 33S-39S.
- O'Carroll AM, Don ALJ, Lolait SJ (2003) APJ Receptor mRNA Expression in the Rat Hypothalamic Paraventricular Nucleus. Regulation By Stress and Glucocorticoids. *Journal of Neuroendocrinology* **15**: 1095-1101.
- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL *et al.* (1993) A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* **136**: 355-360.
- Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K (1990) Dimethylarginine:pyruvate aminotransferase in rats. Purification, properties, and identity with alanine:glyoxylate aminotransferase 2. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 20938-20945.
- Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K (1987) Metabolism of NG,NG-and NG,N'G-dimethylarginine in rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **252**: 526-537.
- Olschewski H, Rose F, Grünig E, Ghofrani HA, Walrmath D, Schulz R *et al.* (2001) Cellular pathophysiology and therapy of pulmonary hypertension. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **138**: 367-377.
- Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS (2007) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH). Expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **293**: H3227-45.

- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526.
- Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **153**: 1251-1256.
- Papadopoulos DP, Mourouzis I, Faselis, C, Perrea D, Makris T, Tsioufis C, Papademetriou V (2013) Masked hypertension and atherogenesis. The impact of apelin and relaxin plasma levels. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)* **15**: 333-336.
- Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJV, Caballero L, Stewart S (2007) An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *The European Respiratory Journal* **30**: 104-109.
- Pepkeza J (1991) Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. In: *The Lancet* **338** (8776), S. 1173-1174.
- Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM *et al.* (2004) Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **43**: 25S-32S.
- Pitkin SL, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP (2010) Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man. *British Journal of Pharmacology* **160**: 1785-1795.
- Pullamsetti S, Kiss L, Ghofani HA, Voswinckel R, Haredza P, Klepetko W, Aigner C *et al.* (2005) Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *FASEB Journal*. **19**:1175–1177.
- Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L (1979) Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia. Hemodynamic and structural features. *The American Journal of Physiology* **236**: H818-27.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987) The anti-aggregating properties of vascular endothelium. Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology* **92**: 639-646.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 5193-5197.
- Rajpurohit R, Paik WK, Kim S (1992) Enzymatic methylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein in isolated liver nuclei. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1122**: 183-188.
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology* **101**: 746-752.
- Rich S, Brundage BH (1987) High-dose calcium channel-blocking therapy for primary pulmonary hypertension. Evidence for long-term reduction in pulmonary arterial pressure and regression of right ventricular hypertrophy. *Circulation* **76**: 135-141.
- Richards DW (1947) Contributions of right heart catheterization to the physiology of congestive heart failure. *The American Journal of Medicine* **3**: 434–446.
- Romberg E (1891) Ueber sklerose der lungen arterie. *Deutsches Archiv für Klinische Medizin* 1891, **1891**: 197-206.
- Ronkainen VP, Ronkainen JJ, Hänninen SL, Leskinen H, Ruas JL, Pereira T *et al.* (2007) Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB*

Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **21**: 1821-1830.

Rubin LJ (1997) Primary pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* **336**: 111-117.

Rubin LJ, Mendoza J, Hood M, McGoon M, Barst R, Williams WB et al. (1990) Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Annals of Internal Medicine* **112**: 485-491.

Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A et al. (2002) Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine* **346**: 896-903.

Rubin LJ, Roux S (2002) Bosentan. A dual endothelin receptor antagonist. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **11**: 991-1002.

Ryan J, Bloch K, Archer SL (2011) Rodent models of pulmonary hypertension. Harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *International Journal of Clinical Practice. Supplement* (172)15-34.

Salcedo A, Garijo J, Monge L, Fernández N, Luis García-Villalón A, Sánchez Turrión V et al. (2007) Apelin effects in human splanchnic arteries. Role of nitric oxide and prostanoids. *Regulatory Peptides* **144**: 50-55.

Sanchez O, Marcos E, Perros F, Fadel E, Tu L, Humbert M et al. (2007) Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **176**: 1041-1047.

Sastry BKS, Narasimhan C, Reddy NK, Raju BS (2004) Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension. A randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Journal of the American College of Cardiology* **43**: 1149-1153.

Schewe T (2005) Molecular actions of ebselen – an anti-inflammatory antioxidant. *General Pharmacology. The Vascular System* **26**: 1153-69.

Schnoor M, Cullen P, Lorkowski J, Stolle K, Robenek H, Troyer D et al. (2008) Production of Type VI Collagen by Human Macrophages. A New Dimension in Macrophage Functional Heterogeneity. *The Journal of Immunology* **180**: 707-719.

Selvetella G, Hirsch E, Notte A, Tarone G, Lembo G (2004) Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways. Points of convergence and divergence. *Cardiovascular Research* **63**: 373-380.

Sheikh AY, Chun HJ, Glassford AJ, Kundu RK, Kutschka I, Ardigo D et al. (2008) In vivo genetic profiling and cellular localization of apelin reveals a hypoxia-sensitive, endothelial-centered pathway activated in ischemic heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **294**: H88-98.

Simonneau G, Galiè N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G et al. (2004) Clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **43**: 5S-12S.

Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A et al. (2013) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **62**: D34-41.

Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV et al. (2012) Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **186**: 261-272.

- Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG (2006) Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. Cellular and molecular mechanisms. *Circulation Research* **99**: 675-691.
- Stuehr DJ (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **37**: 339-359.
- Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP (2012) Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiological Reviews* **92**: 367-520.
- Szokodi I (2002) Apelin, the Novel Endogenous Ligand of the Orphan Receptor APJ, Regulates Cardiac Contractility. *Circulation Research* **91**: 434-440.
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX *et al.* (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **251**: 471-476.
- Tatemoto T, Takayama K, Zou M, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M (2001) The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regulatory Peptides* **99**: 87-92.
- Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS (2009) Cellular ADMA. Regulation and action. *Pharmacological Research* **60**: 448-460.
- Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto MK, Omata M *et al.* (1997) Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney International* **52**: 1593-1601.
- Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM (2000) Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1. Comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* **68**: 101-105.
- Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP (1994) Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* **89**: 2176-2182.
- Tuder RM, Chacon M, Alger L, Wang J, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y *et al.* (2001) Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension. Evidence for a process of disordered angiogenesis. *The Journal of Pathology* **195**: 367-374.
- Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF (1994) Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The American Journal of Pathology* **144**: 275-285.
- Urbanova D, Ressler J, Widimsky J, Ostadal B, Pelouch V, Prochazka J (1973) Pulmonary vascular changes induced by intermittent altitude hypoxia and their reversibility in rat. *Beitrage zur Pathologie* **150**: 389-399.
- Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T (1998) Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sciences* **62**: 2425-2430.
- Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R (2001) Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *The Lancet* **358**: 2127-2128.
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *The Lancet* **339**: 572-575.
- Van den Borst B, Schols AM, Theije C, Boots AW, Köhler SE, Goossens GH, Gosker HR (2013) Characterization of the inflammatory and metabolic profile of adipose tissue in a mouse model of chronic hypoxia. *Journal of Applied Physiology* **114**: 1619-1628.

- Vergadi E, Chang MS, Lee C, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A *et al.* (2011) Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **123**: 1986-1995.
- Wang B, Wood IS, Trayhurn P (2007a) Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* **455**: 479-492.
- Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendonca M *et al.* (2007b) Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. *Circulation Research* **101**: 627–635.
- Wang G, Kundu R, Han S, Qi X, Englander EW, Quertermous T, Greeley GH (2009) Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract. *Regulatory Peptides* **158**: 32-39.
- Weitkamp B, Cullen P, Plenz G, Robenek H, Rauterberg J (1999) Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. *The FASEB Journal* **13**:1445-1457.
- Wirth A, Wang S, Takefuji M, Tang C, Althoff TF, Schweda F *et al.* (2016) Age-dependent blood pressure elevation is due to increased vascular smooth muscle tone mediated by G-protein signalling. *Cardiovascular Research* **109**: 131-140.
- Xiao J, Li X, Liu J, Fan X, Lei H, Li C (2017) Identification of reference genes in blood before and after entering the plateau for SYBR green RT-qPCR studies. *PeerJ* **5**, e3726.
- Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T *et al.* (2004) Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**:1746-1748.
- Yamazato Y, Ferreira Anderson J, Hong K, Sriramula S, Francis J, Yamazato M *et al.* (2009) Prevention of pulmonary hypertension by Angiotensin-converting enzyme 2 gene transfer. *Hypertension* **54**: 365-371.
- Zakrzewicz D, Eickelberg O (2009) From arginine methylation to ADMA. A novel mechanism with therapeutic potential in chronic lung diseases. *BMC Pulmonary Medicine* **9**: 5.
- Yin FC, Spurgeon H, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG (1982) Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy. Application in the aging rat. *The American Journal of Physiology* **243**: H941-7.
- Zhang H, Gong Y, Wang Z, Jiang L, Chen R, Fan X *et al.* (2014) Apelin inhibits the proliferation and migration of rat PSMCs via the activation of PI3K/Akt/mTOR signal and the inhibition of autophagy under hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **18**: 542-553.
- Zhang J, Liu Q, Hu X, Fang Z, Huang F, Tang L, Zhou S (2015) Apelin/APJ signaling promotes hypoxia-induced proliferation of endothelial progenitor cells via phosphoinositide-3 kinase/Akt signaling. *Molecular Medicine Reports* **12**: 3829-3834.
- Zhu P, Huang F, Lin F, Yuan Y, Chen F, Li Q (2013) Plasma apelin levels, blood pressure and cardiovascular risk factors in a coastal Chinese population. *Annals of Medicine* **45**: 494-498.

8 Anhang

8.1 Ergänzende Daten

8.1.1 DDAH1-Immunoblots aus lysierten HPMEC

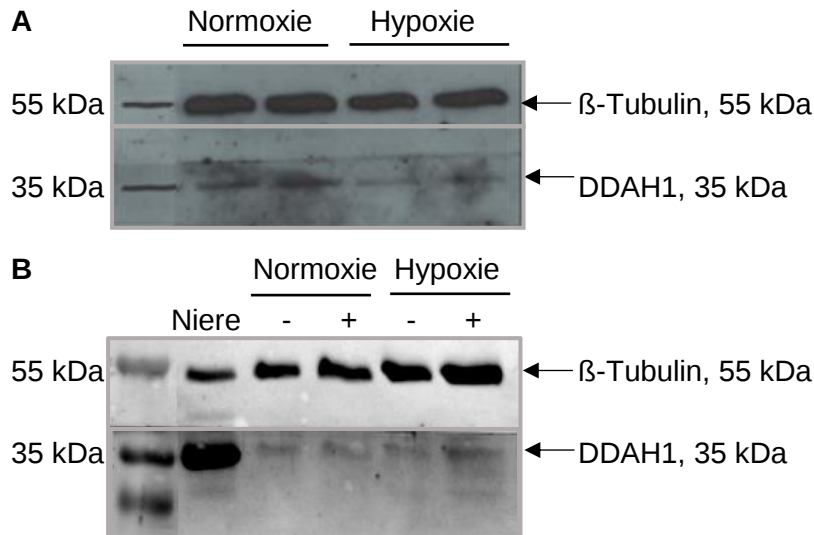


Abbildung 8.1: DDAH1-Immunoblots von Humanen Pulmonalen Mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC). A. DDAH1-Proteinexpression von hypoxisch- und normoxisch kultivierten HPMEC. B. Immunoblot von Apelin-behandelten (+; 10 pmol/L) und unbehandelten Zellen (-) unter Normoxie- oder Hypoxie-Exposition. Die Detektion erfolgte mittels Antikörper-Inkubation. Die β-Tubulin Proteinexpression diente als Ladekontrolle.

8.1.2 DDAH1-Immunoblots aus dem Lungenlysat von Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen

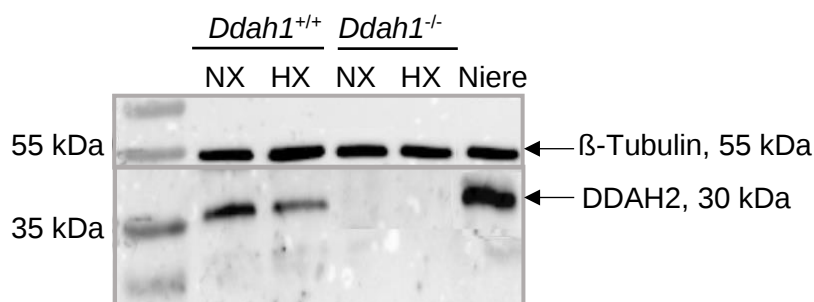


Abbildung 8.2: DDAH1-Immunoblot aus Lungen-Proteinlysaten von unter Normoxie und Hypoxie gehaltenen Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen. Die Analyse erfolgte mittels Immunoblot und anschließender Antikörper-Inkubation. Die β-Tubulin-Proteinexpression stellte die Ladekontrolle dar. HX, Hypoxie; NX, Normoxie.

8.1.3 DDAH-Immunoblots von Apelin- und NaCl-supplementierten Mäusen

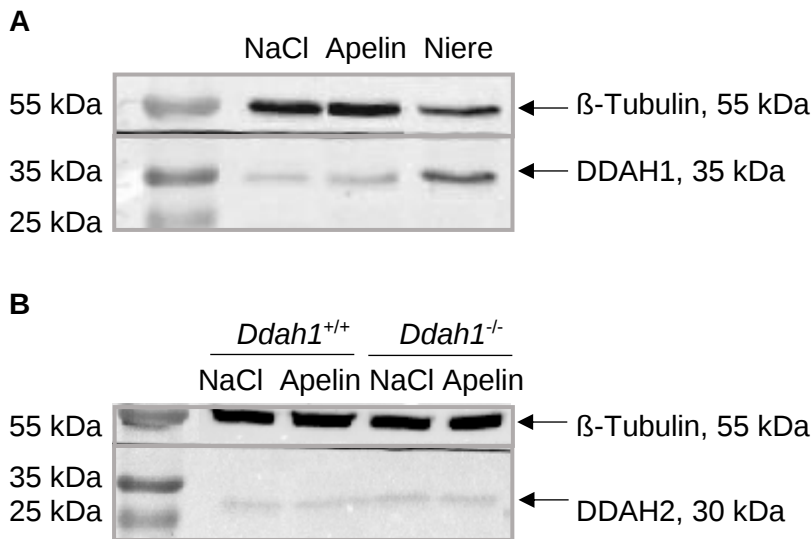


Abbildung 8.3: DDAH1 und DDAH2-Proteinexpression aus Lungen-Proteinlysaten von NaCl- und Apelin-supplementierten Mäusen. **A.** DDAH1-Proteinexpression in Natriumchlorid (NaCl)- und Apelin-supplementierten Wildtyp-Mäusen. **B.** Proteinexpression der DDAH2 in Wildtyp- und *Ddah1*-defizienten Mäusen, supplementiert mit NaCl oder Apelin. Die Proteine wurden mittels Immunoblot und Antikörper-Detektion analysiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion von β-Tubulin.

8.1.4 Apelin-Plasmakonzentrationen in arteriellem und venösem Blut

Zur Analyse, ob die Technik der Blutabnahme die Apelin-Plasmakonzentration beeinflusst, wurden die Plasmakonzentrationen von arteriellem Blut mit denen von venösem Blut in Wildtyp-Mäusen verglichen. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

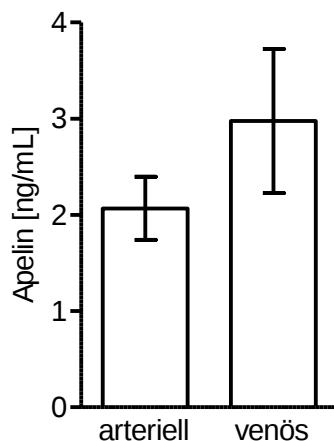


Abbildung 8.4: Apelin-Plasmakonzentration in arteriellem und venösem Blut von Wildtyp-Mäusen. Die Apelin-Plasmakonzentrationen in Wildtyp-Mäusen wurde in kardial entnommenem arteriellem Blut sowie in venösem Blut, das retroorbital entnommen wurde, bestimmt. Die Apelin-Konzentrationen wurden mittels ELISA analysiert. n=7, keine signifikanten Unterschiede.

8.1.5 Analyse des Makrophagen-Subtyps aus ex vivo generierten mononukleären Zellen

Zur Überprüfung des Makrophagen-Subtyps wurde mithilfe einer qPCR die Expression des Chemokins CC-Chemokinligand (CCL) 22 und des Oberflächenmarkers Transglutaminase (TGM) 2 überprüft, welche spezifische Marker für Makrophagen des Subtyps M2a darstellen.

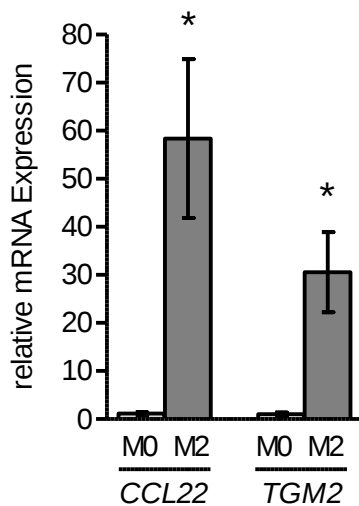


Abbildung 8.5: Relative Expression von CC-Chemokinligand (CCL) 22 und Transglutaminase (TGM) 2 zur Analyse des Makrophagen-Subtyps vor und nach der Polarisierung von M0-Makrophagen (M0) zu M2-Makrophagen (M2). Die Polarisierung erfolgte mittels Behandlung mit *Macrophage Colony-stimulating factor* (1 ng/mL) und Interleukin-4 (20 ng/mL). Die Analyse erfolgt mittels qPCR durch Relativierung auf die Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase. Die Werte, dargestellt als MW $\pm$ SEM, wurden mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet und auf die unpolarisierten M0-Makrophagen normiert. n=3; *p<0,05; zweiseitiger t-Test.

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Antonia Katharina Glatzel

Geburtsdatum: 21.12.1988

Geburtsort: Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufserfahrung

Seit April 2016 Vita-Apotheke, Hamburg

Seit April 2014 Promotion am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Seit März 2014 Hansa-Apotheke, Nienburg

Ausbildung

März 2014 Approbation als Apothekerin

Jan. 2013 - Dez.2013 Pharmazeutisches Praktisches Jahr (Bettin's Apotheke; Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg)

Nov. 2013 2. Staatsexamen, Christan-Albrechts-Universität zu Kiel

Okt. 2008 - Juli 2012 Studium der Pharmazie, Christan-Albrechts-Universität zu Kiel

Juli 2008 allgemeine Hochschulreife, Marion-Dönhoff-Gymnasium, Nienburg

Aug. 2005 - Juni 2006 Preparatoria de La Salle, Chihuahua, Mexiko

Aug. 2001 - Juni 2008 Marion-Dönhoff-Gymnasium, Nienburg

Auszeichnungen

März 2016 1. Posterpreis, 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie, Berlin

Okt. 2015 - Sept. 2017 Promotionsstipendium der Universität Hamburg

8.3 Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Harbaum, Lars; Baaske, Kaaja M.; Simon, Marcel; Oqueka, Tim; Sinning, Christoph; **Glatzel, Antonia**; Lüneburg, Nicole; Sydow, Karsten; Bokemeyer, Carsten; Klose, Hans (2017): Exploratory analysis of the neutrophil to lymphocyte ratio in patients with pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulmonary Medicine* 17 (1), S. 72

Harbaum, Lars; Renk, Emilia; Yousef, Sara; **Glatzel, Antonia**; Lüneburg, Nicole; Hennigs, Jan K.; Oqueka, Tim; Baumann, Hans J.; Atanackovic, Djordje; Grünig, Ekkehard; Böger, Rainer H.; Bokemeyer, Carsten; Klose, Hans (2016): Acute effects of exercise on the inflammatory state in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *BMC pulmonary medicine* 16 (1), S. 145

Harbaum, Lars; Renk, Emilia; Yousef, Sara; **Glatzel, Antonia**; Lüneburg, Nicole; Hennigs, Jan K.; Oqueka, Tim; Baumann, Hans J.; Atanackovic, Djordje; Grünig, Ekkehard; Böger, Rainer H.; Bokemeyer, Carsten; Klose, Hans (2015): Acute effects of exercise on the inflammatory state in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *CHEST* 148 (4), e131-e132.

Kongressbeiträge

Glatzel, Antonia; Lüneburg, Nicole; Oetjen, Elke; Böger, Rainer H.; Harbaum, Lars: Effects of Apelin on the L-Arginine - Nitric Oxide Pathway in Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells - Implications for Pulmonary Arterial Hypertension? *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie*, Berlin, März 2016. 1. DGP Posterpreis

Glatzel, Antonia; Lüneburg, Nicole; Klose, Hans; Böger, Rainer H.; Harbaum, Lars: Modulation of the L-Arginine-Nitric Oxide Pathway by Apelin in an *In Vitro* Model of Pulmonary Arterial Hypertension. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Düsseldorf, September 2015.

8.4 Gefahrenstoffe nach GHS (H- und P-Sätze)

Die Klassifizierung erfolgte anhand der 8. Anpassung an den technischen Fortschritt der CLP-Verordnung, 2018.

Gefahrenhinweise, H-Sätze

- H200 Instabil, explosiv.
- H201 Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.
- H202 Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H203 Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H204 Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H205 Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
- H220 Extrem entzündbares Gas.
- H221 Entzündbares Gas.
- H222 Extrem entzündbares Aerosol.
- H223 Entzündbares Aerosol.
- H224 Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
- H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
- H228 Entzündbarer Feststoff.
- H229 Behälter steht unter Druck: kann bei Erwärmung bersten.
- H230 Kann auch in Abwesenheit von Luft explosionsartig reagieren.
- H231 Kann auch in Abwesenheit von Luft bei erhöhtem Druck und/oder erhöhter Temperatur explosionsartig reagieren.
- H240 Erwärmung kann Explosion verursachen.
- H241 Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
- H242 Erwärmung kann Brand verursachen.
- H250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
- H251 Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H252 In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H260 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
- H261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
- H270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
- H271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
- H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
- H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
- H281 Enthält tiefkaltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -verletzungen verursachen.

- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden (entfällt, wenn auch H314).
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H331 Giftig bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (sofern bekannt, konkrete Wirkung angeben). (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefährdung bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (sofern bekannt, konkrete Wirkung angeben). (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefährdung bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.

- H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt).
(Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem an-deren Expositionsweg besteht).
- H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt).
(Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition. (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition. (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H300+H310 Lebensgefahr bei Verschlucken oder Hautkontakt.
- H300+H330 Lebensgefahr bei Verschlucken oder Einatmen.
- H301+H330 Lebensgefahr bei Hautkontakt oder Einatmen.
- H300+H310+H330 Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H301+H311 Giftig bei Verschlucken oder Hautkontakt.
- H301+H331 Giftig bei Verschlucken oder Einatmen.
- H311+H331 Giftig bei Hautkontakt oder Einatmen.
- H301+H311+H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H302+H312 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt.
- H302+H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.
- H312+H332 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.
- H302+H312+H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H400 Sehr giftig für Wasserorganismen (entfällt, wenn auch H410).
- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H413 Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.
- H420 Schädigt die öffentliche Gesundheit und die Umwelt durch Ozonabbau in der äußeren Atmosphäre.

Ergänzende Gefahrenmerkmale, EUH-Sätze

- EUH001 In trockenem Zustand explosiv.
- EUH014 Reagiert heftig mit Wasser.
- EUH018 Kann bei Verwendung explosionsfähige / entzündbare Dampf /Luft-Gemische bilden.
- EUH019 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
- EUH029 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
- EUH031 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
- EUH032 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
- EUH044 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
- EUH066 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
- EUH070 Giftig bei Berührung mit den Augen.
- EUH071 Wirkt ätzend auf die Atemwege.
- EUH201 Enthält Blei. Nicht für den Anstrich von Gegenständen verwenden, die von Kindern gekaut oder gelutscht werden könnten.
- EUH201A Achtung! Enthält Blei.
- EUH202 Cyanacrylat. Gefahr. Klebt innerhalb von Sekunden Haut und Augenlider zusammen. Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- EUH203 Enthält Chrom(VI). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH204 Enthält Isocyanate. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH205 Enthält epoxidhaltige Verbindungen. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH206 Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da gefährliche Gase (Chlor) freigesetzt werden können.
- EUH207 Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen einhalten.
- EUH208 Enthält (Name des sensibilisierenden Stoffes). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH209 Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden.
- EUH209A Kann bei Verwendung entzündbar werden.
- EUH210 Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
- EUH401 Zur Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt die Gebrauchsanleitung einhalten.

Sicherheitshinweise, P-Sätze

- P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
- P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
- P211 Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
- P220 Von Kleidung und anderen brennbaren Materialien fernhalten.
- P222 Keinen Kontakt mit Luft zulassen.
- P223 Keinen Kontakt mit Wasser zulassen.
- P230 Feucht halten mit ...
- P231 Inhalt unter inertem Gas/... handhaben und aufbewahren.
- P232 Vor Feuchtigkeit schützen.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P234 Nur in Originalverpackung aufbewahren.
- P235 Kühl halten.
- P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
- P24 Explosionsgeschützte [elektrische ... / Lüftungs-... / Beleuchtungs-... / ...] Geräte verwenden.
- P242 Funkenarmes Werkzeug verwenden.
- P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Entladungen treffen.
- P244 Ventile und Ausrüstungsteile öl- und fettfrei halten.
- P250 Nicht schleifen / stoßen / ... / reiben.
- P251 Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach Gebrauch.
- P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
- P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
- P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
- P263 Berührung während der Schwangerschaft und Stillzeit vermeiden.
- P264 Nach Handhabung... gründlich waschen.
- P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
- P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
- P282 Schutzhandschuhe mit Kälteisolierung und zusätzlich Gesichtsschild oder Augenschutz tragen.
- P283 Schwer entflammbare oder flammhemmende Kleidung tragen.
- P284 (Bei unzureichender Belüftung) Atemschutz tragen.

P231+P232 Inhalt unter inertem Gas /... handhaben und aufbewahren. Vor Feuchtigkeit schützen.

P301 Bei Verschlucken:

P302 Bei Berührung mit der Haut:

P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):

P304 Bei Einatmen:

P305 Bei Kontakt mit den Augen:

P306 Bei kontaminierter Kleidung:

P308 Bei Exposition oder falls betroffen:

P310 Sofort Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.

P311 Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.

P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum / Arzt / ... anrufen.

P313 Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P315 Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).

P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).

P330 Mund ausspülen.

P331 Kein Erbrechen herbeiführen.

P332 Bei Hautreizung:

P333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:

P334 In kaltes Wasser tauchen (oder nassen Verband anlegen).

P335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.

P336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.

P337 Bei anhaltender Augenreizung:

P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.

P342 Bei Symptomen der Atemwege:

P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.

P352 Mit viel Wasser / ... waschen.

P353 Haut mit Wasser abwaschen (oder duschen)

P360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.

P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.

P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen.

- P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- P364 Und vor erneutem Tragen waschen.
- P370 Bei Brand:
- P371 Bei Großbrand und großen Mengen:
- P372 Explosionsgefahr.
- P373 Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht.
- P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
- P378 ... zum Löschen ... verwenden.
- P380 Umgebung räumen.
- P381 Bei Undichtigkeit alle Zündquellen entfernen.
- P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
- P301+P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
- P301+P312 Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum / Arzt / ... anrufen.
- P301+P330+P331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
- P302+P334 Bei Berührung mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen (oder nassen Verband anlegen).
- P302+P335+P334 Bei Berührung mit der Haut: Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen (oder nassen Verband anlegen).
- P302+P352 Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser / ... waschen.
- P303+P361+P353 Bei Berührung mit der Haut [oder dem Haar]: Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen (oder duschen).
- P304+P340 Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
- P305+P351+P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P306+P360 Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P308+P311 Bei Exposition oder falls betroffen: Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.

- P308+P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P332+P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P336+P315 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben. Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P342+P311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
- P361+P364 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P362+P364 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P370+P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P370+P378 Bei Brand: ... zum Löschen ... verwenden.
- P370+P380+P375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P371+P380+P375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P370+P372+P380+P373 Bei Brand: Explosionsgefahr. Umgebung räumen. KEINE Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe/Gemische/Erzeugnisse erreicht.
- P370+P380+P375+(P378) Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen. (... zum Löschen verwenden.)
- P401 Aufbewahren gemäß ...
- P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.
- P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P406 In korrosionsbeständigem / ... Behälter mit korrosionsbeständiger Innenauskleidung aufbewahren.
- P407 Luftspalt zwischen Stapeln / Paletten lassen.
- P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P411 Bei Temperaturen nicht über ... °C / ... °F aufbewahren.
- P412 Nicht Temperaturen über 50 °C / 122 °F aussetzen.

- P413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg / ... lbs bei Temperaturen nicht über ... °C / ... °F aufbewahren.
- P420 Getrennt aufbewahren.
- P402+P404 In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.
- P403+P233 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.
- P403+P235 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.
- P410+P403 Vor Sonnenbestrahlung schützen. An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P410+P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen. Nicht Temperaturen über 50 °C / 122 °F aussetzen.
- P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.
- P502 Informationen zur Wiederverwendung oder Wiederverwertung bei Hersteller oder Lieferant erfragen.

9 Danksagung

Die vorliegende Dissertation ist im Insitut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Rainer Böger entstanden. Ihm danke ich für die Übergabe des spannenden Promotionsprojektes sowie die Aufnahme in seinen Arbeitskreis.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Elke Oetjen für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit, den wissenschaftlichen Input und ihre ständige Präsenz. Ich danke ihr weiterhin für viele Hilfeleistungen im Rahmen meines Dissertationsprojektes - und auch darüber hinaus - sowie für viele gute und lehrreiche Ratschläge.

Bei PD Dr. Nicole Lüneburg, Dr.Lars Harbaum und Dr. Juliane Hannemann möchte ich mich ebenfalls für eine tolle wissenschaftliche und persönliche Betreuung bedanken. Ich danke ihnen für eine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft sowie für tolle Verbesserungsvorschläge, Anregungen und die kritische Auseinandersetzung mit dieser Arbeit.

Anna Steenpaß und Mariola Kaster gilt ein großes Dankeschön für ihre Hilfeleistungen im Labor. Durch ihre große Erfahrung mit diversen Labortechniken durfte ich sehr viel von ihnen lernen und bin ihnen weiterhin für die Unterstützung mit vielen Immunoblots und LC-MS/MS-Messungen dankbar.

Dr. Anika Laing und Kathrin Cordts danke ich für eine tolle gemeinsame Doktorandenzeit, in der wir uns immer gegenseitig unterstützt und immer zusammengehalten haben. Vielen Dank für euren Rückhalt und eure Freundschaft und für viele schöne Momente auch außerhalb der Laborräume.

Weiterhin danke ich der AG Oetjen für ihren Zuspruch und ihre Hilfsbereitschaft jeglicher Art. Eure positive Einstellung hat mich immer wieder motiviert!

Bei PD Dr. Jasmin Wellbrock und Dr. Jan Hennigs möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und Kooperation bedanken. Vielen Dank für eure uneingeschränkte Unterstützung und viele lehrreiche Diskussionen.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Universität Hamburg sowie der Georg und Jürgen Rickertsen-Stiftung für die finanzielle Förderung meines Promotionsprojektes.

Für die fachliche Durchsicht sowie für gestalterische Elemente dieser Arbeit möchte ich mich weiterhin bei Dr. Karoline Morhenn, Dr. Marie Wiechert, Dr. Lars Harbaum, Dr. Ole Beyer, Alexandra Buchholz und Jessica Barbato bedanken.

Meinen Freunden, die mich während meines Studiums in Kiel sowie während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben, gilt weiterhin ein besonderer Dank. Ich danke euch für euren Zuspruch, eure Hilfestellungen und euren Rückhalt! Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die immer an mich geglaubt und nie an mir gezweifelt hat. Danke, dass ihr mir immer beiseite steht, für eure uneingeschränkte Unterstützung, eure Großzügigkeit und bedingungslose Liebe!

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Auto- und parakrine Modulationsmechanismen von Apelin in der Pathogenese der
Pulmonalen Arteriellen Hypertonie**

im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums

Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger und der Betreuung durch Frau Prof. Dr. Elke Oetjen für den Fachbereich Chemie ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt habe.

Hamburg, 26. Juni 2018

Antonia Katharina Glatzel