

Direkte pharmakologische
Gq-Protein-Modulation
in pulmonalen Gefäßen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Alexander Seidinger

aus

Hagen

Bonn 2022

Angefertigt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Daniela Wenzel

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Evi Kostenis

Tag der Promotion: 03.04.2023

Erscheinungsjahr: 2023

Zusammenfassung

Heterotrimere G-Proteine können in vier Familien entsprechend ihrer α -Untereinheit unterteilt werden (Gs, Gi, G12/13 und Gq). Sie überführen ein extrazelluläres Signal nach der Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in eine intrazelluläre Antwort. Jeder Gruppe von G-Proteinen werden spezifische Wirkmechanismen und Zielmoleküle zugeordnet. Eine besondere Bedeutung kommt den Gq-Proteinen in glatten Muskelzellen von Blutgefäßen zu, da sie das Signal verschiedener pathophysiologisch relevanter Vasokonstriktoren, wie z.B. Serotonin, Thromboxan und Endothelin auf intrazelluläre Signalmoleküle übertragen, was schließlich zu einem Ca^{2+} -Anstieg und zur Vasokonstriktion führt. Diese Agonisten sind insbesondere in pulmonalen Gefäßen relevant, da sie bei der Entstehung des Bluthochdrucks in der Lunge (pulmonal-arterielle Hypertonie, PAH) eine wichtige Rolle spielen. Die PAH ist eine schwerwiegende Erkrankung, die durch gesteigerte Vasokonstriktion, Proliferation von glatten Muskelzellen und Rechtsherzhypertrophie gekennzeichnet ist und unbehandelt innerhalb weniger Jahre zum Tode führt. Das Depsipeptid FR900359 (FR) kann aus den Blättern der Pflanze *Ardisia crenata* gewonnen werden und wirkt als ein pharmakologischer spezifischer pan-Gq-Inhibitor. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von FR auf die Kontraktion von Pulmonalarterien der Maus *ex vivo*, auf das Wachstum von humanen glatten Muskelzellen *in vitro* und auf den pulmonalen Blutdruck im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie *in vivo* getestet. Wir können zeigen, dass FR in isometrischen Kraftmessungen eine starke Vasorelaxation in Pulmonalarterien (PAs) der Maus induziert. Auch die kleinen pathophysiologisch relevanten PAs in funktionellen Lungenschnitten und in der isoliert-perfundierten Lunge werden effizient relaxiert. Die lokale intra-tracheale Applikation von FR in der Lunge konnte effektiv eine Serotonin-induzierte rechtsventrikuläre Blutdrucksteigerung *in vivo* verhindern. Im Vergleich mit gegenwärtig verwendeten Medikamenten zur Behandlung der PAH, wie z.B. dem Endothelin-Antagonisten Bosentan, dem Prostazyklin-Analog Iloprost und dem Phosphodiesterase 5-Hemmer Sildenafil zeigte FR eine überlegene vasorelaxierende Wirkung. Neben dem dilatationsfördernden Effekt zeigte FR in einem Wachstumsassay mit humanen glatten Muskelzellen aus der PA eine starke Hemmung des Zellwachstums. Im Modell der chronischen Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie reduzierte die *in vivo*-Gabe von FR den Anstieg des rechtsventrikulären Drucks, die Verdickung der Gefäßwände der PAs sowie die Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie; dies konnten wir sowohl für die präventive als auch für die therapeutische Gabe von FR zeigen. Somit demonstriert diese Arbeit die Relevanz von Gq-Proteinen bei der Pathophysiologie der PAH sowie den starken vasorelaxierenden Effekt von FR in pulmonalen Gefäßen, was auf das therapeutische Potential von FR hindeutet.

Summary

Heterotrimeric G proteins can be subdivided into four families according to their α subunit (Gs, Gi, G12/13, and Gq). They convert an extracellular signal upon activation of G protein-coupled receptors into an intracellular response. Specific mechanisms of action and target molecules are assigned to each family of G proteins. Gq proteins in smooth muscle cells of blood vessels are of particular importance, as they mediate the signal from various pathophysiologically relevant vasoconstrictors such as serotonin, thromboxane and endothelin resulting in intracellular Ca^{2+} increase. These agonists are particularly relevant in pulmonary vessels, since they play an important role in the development of high blood pressure in the lungs (pulmonary arterial hypertension, PAH). PAH is a devastating disease characterized by increased vasoconstriction, smooth muscle cell proliferation, and right ventricular hypertrophy that is fatal within a few years if left untreated. The depsipeptide FR900359 (FR) can be obtained from the leaves of the plant *Ardisia crenata* and acts as a specific pan-Gq inhibitor. In the present work, the effect of FR was tested on the contraction of mouse pulmonary arteries *ex vivo*, on the growth of human smooth muscle cells *in vitro* and on pulmonary blood pressure in the mouse model of hypoxia-induced pulmonary hypertension *in vivo*. We can show that FR induces strong vasorelaxation in isometric force measurements of mouse pulmonary arteries (PAs). Furthermore, pathophysiologically relevant small PAs are also efficiently relaxed when measured in functional lung slices and in the isolated perfused mouse lung. Local intra-tracheal application of FR into the lung could effectively prevent a serotonin-induced increase in right ventricular blood pressure *in vivo*. Compared to currently used drugs for the treatment of PAH (e.g. the endothelin antagonist Bosentan, the phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil and the prostacyclin analog iloprost), FR showed a superior vasorelaxant effect. In addition to strong vasorelaxation, FR induced a pronounced inhibition of cell growth in a growth assay with human pulmonary artery smooth muscle cells. In the model of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, *in vivo* administration of FR reduced the typical increase in right ventricular pressure, vascular wall thickening of PAs and the development of right ventricular hypertrophy; we were able to show this for both preventive and therapeutic administration of FR. Thus, this work demonstrates the relevance of Gq proteins in the pathophysiology of PAH and a strong vasorelaxant effect of FR in pulmonary vessels, pointing towards a therapeutic potential of FR.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary	IV
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Das Gefäßsystem der Lunge.....	1
1.1.1 Aufbau und Funktion von Blutgefäßen	1
1.1.2 Aufbau des Lungengefäßsystems.....	2
1.2 Pulmonale Hypertonie.....	3
1.2.1 Definition und Verlauf.....	3
1.2.2 Pathophysiologische Veränderungen und Behandlung	4
1.3 G-Proteine und ihre Funktion in Blutgefäßen.....	7
1.3.1 Aufbau und Funktion von heterotrimeren G-Proteinen	7
1.3.2 Rolle von G-Proteinen bei der Tonusregulation in Gefäßen.....	8
1.3.3 Rolle von G-Proteinen bei der Regulation des Zellwachstums von glatten Muskelzellen	11
1.4 Pharmakologische G-Protein Inhibition	13
1.4.1 Therapeutisches Potential einer pharmakologischen Gq-Hemmung.....	13
1.4.2 Wirkungen des pan-Gq Inhibitors FR900359.....	13
1.5 Zielsetzung.....	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Verwendete Materialien.....	17
2.1.1 Chemikalien und fertige Lösungen.....	17
2.1.2 Angesetzte Lösungen	21
2.1.3 Färbelösungen.....	22
2.1.4 Gase	22
2.1.5 Geräte.....	23
2.1.6 Software.....	25
2.1.7 Kits.....	25
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.9 Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen.....	26
2.1.10 Verwendete Zellkulturlinien.....	27
2.1.11 Primer	27

2.1.12	Antikörper und Lektine	27
2.1.13	Versuchstiere.....	28
2.2	Zellbiologische Methoden.....	28
2.2.1	Kultivierung von glatten Muskelzellen aus der Pulmonalarterie	28
2.2.1.1	Passagieren.....	28
2.2.2	Wachstumsversuch.....	29
2.2.3	Apoptose-Assay.....	29
2.2.4	Ki-67 Proliferations-Assay	30
2.3	Molekularbiologische Methoden	30
2.3.1	Isolierung von RNA aus Zellen	30
2.3.2	Reverse Transkription	30
2.3.3	PCR	31
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.4	Immunhistochemische Methoden	32
2.4.1	Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)	32
2.4.2	Immunhistochemische Färbung von fixierten Zellen.....	32
2.4.3	Mikroskopie	33
2.5	Tierexperimentelle Methoden und Auswerteverfahren	33
2.5.1	Isometrische Kraftmessungen mittels Myograph in der Maus	33
2.5.1.1	Präparation.....	33
2.5.1.2	Einspannen von Gefäßringen und Äquilibration	34
2.5.1.3	Versuchsablauf	35
2.5.2	Funktionelle Lungenschnitte	35
2.5.2.1	Präparation.....	36
2.5.2.2	Versuchsablauf	36
2.5.3	Isoliert perfundierte Lunge (IPL).....	37
2.5.3.1	Präparation.....	38
2.5.3.2	Negative Druckbeatmung	39
2.5.3.3	Positive Druckbeatmung.....	39
2.5.3.4	Auswertung.....	40
2.5.4	Akute Applikation von vasoaktiven Substanzen	40
2.5.4.1	I.v. Applikation von 5-HT nach intratrachealer Applikation	40
2.5.5	Chronische Applikation von FR.....	41
2.5.6	Chronische Hypoxie	42

2.5.7	Rechtsherz- und Linksherz-Druckkatheter Messung in der Maus	42
2.5.7.1	Präparation.....	42
2.5.7.2	Druck-Messung.....	43
2.5.7.3	Auswertung.....	43
2.5.8	Perfusion und Fixation des Herz-Lungen-Paketes	43
2.5.9	Einbetten von Geweben in Paraffin.....	44
2.5.10	Paraffinschnitte der Lunge und des Herzens	45
2.5.11	Färbung von Paraffinschnitten	45
2.5.11.1	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	45
2.5.11.2	Wheat germ agglutinin (WGA)-Färbung.....	46
2.5.12	Evaluierung der arteriellen Gefäßwanddicke	46
2.5.13	Auswertung der Kardiomyozyten-Fläche.....	46
2.6	Statistik	47
3.	Ergebnisse.....	48
3.1	Untersuchung des Effekts von FR auf den pulmonalen Gefäßtonus	48
3.1.1	Effekt einer Einzeldosis FR nach Vorkontraktion mit verschiedenen Gq-abhängigen Agonisten	48
3.1.2	Effekt der FR-Vorbehandlung auf die 5-HT-DWK in PAs.....	50
3.1.3	Effekt der FR-Vorbehandlung auf die U-46619-DWK in PAs	52
3.1.4	Effekt der FR-Vorbehandlung auf die ET-1 DWK in PAs.....	54
3.2	Effektivität von FR im Vergleich zu PAH-Medikamenten	56
3.3	Wirkung von FR auf intrapulmonale Arterien in funktionellen Lungenschnitten.....	60
3.4	Effekt von FR auf den pulmonal-arteriellen Druck im System der isoliert-perfundierten Lunge	62
3.5	Wirkung von FR auf das kardiovaskuläre System nach einmaliger lokaler Gabe <i>in vivo</i>	63
3.5.1	Hämodynamischer Effekt von FR in gesunden Tieren.....	64
3.5.2	Hämodynamischer Effekt von FR in Tieren mit Hypoxie-induzierter PH.....	65
3.6	Prävention der PH durch FR im Mausmodell.....	67
3.7	Behandlung der PH im Mausmodell mit FR.....	71
4.	Diskussion.....	74
4.1	FR als potenter Wirkstoff für die Demaskierung des Gq-Signaling bei pulmonalen Kontraktionsmechanismen.....	74
4.1.1	Beteiligung von Gq-Proteinen an der Kontraktion von verschiedenen pathologisch relevanten Vasokonstriktoren.....	75

4.1.2	Potenzielle Beteiligung von Gq-Proteinen an der akuten Phase der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion	77
4.2	Vergleich von FR mit aktuellen PAH-Medikamenten.....	77
4.2.1	Vergleich der FR-induzierten Relaxation <i>ex vivo</i>	77
4.2.2	Vergleich der FR-induzierten Verminderung des Zellwachstums <i>in vitro</i>	80
4.2.3	Vergleich der akuten FR-induzierten Effekte auf den RVSP <i>in vivo</i>	82
4.3	Präventiver und therapeutischer Effekt von FR bei der Hypoxie-induzierten PH <i>in vivo</i>	83
4.3.1	Prävention und Therapie der Hypoxie-induzierten PH in der Maus durch FR	83
4.3.2	Potenzielle Nebenwirkungen bei FR-Applikation.....	85
5.	Literaturverzeichnis.....	88
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	107

1. Einleitung

1.1 Das Gefäßsystem der Lunge

1.1.1 Aufbau und Funktion von Blutgefäßen

Das Blutgefäßsystem stellt ein weitverzweigtes Transportsystem für Blut dar, wodurch die Gefäßfunktion eng mit den Funktionen des Blutes verbunden ist. Neben den Blutgasen werden auch Hormone, Vitamine und Mineralstoffe sowie benötigte Nährstoffe über die Blutbahn zu den jeweiligen Organen und entsprechende Metabolite zur Ausscheidung in Niere und Leber transportiert. Neben den Sauerstoff-transportierenden Erythrozyten nutzen auch Zellen des Immunsystems, Zytokine und Antikörper das Gefäßsystem. Zudem spielen die Blutgefäße bzw. deren Gefäßwände in Kombination mit den Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Hämostase (Brandes *et al.*, 2019).

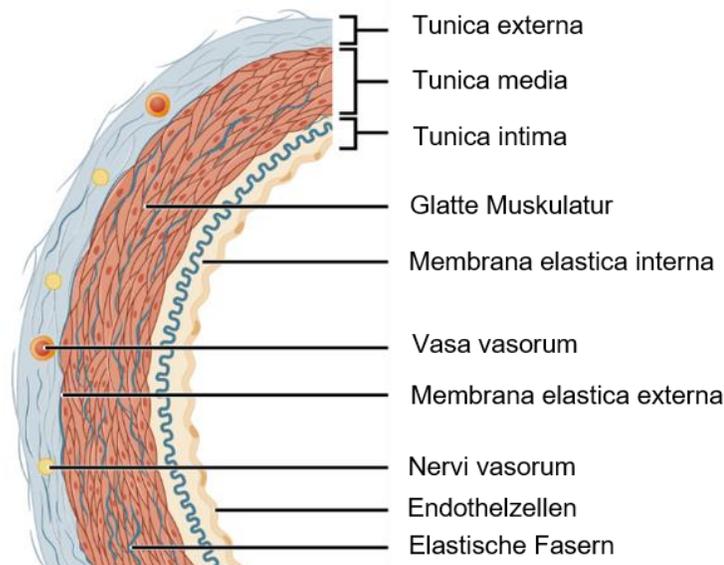


Abb. 1: Aufbau einer arteriellen Blutgefäßwand. Blutgefäße können in drei Schichten, die Tunica intima, media und externa gegliedert werden. Jede Schicht setzt sich aus unterschiedlichen Zelltypen zusammen und erfüllt verschiedene Aufgaben. Verändert nach Betts *et al.*, 2017 (Lizenz: CC BY 4.0).

Die arterielle Gefäßwand wird üblicherweise in drei Schichten, die Tunica intima, die Tunica media und die Tunica externa eingeteilt (Abb. 1). Die Trennung zwischen Blut und Interstitium übernimmt eine Plattenepithelschicht, das Endothel. Unter dem Endothel befindet sich in größeren Arterien die Membrana elastica interna, welche aus elastischen Fasern besteht. Gemeinsam bilden sie die Tunica intima. Darauf folgt die Tunica media, eine aus glatten

Muskelzellen bestehende Schicht. Auch diese Schicht ist mit elastischen Fasern durchzogen. Die äußere Schicht bildet die Tunica externa, welche in großen Arterien durch die Membrana elastica externa von der Tunica media abgegrenzt ist. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern. In ihr liegen die Vasa und Nervi vasorum, welche die umliegenden Schichten mit Nährstoffen versorgen bzw. eine neuronale Modulation ermöglichen. Die Dicke der Tunica externa und der Grad der Muskularisierung nehmen allgemein in Richtung der Kapillaren ab (Betts *et al.*, 2017; Townsley, 2012). Im pulmonalen Gefäßsystem sind die Arteriolen häufig bereits nur zum Teil muskularisiert oder die Muskelschicht fehlt ganz, wie in den kleinen Kapillaren (Brandes *et al.*, 2019; Townsley, 2012). Über den Tonus der glatten Muskelzellen in den arteriellen Blutgefäßen kann die Durchblutung der Organe individuell angepasst werden. Die venöse Gefäßwand wird ebenfalls in die drei Schichten Tunica intima, Tunica media und Tunica externa eingeteilt. Die Venen besitzen im Vergleich zu den Pulmonalarterien mehr Kollagen. Zudem weist die Tunica media eine deutlich dünnere Muskelzellschicht auf (Townsley, 2012).

1.1.2 Aufbau des Lungengefäßsystems

Die Lunge ist der Ort des Gasaustausches. Sauerstoffarmes Blut gelangt über die Venen des Körperkreislaufes in den rechten Ventrikel des Herzens. Ausgehend vom rechten Ventrikel wird das Blut in die Pulmonalarterie ausgeworfen. Diese teilt sich in einen linken und rechten Hauptast auf. Innerhalb der verschiedenen Lungenlappen erreicht das Blut über weitere Verzweigungen, wie segmentale und subsegmentale Gefäße, welche parallel zu entsprechenden Bronchien verlaufen, das Kapillarbett. Die Kapillaren bilden ein dichtes Netz um die Alveolen, sodass eine große Austauschfläche zur Sauerstoffaufnahme bzw. Kohlendioxidabgabe gegeben ist. Das sauerstoffreiche Blut gelangt über Venolen und Venen in die linke Herzkammer und wird in den Körperkreislauf ausgeworfen (Kandathil & Chamarthy, 2018). Während sich das Blut im Körperkreislauf auf die verschiedenen Organsysteme verteilt, fließt das gesamte Blut durch den Lungenkreislauf. Ein fundamentaler Unterschied zwischen dem arteriellen Körper- und dem Lungenkreislaufsystem besteht in den vorherrschenden Blutdrücken. Das Lungengefäßsystem wird, zusammen mit den Körpervenen, dem rechten Ventrikel sowie dem linken Ventrikel während der Diastole, dem Niederdrucksystem zugeordnet. Während im Lungenkreislauf aufgrund einer geringen Menge von mechanisch stützendem Interstitium, einer großen elastischen Dehnbarkeit und einer geringen Muskularisierung in gesunden Probanden ein mittlerer pulmonal-arterieller Druck von ca. 14 mmHg sowie ein systolischer Blutdruck von etwa 21 mmHg besteht (Kovacs *et al.*, 2009),

liegt der mittlere arterielle Druck im systemischen Blutkreislauf bei ca. 105 mmHg und der systolische Blutdruck bei ca. 120 mmHg (Brandes *et al.*, 2019). Diese Unterschiede spiegeln sich auch in der Gefäßwanddicke der pulmonalen und systemischen Arterien wider (Brandes *et al.*, 2019). Eine besondere Bedeutung kommt den präkapillären Widerstandsgefäßen zu, zu denen kleine Arterien und die Arteriolen (10-100 μ M Durchmesser) zählen. Sie sind maßgeblich an der Regulation des Blutflusses ins Kapillarbett und der Modulation des Blutdrucks in der Lunge bzw. in den verschiedenen anderen Organen beteiligt. Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille üben kleine Änderungen des Gefäßdurchmessers der präkapillären Widerstandsgefäße einen starken Einfluss auf den vaskulären Widerstand und damit auch den arteriellen Blutdruck sowie den Blutfluss aus. Somit sind diese Widerstandsgefäße auch von besonderer Relevanz bei der therapeutischen Modulation des Blutdrucks.

1.2 Pulmonale Hypertonie

1.2.1 Definition und Verlauf

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwere progrediente Erkrankung des Lungengefäßsystems. Sie ist durch einen mittleren pulmonal-arteriellen Druck von über 20 mmHg unter Ruhebedingungen definiert (Humbert *et al.*, 2022; Simonneau *et al.*, 2019; Yaghi *et al.*, 2020). PH-Patienten*innen werden aufgrund der zugrundeliegenden Pathophysiologie, der Veränderungen von hämodynamischen Parametern, wie beispielsweise dem pulmonal-kapillären Wedge-Druck, sowie ähnlichen Behandlungsstrategien in 5 Gruppen eingeteilt (Gruppe 1: Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH), Gruppe 2: Pulmonale Hypertonie infolge von Linksherzerkrankungen, Gruppe 3: Pulmonale Hypertonie infolge von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie, Gruppe 4: Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie und andere Pulmonalarterien-Obstruktionen, Gruppe 5: Pulmonale Hypertonie mit unklarem und/oder multifaktoriellem Mechanismus) (Galiè *et al.*, 2016). Dabei ist besonders das Patienten*innenkollektiv der Gruppe 1 gut charakterisiert. Die PAH ist mit 15-50 Fällen pro eine Millionen Individuen eine seltene Erkrankung (Lau *et al.*, 2017). Neben dem mittleren pulmonal-arteriellen Druck wird diese Patienten*innengruppe durch einen Wedge-Druck von ≤ 15 mmHg und einem erhöhten pulmonal-vaskulärem Widerstand von > 2 Wood-Einheiten definiert (Humbert *et al.*, 2022). Bei der PAH handelt es sich laut Definition um eine präkapilläre Form der PH (Humbert *et al.*, 2013). Betroffene klagen über zunehmende Atemnot, Müdigkeit, Synkopen und klinische Anzeichen von Herzversagen (Sommer *et al.*, 2021), wie

beispielsweise Ödeme und körperliche Leistungseinbußen. Nahezu alle Symptome lassen sich auf das fortschreitende Rechtsherzversagen durch den chronisch erhöhten Blutdruck in den Lungengefäßen zurückführen (Lai *et al.*, 2014). Das Rechtsherzversagen führt letztendlich auch zum Tod der/die betroffenen Patienten*innen (Montani *et al.*, 2013; Tonelli *et al.*, 2013). Anfänglich auftretende Symptome können meist nicht klar einer PAH zugeordnet werden, was häufig eine späte Diagnose im fortgeschrittenen Stadium nach sich zieht. Selbst nach Auftreten erster Symptome dauert es bei 21 % der Patienten*innen über 2 Jahre bis die PAH diagnostiziert ist (Brown *et al.*, 2011). Im Verdachtsfall kommen verschiedene Untersuchungsmethoden zum Einsatz, wie ein Elektrokardiogramm, eine Echokardiographie oder die Magnetresonanztomographie. Zur Bestätigung einer PAH-Diagnose sowie zur Beurteilung des vorliegenden Krankheitsausmaßes ist eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung indiziert, sodass die relevanten hämodynamischen Parameter bestimmt werden können (Galiè *et al.*, 2016). Die mediane Überlebenszeit von unbehandelten PAH-Patienten*innen liegt bei 2,8 Jahren (D'Alonzo *et al.*, 1991) und die 1-Jahres-, 3-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensrate lag bis vor kurzem bei 68 %, 48 % und 34 % (D'Alonzo *et al.*, 1991). Durch die Etablierung neuer Therapieoptionen und -kombinationen konnten die Überlebensraten in den letzten Jahren verbessert werden (Sitbon *et al.*, 2016), wobei die Gesamt-Überlebensrate weiterhin unbefriedigend ist (L.-Y. Wang *et al.*, 2017). Daher werden dringend neue molekulare Ansätze und Therapien benötigt.

1.2.2 Pathophysiologische Veränderungen und Behandlung

Die PAH ist durch eine multifaktorielle Genese charakterisiert, welche hauptsächlich durch eine gesteigerte Kontraktilität, eine Verdickung (Remodeling) der pulmonalen Gefäßwände und Thrombosen gekennzeichnet ist. All diese Prozesse resultieren in einem gesteigerten pulmonalen Widerstand und somit in einer gesteigerten Nachlast für die rechte Herzkammer. Dies führt zunächst zu einer Rechtsherzhypertrophie und schließlich zur Dilatation des rechten Ventrikels, Rechtsherzversagen und Tod (Barst, 2005). Die physiologische Tonusregulation in der Lunge basiert auf dem abgestimmten Zusammenspiel von vasokonstriktorisches und vasodilatatorischen Mediatoren. Somit ist die gesteigerte Kontraktilität der pulmonalen Gefäße bei der PAH durch ein Ungleichgewicht von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren begründet (Lai *et al.*, 2014), welche ihre Wirkung zumeist über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) vermitteln (Wettschureck & Offermanns, 2005). Das pulmonale Gefäßremodeling ist vor allem durch eine Hypertrophie/Hyperplasie der glatten Gefäßmuskelschicht sowie eine endotheliale Dysfunktion

und Infiltration von Entzündungszellen gekennzeichnet. Die strukturellen Veränderungen betreffen hauptsächlich die kleineren distal gelegenen pulmonalen Arterien bzw. Widerstandsgefäße. Zudem kommt es zu einer Muskularisierung von üblicherweise nicht-muskularisierten Arteriolen (Humbert *et al.*, 2004; Thompson & Lawrie, 2017). Neben den Vasokonstriktoren spielen dabei sowohl Wachstumsfaktoren wie der *platelet derived growth factor* (PDGF), der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder der *epidermal growth factor* (EGF) (Barst, 2005) als auch Interleukine (Savale *et al.*, 2009) und Chemokine (Mamazhakypov *et al.*, 2021) eine Rolle.

Die Behandlung der PAH schließt einige generelle bzw. unterstützende Maßnahmen, wie beispielsweise eine Sauerstofftherapie, angeleitete körperliche Aktivität, Diuretika-Gabe oder die Verabreichung von Antikoagulanzen, ein (Lan *et al.*, 2018). Eine weitere Option bietet die Gabe von Ca²⁺-Kanal-Blockern, wobei zunächst eine akute Vasoreagibilitätstestung durchgeführt wird, um das Ansprechen der Patienten*innen auf diese Therapiemöglichkeit zu überprüfen (Galiè *et al.*, 2016; Sitbon *et al.*, 2005). Im Anschluss erfolgt die weitere Behandlung mit Medikamenten, welche die vasokonstriktorische und proliferierende Wirkung verschiedener Mediatoren verhindern bzw. die vasodilatierende und antiproliferierende Wirkung fördern sollen (Abb. 2). Dabei stehen hauptsächlich der Endothelin (ET-1)-, der Prostazyklin- sowie der NO-Signalweg im Fokus. ET-1 ist einer der stärksten bekannten Vasokonstriktoren (Yanagisawa *et al.*, 1988) und wird hauptsächlich in den Endothelzellen der Blutgefäße aus der Vorstufe Prepro-ET-1 gebildet und sezerniert (Davenport *et al.*, 2016). Prepro-ET-1 wird auf Transkriptionsebene unter anderem durch Thrombin reguliert (Stow *et al.*, 2011). Nach der Sekretion aus dem Endothel kann ET-1 in pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) an zwei unterschiedliche ET-1-Rezeptoren binden, ET_A und ET_B, welche beide eine Kontraktion vermitteln (Fukuroda *et al.*, 1994; LaDouceur *et al.*, 1993; Rubanyi & Polokoff, 1994) und Proliferationsprozesse aktivieren können (Davie *et al.*, 2002). Die ET_B-Rezeptoren werden auch auf Endothelzellen exprimiert. Ihre Aktivierung stimuliert die Freisetzung von Prostazyklin und NO, welche eine Relaxation auslösen können. Die Wirkung auf den Gesamtonus ist aber gering. In PAH-Patienten*innen wurden gesteigerte ET-1-Level im Blut gefunden (Stewart *et al.*, 1991), wobei sich die höchste ET-1-Produktion in Gefäßen mit verdickter glatter Gefäßmuskelschicht zeigte (Giaid *et al.*, 1993) und das Ausmaß der arteriellen Gefäßwandverdickung mit den ET-1-Levels korrelierte (Bressollette *et al.*, 2001). Aufgrund dieser ET-1-vermittelten Wirkungen werden ET-Rezeptor-Antagonisten, wie beispielsweise der duale ET_A- und ET_B-Rezeptor-Antagonist Bosentan, bei der Behandlung der PAH verwendet (Lau *et al.*, 2017). Die Pathophysiologie der PAH ist neben der verstärkten

Wirkung von ET-1 durch Reduktion von typischen vasorelaxierenden und antiproliferativen Mechanismen, wie der Prostazyklin-induzierten Relaxation über den Adenylatzyklase (AC)-zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-Proteinkinase A (PKA)-Signalweg oder dem NO-lösliche Guanylatzyklase (sGC)-zyklisches Guaninmonophosphat (cGMP)-Signalweg, gekennzeichnet (Lai *et al.*, 2014). Endogenes Prostazyklin entsteht im Endothel aus dem Arachidonsäure-Stoffwechsel durch die Prostazyklin-Synthase und wirkt auf die benachbarte glatte Muskelzellschicht relaxierend. In Lungen von PAH-Patienten*innen wurde eine reduzierte Expression der Prostazyklin-Synthase gefunden (Tuder *et al.*, 1999), was auch die reduzierte renale Ausscheidung der Prostazyklin-Metabolite in Erkrankten erklären könnte (Christman *et al.*, 1992). Zudem zeigten Mäuse mit einem Prostazyklin-Rezeptor Knockout eine stärkere PAH-Pathophysiologie (Hoshikawa *et al.*, 2001). Um die verminderte Prostazyklin-induzierte cAMP-Aktivierung bei der PAH auszugleichen, werden therapeutisch auch Prostazyklin-Analoga eingesetzt. NO wird im Endothel durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) produziert, diffundiert in die anliegende glatte Muskelschicht, aktiviert die sGC und induziert dadurch über cGMP eine Relaxation. cGMP wird durch die Phosphodiesterase 5 (PDE5) abgebaut. Um die Bildung bzw. Wirkung von cGMP zu verstärken, werden sGC-Stimulatoren, wie beispielsweise das Riociguat, oder PDE5 Inhibitoren, beispielsweise Sildenafil, therapeutisch eingesetzt (Lai *et al.*, 2014) (Abb. 2). Trotz dieser Behandlungsoptionen stehen für viele PAH-Patienten*innen derzeit keine adäquaten Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Eine Heilung ist zudem ebenfalls nicht möglich. Besonders eine konsequente Verringerung der rechtsventrikulären Nachlast durch vasorelaxierende Substanzen scheinen aber die rechtsventrikuläre Funktion sowie das klinische Ergebnis zu verbessern (Vizza *et al.*, 2022). Daher wird auch weiterhin intensiv an neuen Behandlungsmöglichkeiten geforscht und potenzielle Kandidaten werden in klinischen Studien getestet (Sommer *et al.*, 2021).

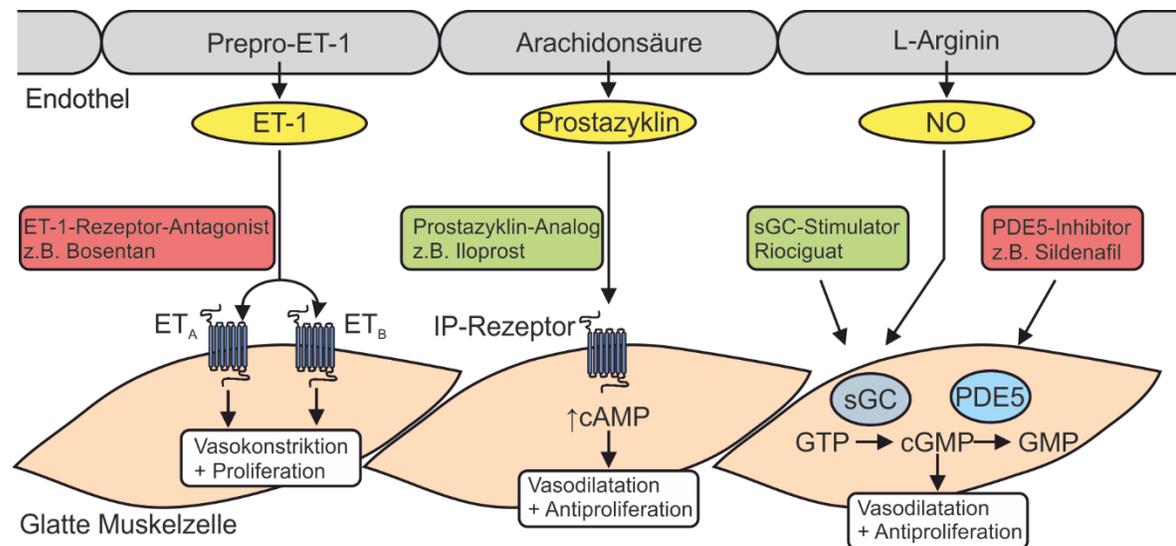


Abb. 2: Molekulare Zielstrukturen der PAH-Medikamente. Medikamente zur Behandlung der PAH greifen hauptsächlich in einen von drei Signalwegen ein. Zur Minderung der Endothelin (ET-1, Vorstufe Prepro-ET-1)-induzierten Vasokonstriktion und seiner proliferationsfördernden Wirkung werden ET-1-Rezeptor-Antagonisten, z.B. Bosentan, appliziert. Zur Förderung der Prostazyklin-induzierten Vasodilatation und Antiproliferation werden Prostazyklin-Analoga, wie beispielsweise Iloprost, verabreicht. Dieses wirkt über Prostazyklin (IP)-Rezeptor Aktivierung und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Endogenes Prostazyklin entsteht aus dem Arachidonsäure-Stoffwechsel. Zur Förderung der Bildung bzw. der Wirkung von zyklischem Guaninmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) wird die lösliche Guanylatzyklase (sGC) durch Riociguat aktiviert oder der Abbau von cGMP über Phosphodiesterase 5 (PDE5) zu Guanosinmonophosphat (GMP) durch einen PDE5-Inhibitor, beispielsweise Sildenafil, verhindert. Dadurch wird die vasodilatierende, antiproliferative Wirkung von cGMP bzw. nachgeschalteten Effektoren verstärkt. Endogen wird die sGC durch NO stimuliert, welches aus dem Stoffwechsel von L-Arginin entsteht. Verändert nach Lau *et al.*, 2017.

1.3 G-Proteine und ihre Funktion in Blutgefäßen

1.3.1 Aufbau und Funktion von heterotrimeren G-Proteinen

Heterotrimere G-Proteine sind zentrale intrazelluläre Mediatoren der Signaltransduktion. Sie sind aus drei Untereinheiten, einer α -, β - und γ -Untereinheit, aufgebaut und bilden im inaktiven Zustand eine an die Plasmamembran gebundene Einheit. Basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten und der Funktion der $G\alpha$ -Untereinheit, werden G-Proteine in vier Familien, G_s , G_i , G_q und $G_{12/13}$, eingeteilt. Diese werden weiterhin in Subtypen differenziert, wie beispielsweise die G_q -Familie in $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{15/16}$. Insgesamt sind über 20 α -, 6 β - und 12 γ -Varianten in Säugetieren bekannt (Hurowitz *et al.*, 2000). Durch die spezifische Zusammensetzung der einzelnen G-Proteine wird ihre zelluläre Funktion bestimmt (Neves *et al.*, 2002; Wettschreck & Offermanns, 2005). Einige Subtypen werden ubiquitär exprimiert, wie etwa $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$, während die Expression anderer Subtypen auf spezifische Zellen

begrenzt ist. Die $G_{\alpha_{15/16}}$ -Proteine aus der Gq-Familie werden beispielsweise vorrangig in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Wettschureck & Offermanns, 2005). Die Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine erfolgt durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), welche als Guanosintriphosphat (GTP)-Austausch-Faktoren (GEF) fungieren und den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch GTP an der α -Untereinheit stimulieren. Der GDP/GTP-Austausch führt zu einer Konformationsänderung in der α -Untereinheit und einer dadurch bedingten Trennung der α - von der $\beta\gamma$ -Untereinheit, sodass beide Bestandteile mit ihren nachgeschalteten Effektoren interagieren können. Durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit, welche durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) gesteigert werden kann, wird das GTP wieder zu GDP hydrolysiert. Die α -Untereinheit verbindet sich wieder mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit und das heterotrimere G-Protein kehrt in seinen inaktiven Zustand zurück (Kostenis *et al.*, 2020). Im Genom von Säugetieren wurden über 1000 GPCR-kodierende Sequenzen gefunden, wovon 400-500 GPCRs Rezeptoren für Hormone, Neurotransmitter oder parakrine Faktoren darstellen. Die meisten GPCRs sind in der Lage G-Proteine aus verschiedenen Familien zu aktivieren, wodurch die Bindung eines Liganden am GPCR mehrere Signalkaskaden gleichzeitig in Gang setzen kann (Wettschureck & Offermanns, 2005). Durch die Vielzahl an GPCRs und Kombinationsmöglichkeiten an G-Proteinen, die aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt sein können, entstehen unzählige Möglichkeiten der feinen Regulation von zellulären Prozessen. Zudem besteht auch innerhalb einer Zellpopulation eine große Heterogenität in Bezug auf die Ausstattung mit verschiedenen GPCRs (Kaur *et al.*, 2017), wodurch das über G-Proteine vermittelte Signal von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein kann. Eine zentrale Rolle nehmen G-Proteine bei der Tonusregulation in Blutgefäßen ein. Daher wird das grundsätzliche Signaling der einzelnen G-Protein-Familien im nächsten Abschnitt anhand ihrer Rolle bei der Tonusregulation in Gefäßen beschrieben.

1.3.2 Rolle von G-Proteinen bei der Tonusregulation in Gefäßen

Gq-Proteine sind zentrale Mediatoren im Kontraktionsprozess. Sie aktivieren über ihre α -Untereinheit die Phospholipase C β (PLC β) welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu 1,4,5-Inositoltrisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. IP $_3$ diffundiert zum sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und bindet an IP $_3$ -Rezeptoren, was zum Ausstrom von Calcium (Ca $^{2+}$) ins Zytosol führt. Ca $^{2+}$ bindet an Calmodulin und führt zur Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) (Kamoto *et al.*, 2015). Diese überträgt eine Phosphatgruppe vom Adenosintriphosphat (ATP) auf die leichten Ketten des Myosins (Myosin-LC), wodurch eine Interaktion zwischen Myosinkopf und Aktin ermöglicht wird. Durch den

Querbrückenschlag des Myosinkopfes wird eine Verkürzung des Sarkomers und somit die Kontraktion vermittelt. Parallel dazu aktiviert DAG Ca^{2+} -abhängig und Ca^{2+} -unabhängig verschiedene Proteinkinase C (PKC)-Isoformen, welche unter anderem das Protein *C-kinase potentiated protein phosphatase-1 inhibitor* (CPI-17) phosphorylieren. Dieses hemmt die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP), wodurch eine Dephosphorylierung der Myosin-LC vermindert und letztlich die Kontraktion gefördert wird (Kitazawa *et al.*, 2000; Ringvold & Khalil, 2017; Walsh *et al.*, 2006) (Abb. 3).

Auch die anderen G-Protein-Familien können den Phosphorylierungszustand der Myosin-LC beeinflussen. Eine Kontraktion kann neben Gq- auch von G12/13- sowie Gi-Proteinen ausgelöst werden (Althoff & Offermanns, 2015). $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ -Proteine aktivieren dabei den Leukämie-assoziierten Rho-Guaninaustauschfaktor (RhoGEF), kurz LARG, welcher den Austausch von GDP zu GTP des RhoA-Proteins fördert. Das aktivierte RhoA stimuliert Rho-Kinasen (ROCK), welche die MLCP hemmen und somit eine Kontraktion begünstigen (Wettschureck & Offermanns, 2002). Dieser Mechanismus ist Ca^{2+} -unabhängig. Neben $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ -Proteinen können auch Gq-Proteine RhoGEFs aktivieren (Althoff & Offermanns, 2015; Booden *et al.*, 2002; Lutz *et al.*, 2005). Zudem können G_{α_i} -Proteine die Aktivität einiger AC-Isoformen herabsetzen, wodurch eine Kontraktion gefördert wird (Sadana & Dessauer, 2009). Über die $\beta\gamma$ -Untereinheit können Gi-Proteine ebenfalls die PLC β stimulieren, wodurch eine Kontraktion verstärkt wird (Selbie *et al.*, 1997). Dabei wird jedoch oft die α -Untereinheit von Gq-Proteinen für die initiale Aktivierung der PLC β benötigt, was nicht durch die Gi- $\beta\gamma$ -Untereinheit geleistet werden kann (Pfeil *et al.*, 2020; Rhee, 2001; T. Wang *et al.*, 2000).

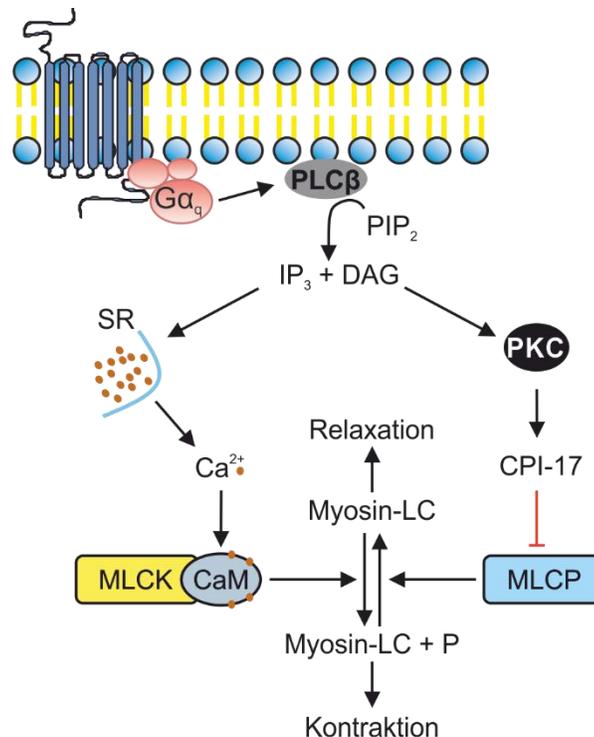


Abb. 3: Die Aktivierung von Gq-Proteinen führt zur Kontraktion. Die Aktivierung von Gq-gekoppelten Rezeptoren führt über die α -Untereinheit des Gq-Proteins zur Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) und zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu 1,4,5-Inositoltrisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). IP $_3$ aktiviert IP $_3$ -Rezeptoren auf dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), wodurch der Liganden-gesteuerte Ca $^{2+}$ -Kanal öffnet und Ca $^{2+}$ -Ionen ins Zytosol gelangen. Ca $^{2+}$ bindet an Calmodulin (CaM), welches die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) aktiviert und die Kontraktion fördert. Zudem aktiviert DAG über die Proteinkinase C (PKC) den *C-kinase potentiated protein phosphatase-1 inhibitor* (CPI-17), welcher die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) hemmt. Verändert nach Wettschureck & Offermanns, 2002, 2005.

Die Induktion einer Relaxation über G-Proteine wird vornehmlich über G α_s -Proteine, AC-Stimulation, cAMP-Bildung und nachfolgende Aktivierung der PKA initiiert. Durch eine direkte Stimulation der MLCP durch PKA wird die Myosin-LC dephosphoryliert und die Relaxation gefördert (Murthy, 2006). Die AC-Aktivität kann auch über bestimmte $\beta\gamma$ -Untereinheiten moduliert werden (J. Chen *et al.*, 1995; Sunahara *et al.*, 1996). Die Dauer des cAMP-Effektes wird über seinen Abbau durch PDEs gesteuert (Rybalkin *et al.*, 2003). Zusätzlich wird eine Relaxation durch Hemmung von Proteinen aus dem Gq- und G12/13-Signalweg erreicht, wie beispielsweise die durch PKA-induzierte Phosphorylierung von *regulator of G protein signaling* (RGS) 4 und RGS4-vermittelte Inaktivierung von Gq (Huang *et al.*, 2007; Murthy, 2006). Ein weiteres Beispiel ist die Phosphorylierung von RhoA durch PKA und die dadurch reduzierte Rho-Kinase-Aktivierung (Murthy *et al.*, 2003).

Der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur wird letztlich immer über den Phosphorylierungszustand der Myosin-LC moduliert, welcher durch die Aktivität der MLCK (Phosphorylierung) und der MLCP (Dephosphorylierung) bestimmt wird. Dabei ist zu beachten, dass die Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen simultan ablaufen, sodass sich das System in einem dynamischen Gleichgewicht befindet, wodurch der Tonus feingradig an die jeweils erforderlichen Bedingungen angepasst werden kann. Die Regulation dieses Gleichgewichts durch vasoaktive Hormone und Transmitter wird vor allem durch GPCRs und Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen gesteuert (Wettschureck & Offermanns, 2005).

1.3.3 Rolle von G-Proteinen bei der Regulation des Zellwachstums von glatten Muskelzellen

Vasokonstriktoren bzw. die durch sie aktivierten G-Proteine sind nicht nur an der Modulation des Gefäßtonus beteiligt, sondern spielen auch bei Regulation des Zellwachstums von glatten Muskelzellen eine Rolle (Gutkind, 1998; Humbert *et al.*, 2004). Es ist seit langem bekannt, dass verschiedene Agonisten, welche den PLC/Ca²⁺/PKC-Signalweg aktivieren, die DNA-Synthese stimulieren können. Dabei wurde bereits 1991 eine Beteiligung von Gq-Proteinen diskutiert. Der Effekt trat Agonisten-abhängig allerdings zum Teil nur synergistisch in Kombination mit Wachstumsfaktoren auf (Moolenaar, 1991). Ein potenzierender Effekt von Gq-gekoppelten Rezeptor-Agonisten, wie beispielsweise Thrombin, Histamin, ET-1 und Thromboxan, auf den mitogenen Effekt von Wachstumsfaktorrezeptoren findet typischerweise in glatten Muskelzellen aus dem Atemwegen statt (Billington & Penn, 2003). In glatter Gefäßmuskulatur wurde ein synergistischer Effekt von ET-1 und PDGF beispielsweise in humanen aortalen glatten Muskelzellen beschrieben (Yang *et al.*, 1999). Zudem stimulieren PDGF oder Thrombin die Produktion und die Ausschüttung von ET-1 in aortalen glatten Muskelzellen der Ratte (Hahn *et al.*, 1990; Kohno *et al.*, 1995). Ein weiteres Beispiel für eine Beteiligung von Gq-Proteinen an Wachstumsprozessen wurde in Verbindung mit dem Angiotensin-Rezeptor publiziert. Die Aktivierung des Rezeptors in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) führte zu einer Gq- und Ca²⁺-abhängigen *epidermal growth factor* receptor (EGFR)-Transaktivierung und Proliferation (Inagami & Eguchi, 2000). Diese Angiotensin-Rezeptor-induzierte Transaktivierung konnte in aortalen VSMC durch Gq-Inhibition mittels des Gq-Inhibitors YM254890 (YM) verhindert werden (Ohtsu *et al.*, 2008). Eine Transaktivierung von EGFR in aortalen VSMC wurde auch für die vasoaktiven Substanzen ET-1 und Phenylephrin gezeigt (Schreier *et al.*, 2011). Passend dazu wurde publiziert, dass RGS5, welches die GTP-Hydrolyse an der G α -Untereinheit von Gq- und Gi-Proteinen beschleunigt, die Angiotensin II-induzierte Proliferation von humanen

SMC aus der Koronararterie verhindern kann (Daniel *et al.*, 2016). Eine weitere Studie zeigte, dass die RGS5-Expression in aortalen VSMC auch durch PDGF gehemmt werden kann. Das führte zu einer Verstärkung des Gq- und Gi-Signaling und Hypertrophie der glatten Muskelzellen (Gunaje *et al.*, 2011). Ein ähnliches Bild zeigte sich in GPCR-Kinase 2 (GRK2) Knockout-Mäusen, bei denen hauptsächlich die Desensibilisierung von $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -gekoppelten Rezeptoren vermindert und somit die Proliferation von aortalen VSMC gesteigert wurde (Tutunea-Fatan *et al.*, 2015). Im Modell der Neointima-Formation nach vaskulärer Verletzung der Karotis-Arterie konnte deutlich gemacht werden, dass durch den genetischen Knockout von $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ die Proliferation der glatten Muskelzellen durch fehlende *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Phosphorylierung reduziert wurde (Althoff *et al.*, 2012). Auch in Studien zu glatter Gefäßmuskulatur aus der Lunge wurden bereits erste Hinweise auf eine Beteiligung von Gq-Proteinen gefunden. In humanen PASMC (hPASMC) wurde ein synergistischer Wachstumseffekt von ET-1 und Serum beschrieben (Lambers *et al.*, 2013). Die Beteiligung von Gq-Proteinen an der Angiotensin II-induzierten Proliferation in PASMC aus der Ratte konnte auch durch pharmakologische Gq-Inhibition mittels des Peptid-basierten kompetitiven G-protein-Antagonisten 2A (GP-2A) demonstriert werden (Tanski *et al.*, 2004). Weitere Hinweise auf eine Gq-Beteiligung an Wachstumsprozessen liefern Studien in Nephrylsin-Knockout-Mäusen. Nephrylsin spaltet und inaktiviert vasoaktive Peptide wie Angiotensin II oder ET-1, wodurch ihre Wirkung begrenzt wird. Nach entsprechendem Knockout führte eine gesteigerte lokale ET-1 Konzentration zur vermehrten Transaktivierung des PDGF-Rezeptors und Proliferation in PASMC (Karoor *et al.*, 2013).

Die anderen G-Protein-Familien sind ebenfalls an Wachstumsprozessen beteiligt. So wurde beispielsweise publiziert, dass G12/13-Proteine zu der Thromboxan-induzierten Zellproliferation in murinen aortalen VSMC beitragen (Feng *et al.*, 2016). Zudem wird G12/13-Proteinen eine Rolle bei der VSMC-Differenzierung zugeschrieben (Althoff *et al.*, 2012). Gi-Proteine können die Proliferation über Reduzierung des cAMP-Spiegels, die Aktivität der $\beta\gamma$ -Untereinheit und MAPK-Aktivierung in VSMC steigern (Althoff & Offermanns, 2015). Zudem wurde gezeigt, dass Gi-Proteine an der PDGF- und Hypoxie-induzierten Proliferation von PASMC aus Schweinen beteiligt sind (Lannér *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu verhindert die Aktivierung von Gs-Proteinen über eine Erhöhung von cAMP den Übergang der VSMCs von der G0 in die G1-Phase des Zellzyklus (Althoff & Offermanns, 2015; S. A. Smith *et al.*, 2019). Ein Beispiel hierfür ist das Prostazyklin-Analog Iloprost, welches die PDGF-induzierte Proliferation in hPASMC über cAMP hemmen kann (Wharton *et al.*, 2000).

1.4 Pharmakologische G-Protein Inhibition

1.4.1 Therapeutisches Potential einer pharmakologischen Gq-Hemmung

Spezifische Knockout-Tiere für Proteine der Gq- und G12/13-Familie demonstrierten bereits die entscheidende Bedeutung dieser G α -Proteine für die Gefäßkonstriktion durch gängige Vasokonstriktoren in systemischen Gefäßen. Dabei zeigte sich, dass der Knockout von G α_q und G α_{11} eine deutlich stärkere Reduktion der Kontraktion aller getesteten Agonisten auslöste als der Knockout von G α_{12} und G α_{13} (Wirth *et al.*, 2008). Neben den genannten Knockout-Modellen könnten pharmakologische G-Protein-Inhibitoren einen wichtigen Beitrag für die Identifikation von beteiligten G-Proteinen nach GPCR-Aktivierung leisten. In der Forschung wird zur Hemmung von Gi-Proteinen seit langem Pertussis Toxin (PTX) aus dem Erreger *Bordetella pertussis* verwendet. Dieses hindert durch Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierung einige G-Proteine der Gi-Protein-Familie an der Bindung mit entsprechenden GPCRs (Casey *et al.*, 1990; Katada & Ui, 1982). Neben dieser Gi-abhängigen Reduzierung der AC-Hemmung von PTX sind jedoch auch viele Effekte bezüglich der Immunantwort, Rezeptordichte und Kinaseaktivitäten von PTX bekannt, welche unabhängig von der ADP-Ribosylierung sind (Mangmool & Kurose, 2011). Dadurch und durch die Vielzahl an Gi-abhängigen Prozessen im Körper ist es für eine klinische Anwendung ungeeignet. Nichtsdestotrotz könnten G-Protein-Inhibitoren bei spezifischer und zielgerichteter Anwendung auch von großem therapeutischem Interesse sein. Maus Knockout-Modelle, denen die G α -Untereinheit von G-Proteinen fehlt, zeigten bereits ihre wichtige Funktion in verschiedenen Organsystemen (Offermanns, 2001). G-Protein-abhängige Signalwege sind Ziel von etwa 30 % aller auf dem Markt befindlichen Medikamente, allerdings werden bisher ausschließlich Agonisten bzw. Antagonisten von GPCRs therapeutisch verwendet (Hauser *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2017). Somit könnte eine selektive pharmakologische Hemmung der Gq-Protein-Familie einen interessanten Ansatzpunkt zur Reduktion der Vasokonstriktion und zur Behandlung von Bluthochdruck darstellen. Durch die allgemeine Hemmung der Gq-Proteine könnte die Vasokonstriktion noch effektiver reduziert werden als durch die Hemmung einzelner GPCRs.

1.4.2 Wirkungen des pan-Gq Inhibitors FR900359

Für eine zielgerichtete Hemmung von Gq-Proteinen als zentrale Mediatoren der Vasokonstriktion bieten sich neue pharmakologische G-Protein-Inhibitoren der Gq-Familie an (Campbell & Smrcka, 2018; Kostenis *et al.*, 2020). Dazu zählen die strukturell ähnlichen

Inhibitoren FR900359 (FR) und YM (Schlegel *et al.*, 2021). YM wurde erstmals im Rahmen der ADP-abhängigen Thrombozytenaggregation als spezifischer Gq-Protein-Inhibitor beschrieben (Takasaki *et al.*, 2004). FR hingegen wurde zwar bereits 1988 aus den Blättern der Pflanze *Ardisia crenata* isoliert (Fujioka *et al.*, 1988), aber erst deutlich später systematisch analysiert (Schrage *et al.*, 2015). Bei genauen Untersuchungen zeigte sich, dass das Depsipeptid FR von dem symbiotischen Bakterium *Candidatus Burkholderia crenata*, welches hauptsächlich in den Knötchen am Rand der Blätter zu finden ist, produziert wird (Crüsemann *et al.*, 2018). Im Rahmen der systematischen Analyse von FR wurde gezeigt, dass FR spezifisch die G α -Proteine G α_q , G α_{11} und G α_{14} inhibiert, wohingegen alle weiteren G-Proteine nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (Patt *et al.*, 2021; Pfeil *et al.*, 2020; Schrage *et al.*, 2015). FR agiert als GEF-Inhibitor und verhindert die Abdissoziation von GDP an der G α -Untereinheit, wodurch die Gq-Proteine nicht in ihren aktiven Zustand überführt werden können. Dabei weist FR ein pseudo-irreversibles Wirkprofil mit Dübel-artiger Bindung an das G α -Protein auf (Kuschak *et al.*, 2020; Schrage *et al.*, 2015). FR wurde bereits *in vitro* und *in vivo* getestet. In verschiedenen Melanomzellen verhinderte FR das Tumor-Signaling und -wachstum (Annala *et al.*, 2019; Lapadula *et al.*, 2019; Onken *et al.*, 2018). Daneben konnten wir in einer aktuellen Studie nachweisen, dass FR eine starke bronchorelaxierende Wirkung aufweist. In *ex vivo* Kontraktionsstudien mit Bronchialringen aus der Maus, dem Schwein und dem Menschen hemmte FR die Bronchokonstriktion durch verschiedene Gq-abhängige Bronchokonstriktoren fast komplett (Matthey *et al.*, 2017). Auch in systemischen Blutgefäßen, wie in der Schwanzarterie der Maus (Schrage *et al.*, 2015) oder in der Aorta der Ratte (Zaima *et al.*, 2013), gibt es Hinweise auf eine relaxierende Wirkung von FR *ex vivo*. In der Maus *in vivo* verhinderte FR einen Anstieg des Atemwegswiderstandes bei Methacholin-Stimulation im gesunden Tier ebenso wie im Ovalbumin-induzierten Asthma-Modell. Da FR dabei als Aerosol lokal in der Lunge appliziert wurde, konnten systemische Nebenwirkungen im Herz-Kreislaufsystem vermieden werden (Matthey *et al.*, 2017). Im Vergleich zu der Substanz YM weist FR eine deutlich langsamere Dissoziationskinetik auf, was mit einer längeren Wirkdauer einhergeht. So wurde in der Maus die Methacholin-induzierte Bronchokonstriktion im Ganzkörperplethysmographen nach einer Einzeldosis FR über 96 Stunden signifikant verringert, während YM nach 48 Stunden bereits keine Effekt mehr zeigte (Schlegel *et al.*, 2021). Zudem wurde der systemische Blutdruck in hypertensiven Mäusen deutlich länger durch FR (18 Stunden) als durch YM (6,3 Stunden) reduziert (Meleka *et al.*, 2019). Die *ex vivo* und *in vivo* Effekte von FR auf das pulmonale Gefäßsystem sind jedoch wissenschaftlich noch nicht erforscht. Dadurch, dass FR zusätzlich sowohl nach lokaler als auch systemischer Gabe in

hohen Konzentrationen in der Lunge vorliegt, weist es optimale Eigenschaften auch für eine Gq-Inhibition in Gefäßen der Lunge auf (Schlegel *et al.*, 2021).

Daher ist die Charakterisierung der Rolle von FR im pulmonalen Gefäßsystem *ex* und *in vivo* sowie die Ermittlung eines potenziellen therapeutischen Effekts bei dem Krankheitsbild der PAH Ziel der vorliegenden Arbeit (Abb. 4).

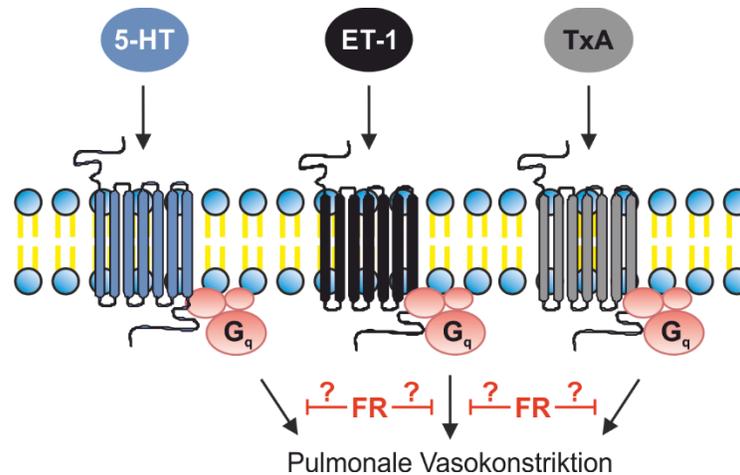


Abb. 4: Potenzielle Wirkung von FR auf die Kontraktion pulmonal-arterieller Muskelzellen. Diverse Rezeptoragonisten, wie Serotonin (5-HT), Endothelin-1 (ET-1) und Thromboxan (TxA) induzieren eine Kontraktion von glatten pulmonal-arteriellen Muskelzellen und damit eine pulmonale Vasokonstriktion typischerweise über Gq-Proteine. Als pan-Gq-Inhibitor hat FR das Potential, die Kontraktion unabhängig von allen aktivierten Rezeptoren zu hemmen und damit mehrere Gq-abhängige Signalwege gleichzeitig zu inhibieren. Hierdurch sollte eine stärkere Vasorelaxation zu induzieren sein als durch einen einzelnen GPCR-Antagonisten.

1.5 Zielsetzung

Der Gefäßtonus von Pulmonalarterien ist das Resultat von konstringierenden und relaxierenden Mediatoren, die unter physiologischen Bedingungen genau aufeinander abgestimmt sind. Pathologische Veränderungen können zu einem Übergewicht der Konstriktoren und damit zur Entstehung einer PAH führen. Auf zellulärer Ebene werden Kontraktionen nach Aktivierung diverser GPCRs vor allem über heterotrimere Gq-Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen ausgelöst. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die potenzielle relaxierende Wirkung des aus der Pflanze *Ardisia crenata* isolierten pan-Gq-Inhibitors FR im pulmonalen Gefäßsystem *ex vivo* analysiert werden. FR wurde in isometrischen Kraftmessungen im Myographen, in funktionellen Lungenschnitten sowie in der isoliert perfundierten Lunge getestet, um seine Wirkung auf spezifische Abschnitte des pulmonalen Gefäßsystems bzw. auf das gesamte Lungengefäßsystem zu charakterisieren. Neben der Kontraktion spielen Wachstumsprozesse der pulmonalen glatten Muskulatur bei der Manifestation der PAH eine Rolle. Daher sollte FR *in vitro* in einem Wachstumsassay von humanen pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen getestet werden. Neben den *in vitro/ex vivo*-Untersuchungen wurde die FR-Wirkung auf den pulmonalen Blutdruck *in vivo* nach einmaliger Gabe durch eine Rechtsherzkathetermessung untersucht. Um einen potenziellen therapeutischen Effekt zu bestimmen, wurde die chronische Applikation von FR zur Prävention während der Entstehung sowie als Therapie nach der Ausbildung einer Hypoxie-induzierten PH im Mausmodell analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und fertige Lösungen

Substanz	Artikelnummer	Hersteller/Lieferant
(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride	P6126	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
1-Bromo-3-chloropropane	B9673	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	H3375	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-Mercaptoethanol 50 mM	31350010	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)
2-Propanol	A0900	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Agarose Low Melt	6351.5	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Aluminiumkaliumsulfat Dodecahydrat (Kalialaun)	102042	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ampuwa [®]	über Apotheke	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
Benzylalkohol	0366	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bosentan	11731	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	C4901	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Chloralhydrat	23100	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
D-Glukose	G7021	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D4540	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	S7907	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Substanz	Artikelnummer	Hersteller/Lieferant
Dulbecco`s Phosphate-buffered saline (DPBS) ohne Calcium und Magnesium	14190-094	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Eindeckmedium auf Polyvinylalkoholbasis (Fluka)	10981	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Endothelin	E77764	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Entellan®	107961	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Eosin G-Lösung, 0,5%, wässrig	X883.2	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Esenserum	017-000-121	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Essigsäure; 100%	1.00063.1011	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, 70%	27668	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
Ethidiumbromidlösung, 1%	46067	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	E4884	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
FR 900359	-	Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie, Universität Bonn
Gelatine (Lungenschnitte)	G1890	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Gelatine (Zellkultur)	G2500	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	G4500	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glyzin	410225	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hämatoxylin	104302	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Heparin-Natrium 5000 I.E./ml	2047217	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Hoechst 33342; 1 mg/ml	B2261	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Substanz	Artikelnummer	Hersteller/Lieferant
Human PDGF-BB	100-14B	PeptoTech(Rocky Hill, USA)
Iloprost	18215	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
Isofluran	über Apotheke	Piramal (Hallbergmoos, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	P9333	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ketamin	799-760	Covetrus (Hamburg, Deutschland)
Ketanserin (+)-tartrate salt	S006	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	M8266	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	M8150	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Mayers Häkalaunlösung	109249	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
MEM Non-Essential Amino Acid Solution	11140035	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)
Methylcellulose	M0512	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	S5586	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	S6297	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	S8045	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumiodat (NaIO ₃)	106525	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)
Natriumnitroferricyanid(II)-dihydrat (SNP)	228710	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
O´GeneRuler™ DNA Ladder	SM0241	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)
Orange G (C.I. 16230)	0318.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Paraffin Typ 3, Typ 6, Typ 9	8335	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)

Substanz	Artikelnummer	Hersteller/Lieferant
Paraformaldehyd (PFA), 4%	252931.1214	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Pertussis Toxin (PTX)	PHZ1174	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)
Roti-Histofix 4%	P087.5	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Serotonin hydrochloride	8367.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sildenafil citrate salt	PZ0006	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
SQ 29,548	19025	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
SU 5416	3037	TOCRIS (Bristol, Vereinigtes Königreich)
Thrombin (human)	13188	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
Tris-Acetat	229-939-6	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TritonX-100	93418	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TRizol®	15596-018	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin/EDTA 0,05% (w/v)	25300-096	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Tween 80	P4780	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
U-46619	16450	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
Xylazin	-	Alvetra (Neumünster, Deutschland)
Xylol	251769.2714	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Y-27632 dihydrochloride	1254	TOCRIS (Bristol, Vereinigtes Königreich)

Substanz	Artikelnummer	Hersteller/Lieferant
Zitronensäure	100244	Merck über VWR (Darmstadt, Deutschland)

2.1.2 Angesetzte Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Carboxymethylcellulose (CMC) Lösungsmittel nach Ciucan <i>et al.</i> , 2011	0.5 % Methylcellulose 0.9 % Natriumchlorid 0.4 % Tween 80 0.9 % Benzylalkohol in destilliertem Wasser
Laufpuffer	50 % Glyzin 2 % Orange G in 1 x TAE-Puffer
Lungenschnitt-Kulturmedium	50 ml DMEM-Medium 1 % Pen/Step 0,07 % 2-Mercaptoethanol 1 % MEM
Physiologische Kochsalz-lösung (PSS)	118 mM NaCl 1,2 mM Na ₂ HPO ₄ 5 mM KCl 1,2 mM MgCl ₂ 1,6 mM CaCl ₂ 24 mM HEPES 10 mM Glucose pH 7,4 in destilliertem Wasser 340 mosm für die IPL

Lösung	Zusammensetzung
PSS mit wenig Kalzium	118 mM NaCl 1,2 mM Na ₂ HPO ₄ 5 mM KCl 1,2 mM MgCl ₂ 0,16 mM CaCl ₂ 24 mM Hepes 10 mM Glucose pH 7,4 in destilliertem Wasser
Serum für Immunhistologie	Esenserum 5 % in PBS
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris-Acetat 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA in destilliertem Wasser

2.1.3 Färbelösungen

Färbelösungen	Zusammensetzung
Eosin	Fertiglösung 0,5 % Filtration
Hämatoxylin	1 g Hämatoxylin 0,2 g NaIO ₃ 50 g Kalialaun 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure in 1000 ml A. dest. Filtration + 10 ml Hämalaunlösung nach Mayer
Höchst-Farbstoff-Lösung	1 mg/ml in PBS

2.1.4 Gase

Alle verwendeten Gase wurden über die Firma Linde Gas Therapeutics GmbH (Oberschleißheim, Deutschland) bezogen:

Sauerstoff (O₂), Stickstoff (N₂), Lachgas (N₂O), Kalibrationsgas für die Hypoxie-Kammern (1% CO₂ + 99 % O₂)

2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
-80 °C Gefrierschrank	Sanyo (Moriguchi, Japan)
Axio Observer	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Aria Pressure-Volumen Conductance System	Millar (Houston, USA)
Ausgießstation Microm EC 350-1	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)
CCD Kamera	PixelInk (Ottawa, Kanada)
Einbettautomat Microm STP-120	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)
Feinwaage XS205	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Fluoreszenzkamera AxioCam 512 mono	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Geldokumentationssystem Intas GEL Stick	Intas (Göttingen, Deutschland)
Gelkammern für Elektrophorese	BioRad (München, Deutschland)
Hamilton Spritze 10 µl	VWR (Langenfeld, Deutschland)
Heizplatte mit Magnetrührfunktion	VWR (Langenfeld, Deutschland)
Hypoxiekammern	BioSpherix (Redfield, USA)
Inkubator Heracell 240	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)
Isoliert perfundierte Lunge IPL-1 Typ 839	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, Deutschland)
Kamera AxioCamMrc5	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Katheter 1.4F	Millar (Houston, USA)
Kühlschränke	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
M3 Stereolupe	Wild Heerbrugg Ltd (Heerbrugg, Schweiz)
Mikroskop AxioStar plus	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop, Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG (Göttingen, Deutschland)

Gerät	Hersteller
MiniVent, Typ 845 Maus-Ventilator	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, Deutschland)
Multi Myograph System 610M	Danish MyoTechnology (Aarhus, Dänemark)
Narkosemittelverdampfer 19.3 (Isofluran)	Dräger (Lübeck, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Objektträger-Strecktisch HI1220	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Operationsmikroskop M651	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Osmometer, Vapro 552	Wescor (Langenfeld, Deutschland)
OxyCycler A84	BioSpherix (Redfield, USA)
Paraffin-Streckbad 1052	GFL (Burgwedel (Deutschland)
pH-Meter 765	Knick (Berlin, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierroboter Corbett Cas-1200	Corbett Life Science, jetzt Qiagen (München, Deutschland)
Powerlab 4/25 oder 16/30	ADInstruments (Spechbach, Deutschland)
Rollerpumpe, Regio Digital	Ismatec (Werthheim-Mondfeld, Deutschland)
Schlittenmikrotom SM2000 R	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Sicherheitswerkbank Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)
Spektrophotometer Nanodrop	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Stereomikroskop Axio Zoom V16	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Stickstofftank	Tec-lab GmbH (Taunusstein, Deutschland)
Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Vernebler Aerogen Pro	Aerogen GmbH (Ratingen, Deutschland)
Vibratom VT 1200S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Vortexer	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Wärmethermostat mit Edelstahlbad, Ecoline 003	Lauda (Essen, Deutschland)
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

2.1.6 Software

Programm	Hersteller
AxioVison 4,8	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Clone Manager 9	Sci-ed Software (Westminster, USA)
CoralDraw 2018	Corel Corporation (München, Deutschland)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Labchart 7	ADInstruments (Spechbach, Deutschland)
Labview	IED (Hamburg, Deutschland)
Microssoft Office 2010	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
NIS-Elements	Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Origin Pro 8	OriginLab (Northampton, USA)
Pulmodyn®W	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, Deutschland)
SigmaPlot 14.0	Systat Software GmbH (Erkrath, Deutschland)
ZEN blue	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)

2.1.7 Kits

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit	PF032	Merck (Darmstadt, Deutschland)
PE Mouse Anti-Ki-67 Set	556027	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
SuperScript VILO	1174-050	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Taq DNA Polymerase, recombinant	10342020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
15 und 50 ml Falcons	VWR (Langenfeld, Deutschland)
5 ml Spritzen	BD Plastikpak (Sandy, USA)
Butterflynadel, Venofix®, 21 G	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser 24x36 mm und 50 mm Ø	Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Immersionsöl ImmersolTM 518F	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Kanüle, 24 G	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Katheter mit Y-Adapter SAF-T-Intima, 20 G	Becton Dickinson (Sandy, USA)
Netz Nylongewebe, Maschenweite 200 µm	Brückmann GmbH (Mönchengladbach, Deutschland)
Objektträger	VWR (Langenfeld, Deutschland)
Omnican® 40, U-40-Insulin, 0,30 x 12 mm G 30	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Perfusor-Leitungen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen (gestopft)	Nerbe plus GmbH (Winsen, Deutschland)
PTFE-Paste	Äronix (Walldorf, Deutschland)
Rasierklagen	Wilkinson (Solingen, Deutschland)
Reaktionsgefäß; 0,2 ml, 0,5 ml	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Reaktionsgefäß; 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Seidenfaden	Gütermann (Gutach-Breisgau, Deutschland)
Tissue-Tek® Mega-Kassetten System	Sakura Finetek Europe B.V. (Alphen am Rhein, Niederlande)
Zellkulturflaschen	VWR (Langenfeld, Deutschland)
Zellkulturplatte; 6 well, 24 well	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Zellkulturschalen	VWR (Langenfeld, Deutschland)

2.1.9 Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
0,1 % Gelatine-Lösung	0,1 g Gelatine in 100 ml DPBS
DMEM	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
Medium 231	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)
Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (DPBS)	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)
Smooth muscle cell growth Supplement	Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland)

2.1.10 Verwendete Zellkulturlinien

Linie	Herkunft
Humane pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen (hPASMC)	Provitro (Berlin, Deutschland)

2.1.11 Primer

Primer	Sequenz	Basenpaarlänge PCR-Produkt
human $G\alpha_q$ for	GGTTTGTGGCTTCGCTGTTC	402
human $G\alpha_q$ rev	TGGCTGCTTGCCTTGGTATG	
human $G\alpha_{11}$ for	CGTGTTGCCTGAGCGATGAG	421
human $G\alpha_{11}$ rev	CAGGAATGCTACGACCGCAG	
human $G\alpha_{14}$ for	GGCGTCTTACTCCAAAGCTC	349
human $G\alpha_{14}$ rev	CTGTCTTCGTCGCTGTAACC	

2.1.12 Antikörper und Lektine

Antikörper	Art	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
anti $G\alpha_q/G\alpha_{11}$	Primärantikörper	1:250	sc-392	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Esel-anti-Kaninchen Cy 5	Sekundärantikörper	1:400	711-175-152	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Wheat germ agglutinin (WGA)	Lektin gekoppelt an Fluorescein	1:1000	FL-1021	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

2.1.13 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit 7-18 Wochen alten weiblichen CD1-Wildtyp-Tieren durchgeführt. Die Tiere wurden entweder über Charles River (Sulzfeld, Deutschland) oder Janvier (Le Genest St Isle, Frankreich) bezogen. Die durchgeführten Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von glatten Muskelzellen aus der Pulmonalarterie

Die humanen Muskelzellen aus der Pulmonalarterie (hPASM) wurden käuflich erworben (Provitro) und bis zur Verwendung in einem mit flüssigem Stickstoff befüllten Tank gelagert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit unter sterilen Bedingungen in Zellkulturinkubatoren. Die Zellen wurden in einem speziellen Muskelzellmedium kultiviert, welches nach Herstellerangaben mit zusätzlichen Wachstumsfaktoren versetzt wurde (s. 2.1.9). Das Medium und alle weiteren verwendeten Zusätze wurden vor Benutzung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Auftauen der Zellen erfolgte ebenfalls bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen schnellstmöglich in geeignete mit Medium befüllte 75 cm² Zellkulturflaschen überführt. Am nachfolgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Für die Dauer der Kultivierung wurde anschließend das Medium alle 2-3 Tage getauscht.

2.2.1.1 Passagieren

Nach Erreichen einer Konfluenz von 95 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie mit DPBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten (min) in 3 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in 9 ml Medium abgespült und in ein 15 ml Falcon überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit einer relativen Zentrifugalgeschwindigkeit (rcf) von 1000 zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Zur weiteren Verwendung wurden die Zellen je nach Bedarf mit 100.000 – 500.000 Zellen in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Für die durchgeführten Zellversuche wurden die Zellen auf 6-Well Zellkulturplatten, für immunhistochemische Färbungen auf Glasplättchen, die mit 0.1 % Gelatine beschichtet waren, in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät.

2.2.2 Wachstumsversuch

Der Wachstumsversuch wurde mit hPASCs durchgeführt. Dazu wurden an Tag (d)1 20.000 Zellen pro 6-Well ausplattiert. An d2, 3 und 4 wurde das Wachstum mit 20 ng/ml PDGF und 1 Unit (U)/ml Thrombin stimuliert. Des Weiteren wurden zeitgleich in verschiedenen Ansätzen folgende Testsubstanzen zugegeben: DMSO (Lösungsmittelkontrolle), der pan-Gq-Inhibitor FR, der Endothelin (ET-1)-Rezeptor Antagonist Bosentan, das Prostazyklin-Analog Iloprost oder der Phosphodiesterase (PDE)-Hemmer Sildenafil. Die finale Konzentration der Testsubstanzen im Well lag bei 10^{-6} M. Zusätzlich wurde der Versuch mit unbehandelten Zellen durchgeführt. Das Medium mit den genannten Substanzen wurde täglich gewechselt. An d5 wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, mit 500 μ l Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend in 1,5 ml Medium aufgenommen. Dabei wurden immer die Zellen aus zwei Wells mit gleicher Kondition gepoolt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 5 min bei RT mit 1000 rcf zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer (Abb. 5).

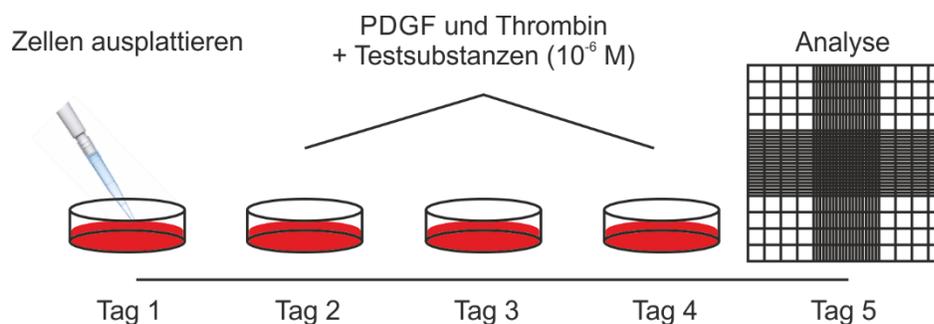


Abb. 5: Experimenteller Ablauf des Wachstumsversuches. An d1 wurden 20.000 Zellen pro 6-Well wurden ausplattiert. Das Wachstum wurde mit PDGF und Thrombin plus den jeweiligen Testsubstanzen stimuliert. Die Analyse erfolgte an d5 durch Zählung der Zellzahl in einer Neubauer Kammer.

2.2.3 Apoptose-Assay

Neben der Bestimmung der Zellzahl (s. 2.2.2) wurde an d5 zeitgleich die Menge an apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurde das Annexin V-FITC Kit (Calbiochem) verwendet. Das Kit wurde nach Anleitung des Herstellers verwendet. Pro Kondition wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Positivkontrolle bzw. zur Induktion von Apoptose wurden unbehandelte Zellen fünf Stunden mit 2 mM H_2O_2 inkubiert.

2.2.4 Ki-67 Proliferations-Assay

Neben der Bestimmung der Zellzahl (siehe 2.2.2) und der Apoptose (s. 2.2.3) wurde an d5 zusätzlich die Menge an Ki-67-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurde das PE Mouse Anti-Ki-67 Set (BD Pharmingen) verwendet. Die Messung wurde nach Herstellerangaben jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Die RNA-Isolation erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1000 rcf). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 – 1000 µl TRIzol®-Reagenz aufgenommen. Anschließend wurden die Proben 5 min bei RT inkubiert, bevor jeweils 100 µl 1-Bromo-3-chloropropane/ml TRIzol® zugegeben wurden. Zur Durchmischung wurden die Proben 30 Sekunden (sek) geschüttelt, gefolgt von einer dreiminütigen Inkubation bei RT. Zur Auftrennung von Proteinen, DNA und RNA in verschiedene Phasen wurden die Proben 15 min bei 11800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Während die Proteine in der phenolhaltigen untersten Phase gelöst sind und die DNA in der Interphase, befindet sich die RNA in der wässrigen klaren oberen Phase, welche zur weiteren Verarbeitung in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach Zugabe von 500 µl 2-Propanol/ml TRIzol®, und Resuspension wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min mit 11800 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend dreimal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die RNA wieder pelletiert (Zentrifuge 13000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde bei RT getrocknet, bevor es in 20 µl RNase freiem Wasser aufgenommen wurde. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde mittels eines Nanodrop Spektrophotometers bestimmt.

2.3.2 Reverse Transkription

Das SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) wurde zur reversen Transkription der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) verwendet. Die Durchführung richtete sich nach den Herstellerangaben.

Ansatz:

4 µl Reaktionsmix (5x)

2 µl Enzymmix (10x)

1 µg RNA
add 20 µl Ampuwa-Wasser

Der Reaktionsansatz wurde gevortext und anschließend kurz anzentrifugiert. Zum Umschreiben von RNA in cDNA wurde folgendes PCR-Programm gewählt.

Programm:

10 min	25 °C
60 min	42 °C
5 min	85 °C
∞	4 °C

Die cDNA wurde entweder sofort verwendet, kurzfristig bei 4 °C oder langfristig bei -20 °C gelagert.

2.3.3 PCR

Zur Bestimmung der Genexpression wurden die unter 2.1.11 aufgeführten Primer verwendet. Für die PCR wurde ein *Taq* DNA-Polymerase-Kit verwendet und folgender Ansatz pipettiert.

Ansatz:

100 ng cDNA
2 µl 10x Puffer
1,6 µl dNTPs 2,5 mM
0,6 µl MgCl₂ 50 mM
0,4 µl *Taq*-Polymerase
1 µl Primer forward 10µM
1 µl Primer reverse 10µM
add 20 µl H₂O

Anschließend wurde die PCR mit nachstehendem Programm gestartet. Insgesamt wurden 30 Zyklen durchgeführt.

Programm:

5 min	95 °C	} 30 Zyklen
45 sek	95 °C	
45 sek	Annealing-Temperatur (variabel)	
45 sek	72 °C	
3 min	72 °C	
∞	4 °C	

Die Annealing-Temperatur wurde an die jeweiligen Primer angepasst.

Primer-Paar	Annealing-Temperatur
human G α_q	52 °C
human G α_{11}	58 °C
human G α_{14}	56 °C

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung der PCR-Ergebnisse (s. 2.3.3) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit einem 1,5 % Agarose-Gel durchgeführt. Dazu wurden 0,75 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer erhitzt. Nachdem die Agarose vollständig aufgelöst war, wurden 2 Tropfen einer 1 %igen Ethidiumbromid-Lösung zugegeben, geschwenkt und anschließend wurde das Gel in BioRad-Gelkammern gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurde es mit TAE-Puffer übergossen und 20 μ l Probe mit jeweils 4 μ l 6x Laufpuffer aufgetragen. Als Größenstandard dienten 5 μ l des O´GeneRuler™ DNA Ladder-Mixes. Die Auftrennung erfolgte bei 90 Volt (V) für ca. 35 min.

2.4 Immunhistochemische Methoden

2.4.1 Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)

Um immunhistochemische Färbungen durchzuführen, mussten die auf Gelatine-beschichteten Deckgläsern gewachsenen glatten pulmonal-arteriellen Muskelzellen zunächst mit PFA fixiert werden (s. 2.2.1). Dazu wurden die Zellen einmal mit DPBS gewaschen und anschließend mit einer 4 % PFA-Lösung für 20 min bei RT fixiert. Das PFA wurde abgesaugt und in speziellen Behältnissen entsorgt und die fixierten Zellen bis zur Färbung mit DPBS überschichtet und bei 4 °C gelagert.

2.4.2 Immunhistochemische Färbung von fixierten Zellen

Die fixierten Zellen wurden 10 min mit 0,2 % TritonX-100 in DPBS permeabilisiert, anschließend wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 5 % Eselserum (Spezies des sekundären Antikörpers) in DPBS für eine minimale Zeitdauer von 20 min blockiert. Der Primär-Antikörper wurde 1:250 in 5 % Esel-Serum verdünnt und mit den Zellen 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und mit dem Fluorophor-konjugierten sekundären Antikörper (in 1 μ g/ml Hoechst 33342 in DPBS) für eine Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Antikörperfärbungen wurden in einer feuchten

Kammer durchgeführt, um einer Austrocknung der Zellen entgegenzuwirken. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit einem Polyvinylalkohol-basierten Medium eingedeckt., und 24 h bei RT im Dunkeln getrocknet. Die Lagerung der gefärbten Präparate erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

2.4.3 Mikroskopie

Je nach Anforderung wurden verschiedene Mikroskope für die Bilddokumentation verwendet. Für die immunhistochemischen Färbungen (s. 2.4.2, 2.5.13) wurden ein Zeiss Observer Z1 mit Apotom, einer XBO 75 Fluoreszenzlampe und eine AxioCam 512 mono Kamera sowie die Zen Blue Software von Zeiss verwendet. Die HE-Färbungen (s. 2.5.12) wurden mit dem Axiostar plus von Zeiss mit einer AxioCam Mrc5 aufgenommen.

2.5 Tierexperimentelle Methoden und Auswerteverfahren

2.5.1 Isometrische Kraftmessungen mittels Myograph in der Maus

Ein Draht-Myograph kann die Änderungen von Kraftentwicklungen detektieren und eignet sich besonders zur pharmakologischen Charakterisierung von Kontraktionsmechanismen isolierter Gefäßsegmente. Die Gefäße werden zunächst vorgespannt, wodurch isometrische Kraftmessungen durchgeführt werden können. Diese zeichnen sich durch eine Spannungsänderung der glatten Muskulatur ohne Verringerung des Durchmessers der Gefäße aus.

2.5.1.1 Präparation

Die verwendeten CD1-Wildtyp (wt) Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, in Rückenlage gebracht und mittels Nadeln fixiert. Zur Desinfektion wurden die Mäuse mit 70 %igen Ethanol besprüht. Anschließend wurde das Fell mit einem paramedianen Schnitt vom Abdomen bis zum Hals geöffnet, seitlich weggeklappt, und der Brustkorb wurde medial geöffnet. Nach Freipräparation der Trachea vom umgebenden Gewebe, konnte das Herz-Lungen-Paket vollständig und ohne größere Zugkräfte von der Thoraxwand gelöst und aus der Maus entnommen werden. Das Herz-Lungen-Paket wurde direkt in eine 4 °C kalte physiologische Salzlösung (PSS) mit geringem Kalziumgehalt überführt, um spontane Kontraktionen der Gefäße während der Präparation zu verhindern. Die nachfolgende Feinpräparation erfolge ebenfalls in dieser Lösung bei 6,4-facher Vergrößerung unter Zuhilfenahme einer Wild M3 Stereolupe (Heerbrugg, Schweiz). Dazu wurden zunächst der

Thymus und das darunterliegende Binde- und Fettgewebe sowie die Herzvorhöfe entfernt. Anschließend wurde der rechte und linke Hauptstamm der Pulmonalarterien freipräpariert und segmentiert. Die entstehenden Gefäßringe wurden mittels eines Messokulares auf eine Länge von 2 Millimetern (mm) zugeschnitten und bis zur Einspannung in den Myographen in kalter PSS-Lösung mit wenig Kalzium gelagert.

2.5.1.2 Einspannen von Gefäßringen und Äquilibration

Mit Hilfe des Multi Myograph Systems 610M von Danish MyoTechnology (Aarhus, Dänemark) können parallel 4 Gefäßringe gemessen werden. Dazu wurden in die Organbäder PSS mit wenig Kalzium gefüllt und danach nacheinander alle Gefäßringe mittels Drähte in die Versuchskammern zwischen die zwei Trägerbacken eingespannt (Abb. 6). Der verwendete 40 Mikrometer (μm) dicke Draht wurde auf ca. 2,2 cm Länge zugeschnitten und zunächst an der unteren linken Schraube befestigt. Das Gefäßsegment wurde über den Draht gezogen und dieser anschließend an der linken oberen Schraube befestigt. Der zweite Draht wurde durch das Gefäß geschoben und an den gegenüberliegenden rechten Schrauben befestigt. Nachdem alle Gefäßsegmente eingespannt waren, wurde die PSS-Lösung mit wenig Kalzium gegen die normale PSS-Lösung ausgetauscht und die Versuchskammern auf 37 °C erhitzt sowie an die Sauerstoffzufuhr angeschlossen. Die Gefäßringe wurde auf 5 Millinewton (mN) vorgespannt, um eine optimale Kraftentwicklung zu gewährleisten (Knapp *et al.*, 2006). Dazu wurden die Trägerbacken alle 2 min schrittweise weiter voneinander entfernt, bis eine Vorspannung von 5 mN erreicht wurde. Die Änderung der Kraft wurde über den Kraftumwandler gemessen. Im Anschluss folgte eine 20-minütige Ruhe- bzw. Äquilibrationsphase.

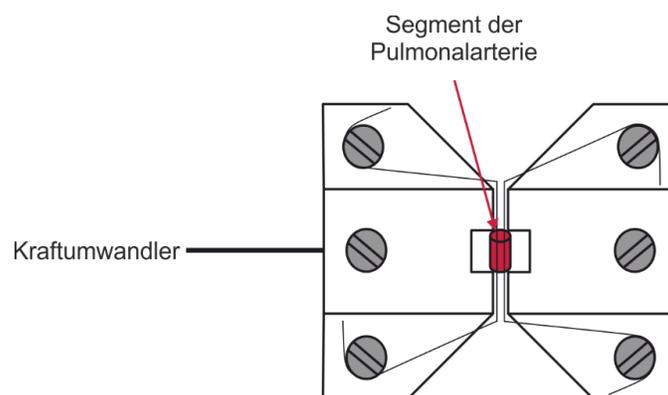


Abb. 6: Position der Pulmonalarterien nach Einspannung in den Myographen. Die 2 mm langen Gefäßringe wurden mittels Drähte zwischen den Trägerbacken aufgespannt.

2.5.1.3 Versuchsablauf

Nach erfolgter Äquilibration wurde der Versuch mit einer maximalen Kontraktion der Gefäße durch Applikation von 10^{-5} M Phenylephrin (Phe) gestartet. Nach maximaler Kraftentwicklung wurde das Phe durch mehrmaliges Wechseln der umgebenden PSS-Lösung ausgewaschen, bis das Ausgangsniveau der Kraft wieder erreicht wurde. Anschließend wurde der Versuch je nach Fragestellung fortgeführt. Dazu wurden verschiedene Agonisten oder Antagonisten nacheinander in unterschiedlicher Reihenfolge als Einfachdosis (Agonisten bei submaximaler Kontraktion: 75 % der maximal ausgelösten Kontraktion (EC_{75})) oder in ansteigenden Dosen (Dosis-Wirkungs-Kurve, DWK) hinzugegeben und die isometrische Kraftentwicklung gemessen. Ausgewertet wurde jeweils die Kraft-Differenz zwischen max. Kontraktion und Basisniveau. Die Substanzen sind nachfolgend aufgeführt.

Substanzen	Konzentrationen DWK (M)	Konzentration Einfachdosis (M)
Phe	/	10^{-5}
Serotonin (5-HT)	$10^{-9} - 10^{-5}$	5×10^{-7}
Endothelin (ET-1)	$10^{-12} - 10^{-7}$	3×10^{-9}
U-46619	$10^{-10} - 10^{-5}$	10^{-7}
FR	$10^{-9} - 10^{-5}$	10^{-6}
Y-27632	/	10^{-5}
Bosentan	$10^{-9} - 10^{-5}$	10^{-6}
SQ	$10^{-9} - 10^{-5}$	10^{-6}
Ketanserin	$10^{-9} - 10^{-5}$	10^{-6}
Sildenafil	$10^{-9} - 10^{-5}$	/
Iloprost	$10^{-9} - 10^{-5}$	/
PTX	1 μ g/ml PTX in PSS (Wenzel <i>et al.</i> , 2006) Inkubation der PAs für 12 h	

2.5.2 Funktionelle Lungenschnitte

Während mit den isometrischen Kraftmessungen am Myographen ausschließlich die großen Pulmonalarterien der Maus vermessen werden können, wurden Lungenschnitte angefertigt, um die Tonusregulation kleinerer intrapulmonaler Gefäße der Lunge zu untersuchen. Dabei

wurde die Veränderung der Lumenfläche der Arterien während der Gabe von Agonisten und Antagonisten über die Zeit aufgezeichnet und ausgewertet.

2.5.2.1 Präparation

Zur Herstellung von Lungenschnitten wurde vorab 8 % Agarose in Aqua dest. durch Erhitzen aufgelöst und anschließend mit 2x PBS 1:1 verdünnt. Des Weiteren wurde durch Erhitzen eine 6 %ige Gelatine-Lösung in PBS hergestellt, in welche 150 µl 2,5 N Natriumhydroxid (NaOH) zugegeben wurden. Beide Lösungen wurden im Wasserbad warm und flüssig gehalten.

Die verwendeten CD1 wt-Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, in Rückenlage gebracht und mit Nadeln fixiert. Die Haut wurde durch einen paramedianen Schnitt vom Abdomen bis zum Kinn geöffnet und seitlich weggeklappt. Die Trachea wurde durch das Entfernen des umliegenden Gewebes freigelegt. Der Brustkorb wurde unterhalb der Rippen geöffnet und eine longitudinale Sternotomie durchgeführt. Anschließend wurde die Trachea punktuell eröffnet. Durch die Kanülierung der Trachea mit einem Katheter mit Y-Adapter konnte zunächst 1,5 ml Agarose durch die eine Öffnung und anschließend 0,5 ml Luft durch die zweite Öffnung des Adapters in die Lunge appliziert werden. Die Lunge sollte sich dadurch aufblähen und die Agarose wird durch die drückende Luft bis in die Alveolen vorgeschoben. Die Atemwege sollten somit Agarose-frei sein. Die Lungengefäße wurden über den rechten Ventrikel mit 0,3 ml der 6 %igen Gelatine-Lösung perfundiert. Danach wurden die Lungen mit kaltem PBS übergossen, die Maus mit Eis bedeckt und für 15 min bei 4 °C in den Kühlschrank transferiert. Das Vorgehen ermöglichte eine schnelle Überführung der Agarose und Gelatine in ihre festen Zustände. Im Anschluss wurde das Herz-Lungen-Paket entnommen, die einzelnen Lungenflügel voneinander getrennt und in kaltem PBS auf Eis gelagert. Das Herz wurde verworfen.

Mittels Vibratom wurden 200 µm Lungenschnitte angefertigt. Dazu wurden die Lungenflügel orthogonal zu den Bronchien und Gefäßen mit Sekundenkleber aufgeklebt und weiches Randgewebe mit einer Schere weggeschnitten. Die Schnittgeschwindigkeit wurde auf bis zu 0,2 mm/sek eingestellt. Die Schnitte wurden danach in das Lungenschnitt-Medium (s. 2.1.2) überführt und ü.N. im Brutschrank kultiviert. Durch die vorherrschenden 37 °C löste sich die Gelatine in den Gefäßen auf.

2.5.2.2 Versuchsablauf

Zunächst wurde der Lungenschnitt auf einem runden Deckglas befestigt. Dazu wurden zwei Linien mit Polytetrafluorethylen (PTFE)-Paste aufgetragen, einige Tropfen PBS mittig der

Linien appliziert, und der Lungenschnitt wurde in den Tropfen platziert. Der Schnitt wurde dann mit einem rechteckigen Nylonnetz mit mittigem Loch fixiert. Die ganze Konstruktion wurde anschließend mit einem rechteckigen Deckglas stabilisiert, wobei die PTFE-Paste einen ausreichenden Abstand zwischen den Deckgläsern sicherstellte (Abb. 7).



Abb. 7: Perfusionskammer mit Lungenschnitt während der Messung. Der Lungenschnitt wurde unter einem Nylonnetz zwischen zwei Deckgläsern fixiert. Durch eine kontinuierliche Perfusion konnten verschiedene vasoaktive Substanzen appliziert werden.

Die Messung wurde bei 10-facher Vergrößerung durchgeführt und die am Phasenkontrastmikroskop angeschlossene CCD-Kamera nahm sekundlich ein Bild auf. Die Schnitte wurden dabei zunächst mit PBS perfundiert. Für eine maximale Kontraktion wurde mit 10^{-6} M 5-HT perfundiert. Nach dem Auswaschen erfolgte eine submaximale Kontraktion mit 10^{-7} M 5-HT. Um eine relaxierende Wirkung von FR zu untersuchen, wurde danach mit 10^{-7} M 5-HT + 10^{-6} M FR perfundiert. Mit der verwendeten Labview Software konnte, ausgehend von der Veränderung der Pixelanzahl im Lumen der Gefäße, die Kontraktions- bzw. Relaxationsstärke berechnet werden. Ausgewertet wurde jeweils die Differenz zwischen Basisniveau und Kontraktion nach Erreichen eines Plateaus. Die exemplarisch dargestellten Spuren wurden mittels des Programms OriginPro 8 geglättet (gleitender Durchschnitt: 5 Punkte).

2.5.3 Isoliert perfundierte Lunge (IPL)

Die isoliert perfundierte Lunge vom Typ IPL-1 ist ein *ex vivo* Lungenperfusions- und Ventilationssystem, welches speziell für die Untersuchung von Mauslungen entwickelt wurde (Bethmann *et al.*, 1998). Das System ermöglicht eine negative oder positive Druckbeatmung sowie die Untersuchung respiratorischer als auch hämodynamischer Parameter. In den hier dargestellten Versuchen stand die gesamtheitliche Untersuchung des pulmonal-arteriellen

Drucks (PAP) in der Lunge im Mittelpunkt. Darin sind sowohl die großen als auch die kleinen pulmonalen Gefäße eingeschlossen. Für die Messung wird ein künstlicher Perfusionskreislauf über zwei Kanülen angelegt, welcher eine Perfusion über die Pulmonalarterie (PA) sowie das komplette Gefäßsystem ermöglicht und im linken Ventrikel endet (Abb. 8).

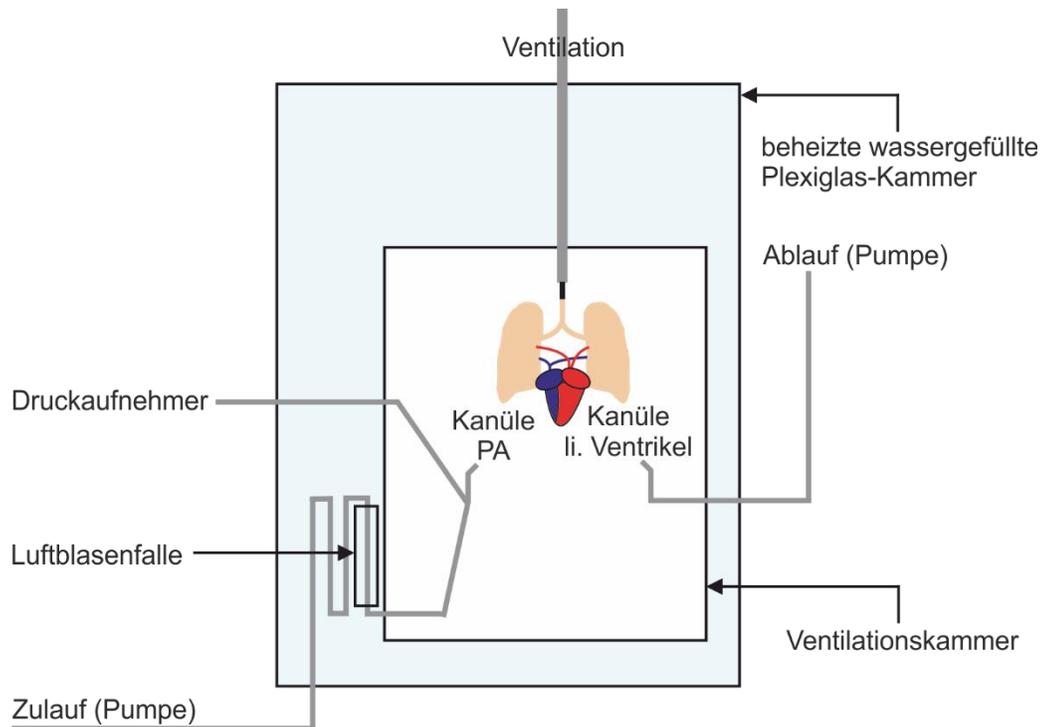


Abb. 8: Vereinfachter schematischer Aufbau der IPL-Apparatur. Die Perfusionsgeschwindigkeit wird konstant auf 1 ml/min gehalten. Bei der Kontraktion der pulmonalen Gefäße kommt es durch einen Rückstau der Perfusionsflüssigkeit zu einem erhöhten Druck am Druckaufnehmer. Dieser gibt das Signal weiter, welches als Mess-Spur des pulmonal-arteriellen Drucks (PAP) mit der Maßeinheit cmH₂O ausgegeben wird.

Durch das Anlegen eines konstanten Perfusionsflusses von 1 ml/min baut sich ein stabiler Baseline-Druck auf. Durch Applikation von vasokonstringierenden Substanzen ziehen sich die Gefäße zusammen. Dies führt bei gleichbleibendem Perfusionsfluss durch einen Rückstau der Perfusionsflüssigkeit zu einem erhöhten Druck am Druckaufnehmer, welcher detektiert und über die Pulmodyn-Software aufgezeichnet wird. Das Signal wird letztlich als Messkurve des pulmonal-arteriellen Drucks in cmH₂O ausgegeben.

2.5.3.1 Präparation

CD1 wt-Mäuse wurden nach Kalibration der IPL durch zervikale Dislokation getötet. Nach Desinfektion mit 70 % Ethanol wurde die Präparation in der Versuchskammer durchgeführt. Die Haut wurde durch einen paramedianen Schnitt vom Abdomen bis zum Kinn geöffnet und

seitlich weggeklappt. Nach dem Entfernen des umliegenden Bindegewebes wurde die Trachea mit einem Seidenfaden untertunnelt. Anschließend wurde die Trachea punktuell geöffnet, an die Beatmungskanüle angeschlossen und mittels des Seidenfadens fixiert, um eine Beatmung der Lunge schnellstmöglich wiederherzustellen (80 Atemzüge/min, 300 µl Atemzugvolumen). Die Präparation wurde immer unter positiver Druckbeatmung durchgeführt, um ein Kollabieren der Lungen zu vermeiden. Der Brustkorb wurde unterhalb der Rippen geöffnet. Im Anschluss wurde das Diaphragma durchtrennt. Eine Injektion von 5 Internationalen Einheiten (I.E.) Heparin in den rechten Ventrikel verhinderte eine Aggregation des Blutes im Lungengefäßsystem. Anschließend wurde die Maus über die Vena cava inferior entblutet. Der Thorax wurde durch eine longitudinale Sternotomie geöffnet, seitlich fixiert und der Unterleib abgetrennt. Nach stumpfer Freipräparation wurde die PA mit einem Seidenfaden untertunnelt. Ein Einschnitt in den rechten Ventrikel ermöglichte das Einführen der Perfusionskanüle in die PA. Mittels des Seidenfadens wurde die Perfusionskanüle örtlich fixiert. Anschließend wurde der linke Ventrikel geöffnet und die andere Perfusionskanüle (Absaugung) in den linken Ventrikel eingeführt. Danach folgte ein Perfusionstest mit 0,2 ml PSS pro min. Bei erfolgreicher Perfusion wurde die Perfusionsgeschwindigkeit auf 1 ml/min erhöht. Es folgte eine Ruhephase von ca. 5-8 min bis der pulmonal-arterielle Druck ein konstantes Level erreicht hatte. Die Ruhephase erfolgte je nach Versuch bereits unter negativer oder positiver Druckbeatmung.

2.5.3.2 Negative Druckbeatmung

Durch das Anlegen einer negativen Druckbeatmung wird der physiologische Zustand bestmöglich nachgebildet. Dazu wird die Versuchskammer mit einem Deckel geschlossen und durch Umleitung der zugeführten Luft über eine Venturi-Drüse an die Umgebung eine Unterdruckbeatmung in der Kammer hergestellt. Zunächst wurden die Lungengefäße mit 10^{-5} M 5-HT durch Wechsel der Perfusionslösung maximal vorkontrahiert. Nach Erreichen eines Plateaus wurde die Lunge mit PSS perfundiert, um das 5-HT auszuwaschen und die basalen Druckwerte wiederherzustellen. Um eine submaximale Kontraktion zu induzieren, wurde das Gefäßsystem der Lunge mit 10^{-6} M 5-HT perfundiert. Nach Erreichen des Plateaus wurde die relaxierende Wirkung von FR getestet, indem eine Perfusionslösung verwendet wurde, welche zusätzlich FR enthielt (PSS + FR 10^{-6} M bzw. Lösungsmittel + 10^{-6} M 5-HT).

2.5.3.3 Positive Druckbeatmung

Die Untersuchung des Einflusses von FR auf die akute hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) wurde bei einer positiven Druckbeatmung, also bei geöffneter Versuchskammer, vorgenommen. Bei der hypoxischen Vasokonstriktion handelt es sich um einen wichtigen

physiologischen Mechanismus, der durch Kontraktion der Gefäße unter Hypoxie-Bedingungen ein optimales Ventilation-/ Perfusions-Verhältnis ermöglicht (Euler-Liljestrand-Reflex). In diesem Versuchsteil wurde ebenfalls mit 5-HT maximal vorkontrahiert. Nach dem Auswaschen wurde 5 min mit FR 10^{-6} M bzw. mit der entsprechenden DMSO-Lösungsmittelkontrolle perfundiert. Im Anschluss wurde die HPV durch Ventilation von 100 % Stickstoff ausgelöst und die Druckamplitude bestimmt. Nach Erreichen eines Plateaus wurde die Kontraktion durch Umstellung auf Raumlufbeatmung revertiert.

2.5.3.4 Auswertung

Zur Auswertung wurde mit dem Programm PULMODYN gearbeitet. Dazu wurde der Mittelwert des pulmonal-arteriellen Drucks jeweils in einer Zeitpanne von 30 sek kurz vor als auch nach Erreichen des Plateaus der Kontraktionen gebildet. Nach Applikation von relaxierenden Substanzen wurde ebenso verfahren. Analysiert wurde jeweils die Differenz zwischen Kontraktion und Basisniveau, also die Druckamplitude.

2.5.4 Akute Applikation von vasoaktiven Substanzen

2.5.4.1 I.v. Applikation von 5-HT nach intratrachealer Applikation

Die intratracheale (i.t.) Applikation erfolgte nach kurzer Narkose mit 5 % Isofluran in einem Plexiglasgefäß. Als Tubus wurde eine 22G Venenverweilkanüle verwendet. Die erfolgreiche Intubation wurde durch den Anschluss der Kanüle an einen MiniVent Ventilator überprüft. Dabei wurde der Atemluft 1 % Isofluran beigemischt (100 % O₂), sodass die Narkose aufrechterhalten wurde. Zur Applikation pharmakologischer Substanzen wurde die Maus kurzzeitig von dem Ventilator getrennt und 50 µl Lösung (FR: 2,5 µg (50 µM), Sildenafil: 3 µg (100 µM) in 0,9 % NaCl, 0,5 % DMSO) wurde mit Hilfe einer Pipette in den Tubus appliziert. Anschließend wurde die Maus für weitere 30 sek an den Ventilator angeschlossen. Danach wurde der Tubus entfernt und die Maus erwachte. Als Analysemethode wurde eine Stunde nach i.t.-Applikation ein Rechtsherzkatheter gelegt (s. 2.5.7). Nach Messung des basal vorliegenden rechtsventrikulären (RV) Drucks wurde über die linke Vena jugularis mittels einer Hamilton-Spritze und selbstgebaute Applikationshilfe 10 µl 5×10^{-3} M 5-HT intravenöse (i.v.) appliziert. Dadurch konnte eine Wirkung der i.t. verabreichten Substanzen auf die Kontraktion durch 5-HT untersucht werden. Der Messzeitpunkt zur Analyse des Drucks nach wurde auf 2 min nach i.v. Applikation festgelegt (Abb. 9). Der Versuch wurde sowohl in normoxischen Mäusen als auch in Mäusen, welche 3 Wochen bei 10 % O₂ gehalten wurden und dadurch eine Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie entwickelt haben, durchgeführt (s. 2.5.6).

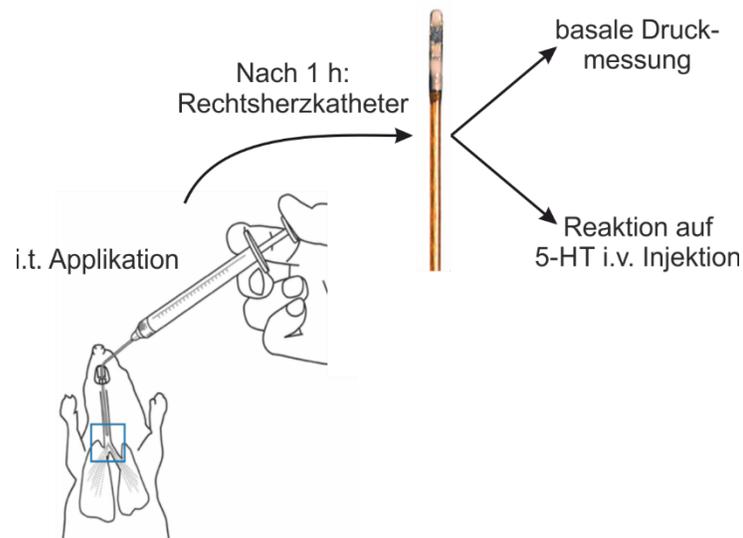


Abb. 9: Ablauf der Messung nach i.t. Applikation. Eine Stunde nach intratrachealer (i.t.) Applikation wurde ein Rechtsherzkatheter gelegt, die basale Druckkurve aufgenommen und die Reaktion auf eine intravenöse (i.v.) Injektion von Serotonin (5-HT) gemessen.

2.5.5 Chronische Applikation von FR

FR wurde entweder über die i.t. oder über die intraperitoneale (i.p.) Route appliziert. Bei der i.t. Applikation wurden über drei Wochen zweimal täglich 2,5 µg (50 µM) FR in 50 µl (0,9 % NaCl, 0,5 % DMSO) appliziert, um die Entstehung der Hypoxie-induzierten PH zu verhindern. Zwischen den Applikationen wurde eine Pause von 12 h eingehalten. Diese Versuchsanordnung wurde nur unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt (2.5.6). Bei der i.p. Applikation wurden 10 µg FR in 100 µl von Montag bis Freitag verabreicht (in 0,9 % NaCl, 1 % DMSO). Das Protokoll richtete sich nach Annala *et al.*, 2019. Es wurde sowohl Versuche unter hypoxischen Bedingungen zur Verhinderung der Hypoxie-induzierten PH als auch unter normoxischen Bedingungen zur Überprüfung der Auswirkungen auf gesunde Tiere durchgeführt. Zur Überprüfung des therapeutischen Nutzens von FR wurde FR über die i.p. Route nur in den letzten zwei Wochen bei fünfwöchiger Platzierung der Mäuse unter hypoxischen Bedingungen appliziert. Eine Applikation von FR am Analysetag erfolgte nicht. Die Analyse erfolgte mittels Rechts- und Linksherzkatheter (s. 2.5.7) nach präventiver Gabe von FR an d21/22 und nach therapeutischer Gabe an d35/36. Anschließend wurden Herzen und Lungen für histologische Untersuchungen (s. 2.5.11) entnommen. Der Kontrollgruppe wurde die jeweils applizierte DMSO-Konzentration in 0,9 % NaCl verabreicht.

2.5.6 Chronische Hypoxie

Die Mäuse wurden für 3 Wochen unter hypoxischen Bedingungen von 10 % O₂ in speziellen Hypoxie-Kammern gehalten. Dabei war unbegrenzter Zugang zu Futter und Wasser gegeben. Der Sauerstoffgehalt wurde durch die OxyCycler Steuerungseinheit kontinuierlich gemessen, aufgezeichnet und bei Abweichungen durch Zuleitung von Stickstoff reduziert. Zur Untersuchung der Hypoxie-induzierten Rechtsherzhypertrophie wurde wöchentlich Sugan5416 (0,6 mg/Maus in CMC, 30 % Prozent DMSO) subkutan (s.c.) gespritzt (Ciucan *et al.*, 2011).

2.5.7 Rechtsherz- und Linksherz-Druckkatheter Messung in der Maus

2.5.7.1 Präparation

Die Analgesie-Einleitung erfolgte mit 5% Isofluran in einer Plexiglaskammer gefolgt von einer i.p.-Injektion von Ketamin (50 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg). Zur Aufrechterhaltung der Narkose während der Präparation und Katheter-Messung wurde den Mäusen 1-1,5 % Isofluran (100 % O₂) mittels einer Atemmaske zugeführt. Zunächst wurde die Haut am Hals paramedian eröffnet und seitlich weggeklappt. Die zweiteilige Speicheldrüse der Maus wurde vorsichtig auseinandergezogen und ebenfalls seitlich fixiert. Anschließend erfolgte die stumpfe Feinpräparation der Vena jugularis oder der Arteria carotis. Nach Entfernung des umgebenden Bindegewebes wurden die Gefäße untertunnelt und zwei Ligaturen angelegt. Die kraniale Ligatur wurde mittels eines Knotens dauerhaft verschlossen, die kaudale Ligatur wurde mittels eines Nadelhalters reversibel zugezogen. Zur Einführung des Katheters wurde das jeweilige Gefäß mit Hilfe einer kleinen Schere perforiert (Abb. 10).

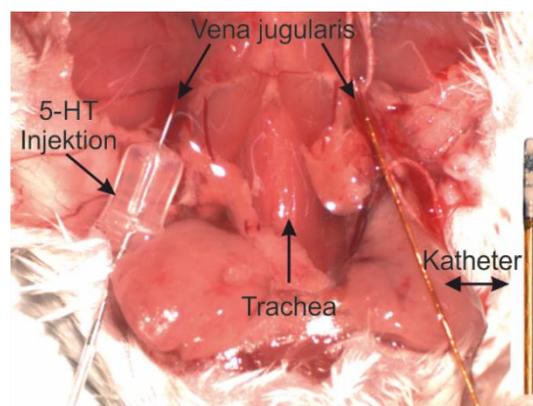


Abb. 10: Operationsbild der Halsregion einer Maus mit liegendem Rechtsherzkatheter und Injektionsnadel. In der rechten Vena jugularis liegt der Druck-Katheter. Die zwei Ligaturen kranial und kaudal verhindern ungewollten Blutverlust. Auf der linken Seite ist die Injektionsnadel zur Applikation von Serotonin (5-HT) in die linke Vena jugularis eingeführt. Die Arteria carotis verläuft lateral zur Trachea und ist hier verdeckt.

2.5.7.2 Druck-Messung

Für die Messung wurde ein 1 French (F) Millar Druck-Katheter sowie das Aria-System von Millar verwendet. Der Katheter wurde entweder über die rechte Vena jugularis in den rechten Ventrikel zur Messung des RV-Drucks oder über die rechte Arteria carotis in den linken Ventrikel zur Messung des linksventrikulären Drucks vorgeschoben. Durch leichte Korrektur der Katheterposition wurde die optimale Lage des Katheters zur Druckaufnahme ermittelt. Die Aufnahme des Drucks erfolgte über mehrere Minuten nachdem sich ein stabiles, gleichbleibendes Signal eingestellt hatte.

2.5.7.3 Auswertung

Die Auswertung der aufgenommenen Druckkurven erfolgte mit der Software LabChart 7. Dazu wurde bei einer Baseline-Messung der Mittelwert des systolischen Drucks in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) sowie die Herzfrequenz in Schläge pro Minute (1/min) in einem Zeitraum von 8 sek bestimmt. Bei Applikation von vasoaktiven Substanzen wurde jeweils ein bestimmter Zeitpunkt nach Applikation festgelegt an dem der Mittelwert des Druckes bestimmt wurde (s. 2.5.4).

2.5.8 Perfusion und Fixation des Herz-Lungen-Paketes

Nach Beendigung der hämodynamischen Messungen wurde das Herz-Lungen-Paket der Maus für histologische Untersuchungen entnommen (s. 2.5.1.1) und in 4 % Roti-Histofix fixiert. Dafür wurde das Herz-Lungen-Paket zunächst in kaltes PBS überführt, die Trachea wurde auf eine Kanüle aufgezogen und mittels Ligatur an dieser befestigt. Die Kanüle wurde an eine Perfusionsapparatur angeschlossen. Daraufhin wurden die Lungengefäße mittels einer Butterfly-Nadel über die rechte Herzkammer mit einem über die Höhenlage eingestellten Druck von 62,5 cmH₂O für 5 min mit PBS perfundiert. Die Atemwege wurden über die an der Trachea angebrachten Kanüle ebenfalls für 5 min mit PBS bei einem Druck von 25 cmH₂O perfundiert. Nachfolgend wurden die Lungengefäße und Atemwege über die Perfusionsapparatur mit 4 % Roti-Histofix fixiert (Vermeersch *et al.*, 2007). Die Lungenflügel wurden voneinander getrennt zusammen mit dem Herzen für mindestens 12 Stunden in 4 % Roti-Histofix bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden Lungenflügel und Herz in Einbett-Kassetten überführt, für 1 h mit Leitungswasser gewässert und bis zur Einbettung bei 4 °C in 70 % 2-Propanol gelagert.

2.5.9 Einbetten von Geweben in Paraffin

Zur Einbettung der Lungen und Herzen stand der Einbettautomat Microm STP-120 zur Verfügung. Die Gewebe wurden entsprechend des nachfolgenden Programms eingebettet. Die aufsteigende Alkoholreihe diente der Entwässerung der Organe. Der sich im Organ befindliche Alkohol wurde anschließend durch Xylol verdrängt, welches wiederum im letzten Schritt durch Paraffin ersetzt wurde. Die lückenlose Durchtränkung der Gewebe mit Paraffin ermöglicht die Herstellung von dünnen Gewebsschnitten unter Erhaltung ihrer mikrotopographischen Anordnung (Roulet, 1948).

Lösung	Zeit (in Stunden)
70 % Isopropanol	3
80 % Isopropanol	1
80 % Isopropanol	1
90 % Isopropanol	1
90 % Isopropanol	1
96 % Isopropanol	2
100 % Isopropanol	2
100 % Isopropanol	2
Xylol	1
Xylol	1
Paraffin Größe 3	1
Paraffin Größe 3	1

Im Anschluss an das Programm wurden die Kassetten in einer Ausgießstation bis zur Einbettung in Paraffinblöcke in heißem Paraffin gelagert. Die Lungenflügel wurden aus der Kassette entnommen und mit dem Lungenhilus nach unten in ein Gießschälchen platziert. Die Herzen wurden mit der Basis nach unten senkrecht eingebettet. Alle Proben wurden mit 60 °C heißem Paraffin (50 % Paraffin Größe 6 + 50 % Paraffin Größe 9) übergossen und auf einer Kühlplatte ausgehärtet. Anschließend konnten die Blöcke aus den Gießformen entnommen und unbegrenzte Zeit gelagert oder direkt mit dem Mikrotom geschnitten werden.

2.5.10 Paraffinschnitte der Lunge und des Herzens

Die Paraffinblöcke wurden in das Mikrotom eingespannt. Sowohl von den Lungen als auch von den Herzen wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Bei den Herzen wurde vorab so viel weggeschnitten, dass beide Herzkammern in der Aufsicht zu sehen waren. Zur Glättung der Schnitte wurden sie in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt, auf Objektträger aufgezogen und anschließend auf einen 37 °C warmem Strecktisch gelegt. Zur vollständigen Trocknung wurden die Schnitte ü.N. bei gleicher Temperatur in einem Trockenschrank aufbewahrt.

2.5.11 Färbung von Paraffinschnitten

2.5.11.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Nach vollständiger Trocknung der Präparate wurden die Lungenschnitte (s. 2.5.10) nach folgendem Färbeprotokoll gefärbt. Die Zellkerne wurden durch das Hämatoxylin blau, das Zytoplasma durch das Eosin rot gefärbt. Die Zusammensetzung der Färbelösung ist unter Punkt 2.1.3 vermerkt.

Lösung	Zeit (in Minuten)	Funktion
Xylol	3 x 10	Entparaffinisierung
100 % Ethanol	2 x 5	Rehydratisierung der Gewebsschnitte
90 % Ethanol	5	
70 % Ethanol	5	
A. dest	5	Waschen
Hämatoxylin	4	Färbung aller sauren/ basophilen Strukturen (blau)
Fliesendes warmes Wasser	2-3	Waschen
Eosin 0,5 %	2-4	Färbung aller basischen/ acidophilen Strukturen (rot)
A. dest	kurz (5 x Eintauchen)	Waschen
70 % Ethanol	kurz (5 x Eintauchen)	Entwässerung der Gewebsschnitte
90 % Ethanol	kurz (5 x Eintauchen)	
100 % Ethanol	kurz (5 x Eintauchen)	
Xylol	3 x 5	Klärung der Präparate

Eindecken mit Entellan

Die Präparate wurden unter dem Abzug ü.N. getrocknet und anschließend bei RT gelagert.

2.5.11.2 Wheat germ agglutinin (WGA)-Färbung

Die WGA-Färbung wurde an den transversalen Herzschnitten durchgeführt. WGA ist ein Lektin und bindet an Glykoproteine der Zellmembran und eignet sich dadurch zur Darstellung und Abgrenzung aller Zellen in einem Herzschnitt. Da das WGA direkt an den fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein gekoppelt ist, bedarf es keiner Primärantikörper-Inkubation. Zunächst wurden die Schnitte, wie unter Punkt 2.5.11.1 beschrieben, entparaffinisiert, rehydriert und gewaschen. Anschließend wurden sie trockengeklopft und mit einem Fett-Stift umrandet. Dies ist nötig, um einen Tropfen der Inkubationslösung lokal auf den Schnitt aufbringen zu können. Die nachfolgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach einem Waschschrift in DPBS erfolgte die Blockierung von unspezifischen Antikörperbindestellen mit 5 % Eselserum in DPBS für eine minimale Zeitdauer von 20 min. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit der WGA-Lösung (1:1000 in Hoechst) für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Danach folgten drei weitere Waschschriffe. Die Schnitte wurden mit einem Polyvinylalkohol-basierten Eindeckmedium eingedeckt und 24 h bei RT im Dunkeln getrocknet. Die dauerhafte Lagerung der gefärbten Präparate erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

2.5.12 Evaluierung der arteriellen Gefäßwanddicke

Die arteriellen Gefäßwanddicken wurde an den HE-gefärbten Lungenschnitten evaluiert. In die Auswertungen wurden nur die Arterien eingeschlossen, welche sowohl nahe an einem Bronchus lagen als auch einen Durchmesser zwischen 30 und 70 µm aufwiesen. Mikroskopische Aufnahmen mit 40-facher Vergrößerung wurden mit einem AxioStar plus Mikroskop und einer AxioCam Mrc5 Kamera erstellt (s. 2.4.3). Die Aufnahmen und die Dickenmessung wurden mit Hilfe der Axio-Vision 4.8 Software durchgeführt. Zur Analyse wurde die relative Gefäßwanddicke nach folgender Formel in Prozent berechnet.

$$\frac{2 \times \text{Gefäßwanddicke}}{\text{Durchmesser der Arterie}} \times 100$$

2.5.13 Auswertung der Kardiomyozyten-Fläche

Zur Erstellung der mikroskopischen Aufnahmen wurde das ApoTom-System mit 40-facher Vergrößerung unter Nutzung der Zen blue Software verwendet (s. 2.4.3). Zur Auswertung der Fläche der Kardiomyozyten wurden nur Schnitte verwendet, bei welchen die Papillarmuskeln zu sehen sind. Dadurch sollte in jedem Herz eine ähnliche Ebene ausgewertet werden. Die

Bestimmung der Flächen wurde mit der Axio-Vision 4.8 Software mit entsprechend eingestellter Größenskala durchgeführt. Dazu wurden die Zellen entlang ihrer Zellmembran umfahren. Die Fläche wurde daraufhin von der Software berechnet und angezeigt. Es wurden nur Zellen mit klar sichtbarem Kern (Hoechst-Färbung) sowie klar sichtbarer Abgrenzung zu benachbarten Zellen ausgewertet. Insgesamt wurden 20 Zellen pro rechtem Ventrikel aus mehreren Aufnahmen ausgewertet.

2.6 Statistik

Die Berechnung von statistischen Signifikanzen wurde mit den Programmen Microsoft Excel und GraphPad Prism 5 durchgeführt. Bei zwei zu vergleichenden Gruppen wurde ein Student`s t-Test, bei mehreren Gruppen eine Varianzanalyse (one-way ANOVA; Post hoc Test: Tukey) durchgeführt. Ein Ergebnis wurde als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die berechneten Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes.

3. Ergebnisse

Gq-Proteine sind zentrale Mediatoren der Funktion glatter Muskelzellen in systemischen aber auch in pulmonalen Gefäßen. Daher wurde der Effekt des pan-Gq-Inhibitors FR900359 (FR) auf den Tonus von Pulmonalarterien (PAs) *ex* und *in vivo* sowie auf das Wachstum humaner pulmonal-arterieller glatter Muskelzellen (hPASMC) *in vitro* charakterisiert und mit verschiedenen Medikamenten verglichen, die bei der Behandlung der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) eingesetzt werden. Daneben wurde die präventive und therapeutische Wirkung von FR in einem Mausmodell der pulmonalen Hypertonie (PH) untersucht.

3.1 Untersuchung des Effekts von FR auf den pulmonalen Gefäßtonus

3.1.1 Effekt einer Einzeldosis FR nach Vorkontraktion mit verschiedenen Gq-abhängigen Agonisten

Zur Untersuchung der relaxierenden Wirkung des pharmakologischen pan-Gq-Inhibitors FR in den großen PAs der Maus wurden isometrische Kraftmessungen am Draht-Myographen durchgeführt. Die Gefäße wurden dabei mit verschiedenen pathophysiologisch relevanten Gq-abhängigen Vasokonstriktoren vorkontrahiert. Nach Ausbildung eines Plateaus wurde jeweils eine Einzeldosis FR (10^{-6} M) appliziert und die resultierende Relaxation gemessen.

Nach submaximaler Stimulation der Gefäßringe mit Serotonin (5-HT, 5×10^{-7} M) induzierte FR eine starke Relaxation von $79,2 \pm 2,5$ % ($n=12$, FR vs. Lösungsmittel (DMSO): $1,8 \pm 2,1$ %, $n=10$, $p < 0,001$, Messzeitpunkt: 8 Minuten (min) nach Applikation). Im Anschluss an eine Kontraktion mit dem Thromboxan (TxA)-Analogon U-46619 (10^{-7} M) wurde eine deutlich geringere Relaxation durch FR gemessen ($52,2 \pm 3,0$ %, $n=15$), während die Applikation von FR nach Endothelin-1 (ET-1, 3×10^{-9} M)-Gabe wieder eine stärkere Relaxation von $71,8 \pm 1,2$ %, $n=12$, auslöste (Abb. 11 A-D). Nach Gq-unabhängiger Kontraktion durch 4×10^{-2} M Kaliumchlorid (KCl) löste FR, wie erwartet, keine Relaxation aus (FR: $-1,4 \pm 0,4$ %, $n=6$, vs. DMSO: $-1,7 \pm 0,4$ %, $n=6$, $p > 0,05$). Die Ergebnisse zeigen, dass FR eine Gq-vermittelte Vasokonstriktion revertieren kann. Allerdings wird auch deutlich, dass das Ausmaß der Relaxation vom Konstriktor abhängig ist. Aufgrund der unterschiedlichen Relaxationsstärke von FR nach verschiedenen Gq-abhängigen Vasokonstriktoren vermuteten wir, dass insbesondere bei der Vasokonstriktion durch U-46619 und ET-1 neben Gq weitere G-Proteine beteiligt sind.

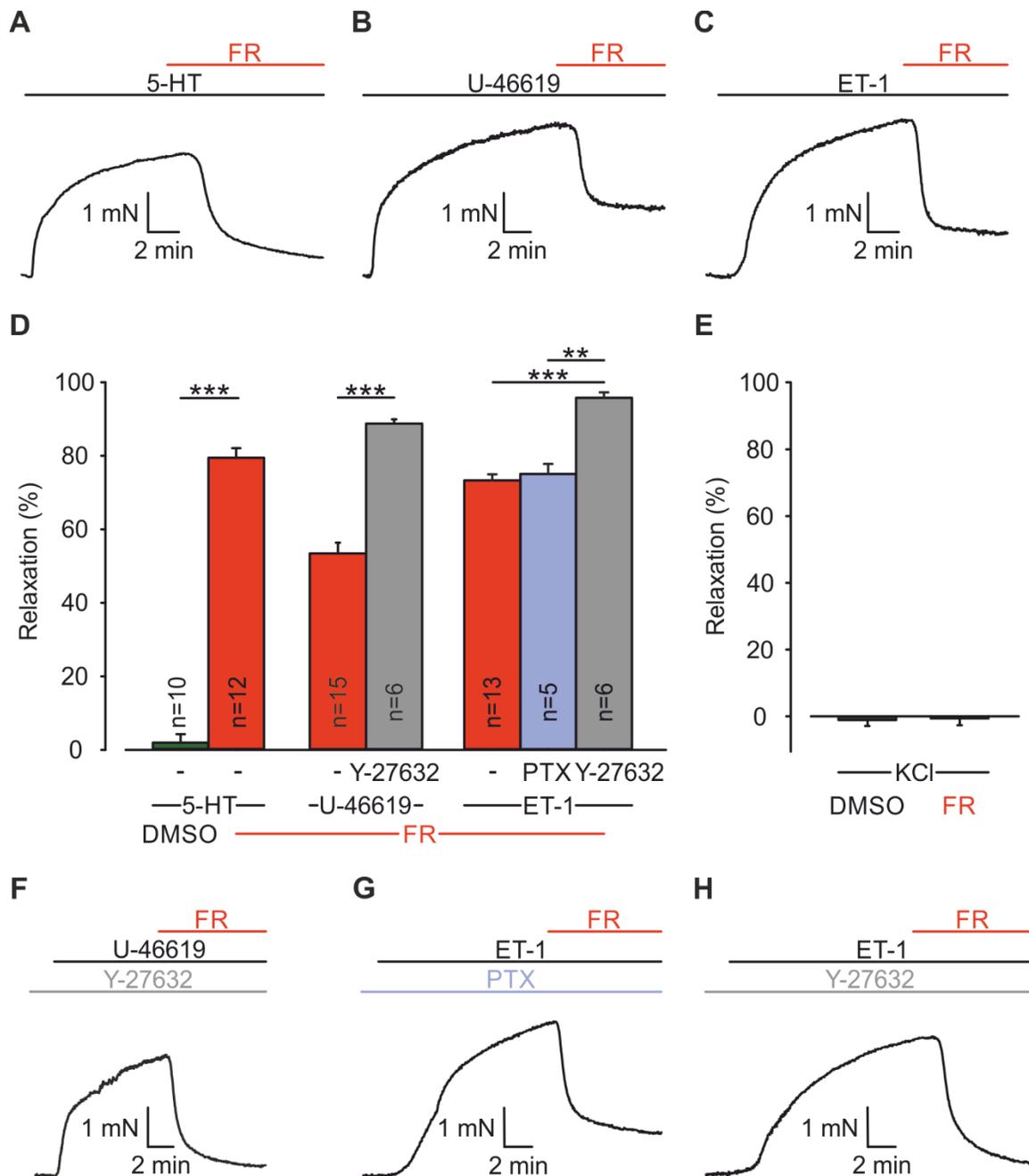


Abb. 11: Gq-Proteine sind zentrale Mediatoren der Vasokonstriktion von PAs nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten. (A-C) Originalkurven der FR (10^{-6} M)-induzierten Relaxation von PAs nach 5-HT (5×10^{-7} M, **A**), U-46619 (10^{-7} M, **B**)- und ET-1 (3×10^{-9} M, **C**)-Vorkontraktion **(D)** Statistische Analyse der Relaxation durch FR nach Stimulation einer Gq-vermittelten Vasokonstriktion. **(E)** Statistische Analyse der Relaxation durch FR nach Stimulation durch KCl. **(F-H)** Originalkurven der FR (10^{-6} M)-induzierten Relaxation von PAs nach U-46619 (10^{-7} M, **F**)- und ET-1 (3×10^{-9} M, **G-H**)-Vorkontraktion und zusätzlicher Behandlung mit Y-27632 (10^{-5} M, **F+H**) oder PTX (1 μ g/ml, **G**), ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA, Post-hoc-Test: Tukey (D), ungepaarter T-Test (E).

Aus früheren Studien mit PAs aus Rindern (Alapati *et al.*, 2007) und Ratten (McKenzie *et al.*, 2009) ist bereits bekannt, dass die U-46619-abhängige Vasokonstriktion neben Gq auch durch Rho-Kinasen (ROCK) vermittelt wird, die zentrale Effektor-Moleküle in der G12/13-Protein-abhängigen Signalkaskade darstellen (Wettschureck & Offermanns, 2002). Zur Verifizierung einer Beteiligung von ROCK an der U-46619-induzierten Vasokonstriktion in PAs der Maus wurden Gefäßringe mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 vorinkubiert, dann mit U-46619 stimuliert und im Anschluss die FR-induzierte Relaxation analysiert. Durch die Vorinkubation mit Y-27632 wurde die Konstriktionsamplitude von U-46619 signifikant verringert (ohne Y-27632: $3,9 \pm 0,2$ mN vs. mit Y-27632: $2,6 \pm 0,3$ mN, $n=6$, $p<0,05$). Die darauf folgende Relaxation mit FR konnte durch die Vorinkubation mit Y-27632 signifikant gesteigert werden (FR ohne Y-27632: $52,2 \pm 3,0$ % vs. FR mit Y-27632-Vorinkubation: $89,1 \pm 1,3$ %, $p<0,001$, Abb. 11D+F), was auf eine Beteiligung von G12/13/ROCK an der U46619-vermittelten Kontraktion hindeutet.

Über welche Gq-unabhängigen G-Proteine ET-1 eine Vasokonstriktion in PAs induzieren könnte, ist bisher unklar. Zur Überprüfung der Beteiligung von Gi-Proteinen wurden die PAs mit dem Gi-Protein-Inhibitor Pertussis-Toxin (PTX, $1\mu\text{g/ml}$) für 12 Stunden vorinkubiert. Im Anschluss wurde eine Vasokonstriktion mit ET-1 ausgelöst und dann der vasorelaxierende Effekt von FR gemessen. Dieser blieb durch die Behandlung mit PTX unverändert (FR ohne PTX: $73,2 \pm 1,5$ %, $n=13$, vs. FR mit PTX: $75,1 \pm 2,4$ %, $n=5$, $p>0,05$). Somit ist eine Beteiligung von Gi-Proteinen an der ET-1-induzierten Kontraktion unwahrscheinlich. Zur Untersuchung einer Beteiligung von G12/13/ROCK an der ET-1-vermittelten Kontraktion in PAs wurden die Gefäßringe wiederum mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 vorinkubiert. Die maximale Konstriktionsamplitude wurde durch die Vorinkubation mit Y-27632 nicht signifikant verändert (ohne Y-27632: $3,7 \pm 0,2$ mN vs. mit Y-27632: $3,2 \pm 0,3$ mN, $n=6$, $p>0,05$). Der insignifikante Einfluss kann durch den geringen Gq-unabhängigen Anteil an der ET-1-Kontraktion erklärt werden. Die Vorinkubation mit Y-27632 führte jedoch zu einer Erhöhung der FR-Wirkung auf nahezu 100 % (FR ohne Y-27632: $73,2 \pm 1,5$ % vs. FR mit Y-27632: $95,7 \pm 1,3$ %, $p<0,001$, Abb. 11D+G-H).

3.1.2 Effekt der FR-Vorbehandlung auf die 5-HT-DWK in PAs

Unsere Vorexperimente haben gezeigt, dass eine Einzeldosis des Gq-Inhibitors FR (10^{-6} M) nach submaximaler 5-HT Kontraktion (5×10^{-7} M) innerhalb von 8 min eine Relaxation von $79,2 \pm 2,5$ % induziert. Das Ausmaß der Relaxation nahm auch nach unserem Messzeitpunkt weiter zu. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um einen zeitabhängigen Effekt der Gq-Inhibition

handelt oder ob noch andere G-Proteine an der 5-HT-abhängigen Kontraktion beteiligt sind, haben wir im nächsten Schritt die Reihenfolge der Applikation von 5-HT und FR geändert. Anschließend wurden die PAs mit dem entsprechenden Rezeptorblocker als Positivkontrolle oder mit FR (10^{-6} M) in derselben Konzentration für 7 min vorinkubiert und danach kontrahierende DWKs mit 5-HT durchgeführt (10^{-9} M bis 10^{-5} M). Nach Applikation des Lösungsmittels war bei zunehmenden 5-HT-Konzentrationen ein Anstieg der Kontraktionskraft mit typischem sigmoidalem Verlauf zu detektieren. Entsprechend der Literatur wird die 5-HT-abhängige Kontraktion in PAs hauptsächlich durch den 5-HT_{2A/2C}-Rezeptor vermittelt (Frenken & Kaumann, 1984). Daher wurden als Positivkontrolle PAs mit dem 5-HT_{2A/2C}-Antagonisten Ketanserin (10^{-6} M) inkubiert und nachfolgend 5-HT-DWKs vermessen. Die Vorinkubation mit Ketanserin (10^{-6} M) führte zu einer kompletten Blockierung der 5-HT-induzierten Kontraktion. Die jeweiligen Kontraktionsamplituden bei 10^{-5} M 5-HT wurden auf die Kontrolle (DMSO) normiert (DMSO: $100 \pm 4,3$ %, $n=6$, vs. Ketanserin: $2,7 \pm 1,1$ %, $n=4$, $p<0,001$). Die Applikation von FR (10^{-6} M) und somit die Inhibierung der Gq-Proteine führte ebenfalls zu einer nahezu kompletten Blockade der 5-HT-Kontraktion $0,7 \pm 1,2$ % ($n=4$, FR vs. DMSO, $p<0,001$, Abb. 12).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die 5-HT-induzierte Vasokonstriktion in den großen PAs über 5-HT_{2A/2C}-Rezeptoren vermittelt wird. Zudem ist die Kontraktion in den großen PAs so gut wie ausschließlich von Gq-Proteinen abhängig.

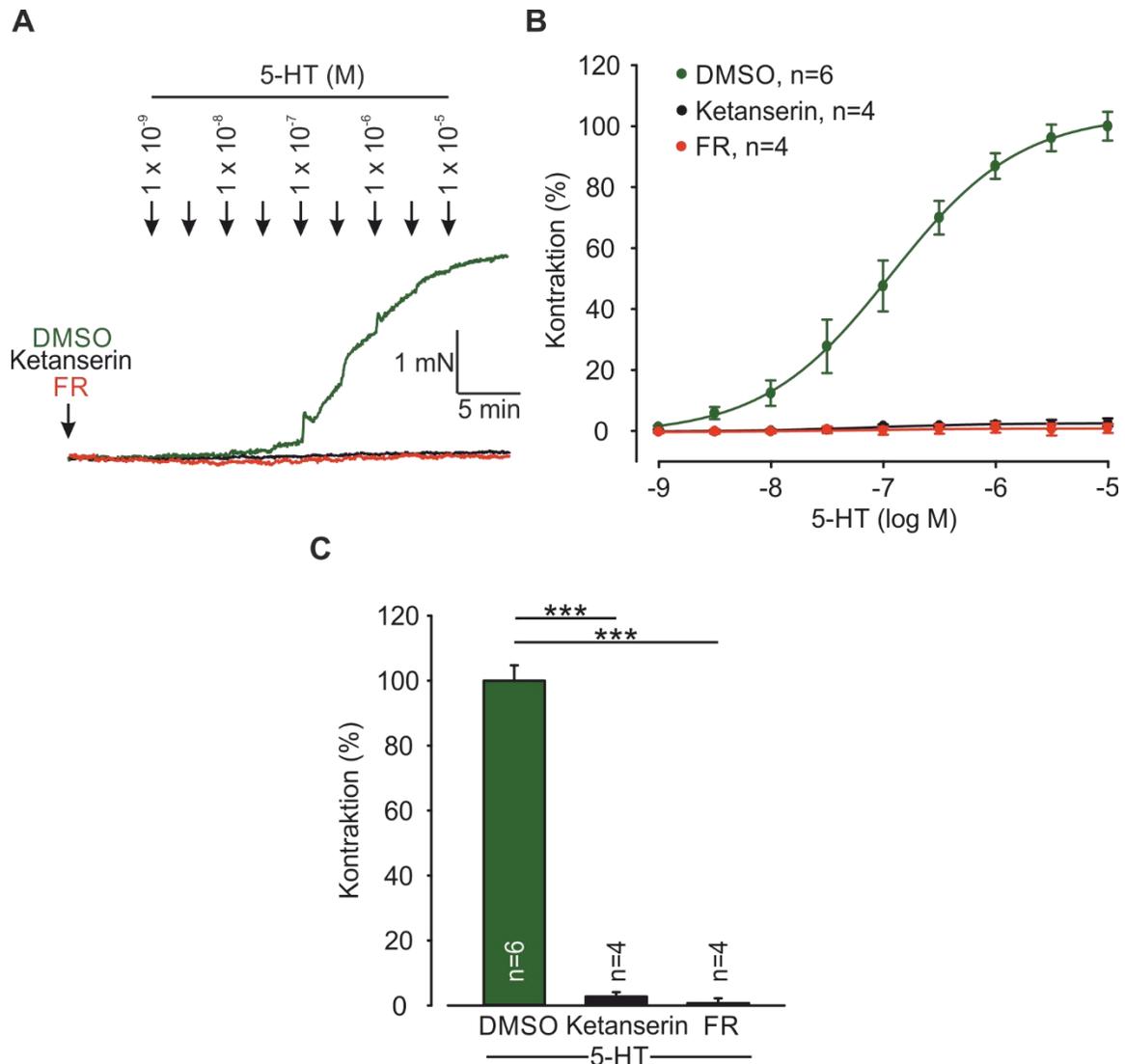


Abb. 12: FR-Vorinkubation verhindert die 5-HT-induzierte Kontraktion in PAs vollständig. (A, B) Originalkurven (A) und Analyse (B) der 5-HT DWK nach Vorinkubation mit dem Lösungsmittel DMSO, dem 5-HT_{2A/2C}-Rezeptor-Antagonisten Ketanserin (10^{-6} M) oder FR (10^{-6} M). (C) Statistische Analyse der maximalen Kontraktion nach 10^{-5} M 5-HT, *** $p < 0,001$, ANOVA, Post-hoc-Test: Tukey.

3.1.3 Effekt der FR-Vorbehandlung auf die U-46619-DWK in PAs

Unsere Vorversuche haben gezeigt, dass eine Einzeldosis FR (10^{-6} M) nach submaximaler U-46619-Vasokonstriktion (10^{-7} M) eine Relaxation von $52,2 \pm 3,0$ % induziert. Die Hemmung von ROCK führte zu einer Steigerung der relaxierenden Wirkung von FR auf $89,1 \pm 1,3$ % 8 min nach FR-Applikation (Abb. 11). Zur genaueren Beurteilung der an der U-46619-Kontraktion beteiligten G-Proteine, wurde in weiteren Versuchen die Reihenfolge der Applikationen verändert. Zunächst wurden die PAs mit dem Lösungsmittel DMSO vorinkubiert und im Anschluss mit dem TxA-Rezeptor-Agonisten U-46619 dosisabhängig kontrahiert (10^{-10} M -

10^{-5} M). In den DMSO-Kontrollen war bei zunehmenden U-46619-Konzentrationen ein Anstieg der Kontraktionskraft mit typischem sigmoidalem Verlauf zu sehen. Als Positivkontrolle für die Blockade dieses Effekts wurde der spezifische TxA₂-Prostaglandin/H₂-Rezeptor-Antagonist SQ 29,548 (SQ, 10^{-6} M, 7-minütige Vorinkubation) verwendet (Hedberg *et al.*, 1988). SQ führte entsprechend einer kompetitiven Blockade des TxA-Rezeptors zu einer Rechtsverschiebung der U-46619-DWK.

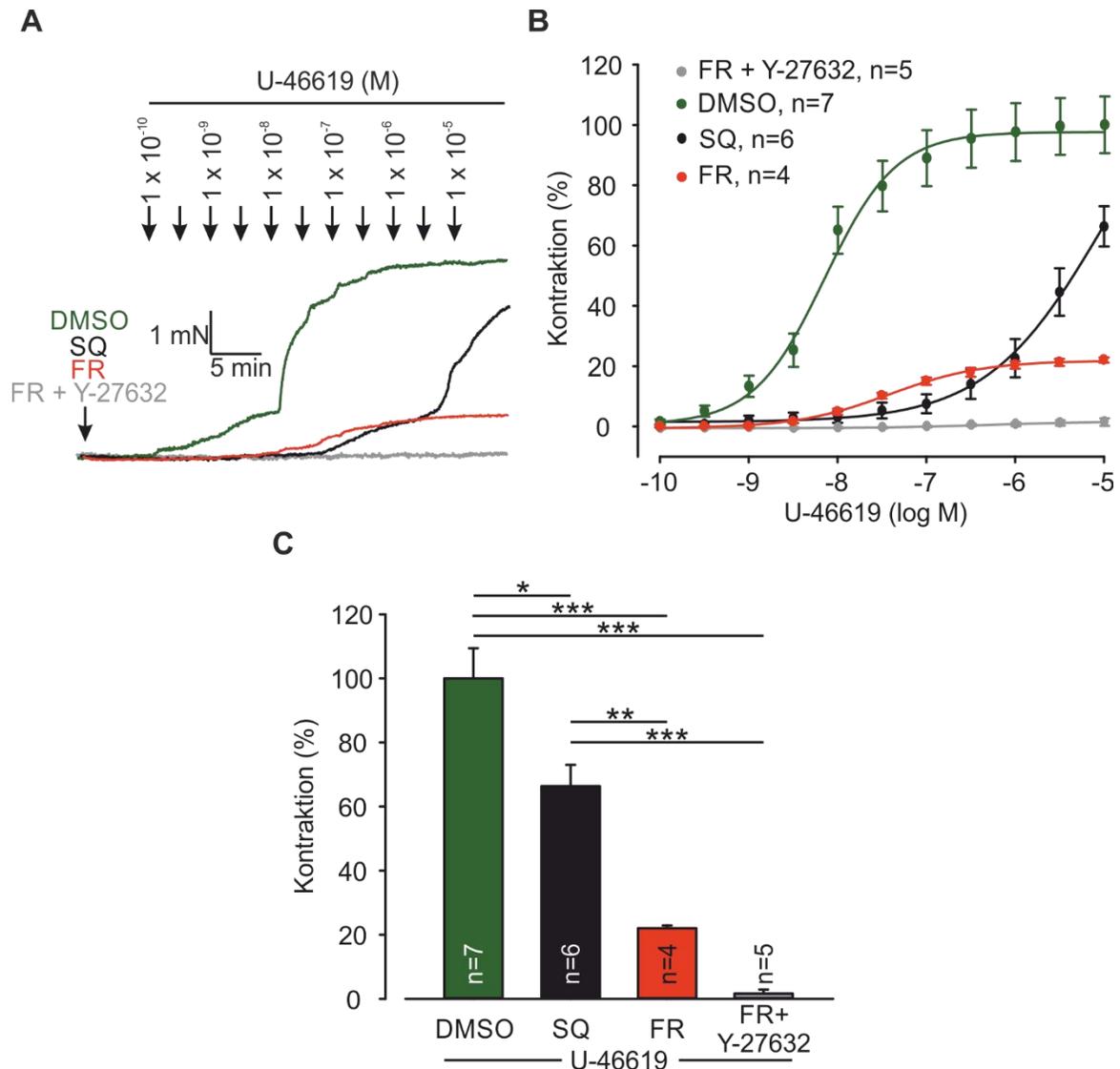


Abb. 13: FR-Inkubation reduziert die U-46619-induzierte Kontraktion in PAs. (A, B) Originalkurven (A) und Analyse (B) der U-46619 DWK nach Vorinkubation mit dem Lösungsmittel DMSO, dem TxA-Rezeptor-Antagonisten SQ (10^{-6} M), FR (10^{-6} M) oder FR + Y-27632 (10^{-5} M) (C) Statistische Analyse der maximalen Kontraktion nach 10^{-5} M U-46619, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA, Post-hoc-Test: Tukey.

Die jeweiligen Kontraktionsamplituden bei 10^{-5} M U-46619 wurden auf die Kontrolle (DMSO) normiert (DMSO: $100,0 \pm 8,7$ %, $n=7$, vs. SQ: $66,3 \pm 6,1$ %, $n=6$, $p<0,05$). In den mit FR (10^{-6} M) behandelten PAs startete die Kontraktion im Vergleich zu den Lösungsmittel-Kontrollen erst bei einer 100-fach höheren U-46619-Konzentration. Zudem bewirkte FR eine starke und konstante, auch durch hohe Konzentrationen von U-46619 nicht aufhebbare Reduktion der Kontraktionsstärke im Vergleich zu den Lösungsmittel-Kontrollen (FR: $22,0 \pm 0,7$ %, $n=4$, vs. DMSO, $p<0,001$, Abb. 13), was auf die pseudo-irreversible Hemmung von Gq durch FR hinweist (Schrage *et al.*, 2015). Allerdings führte FR nicht zu einer kompletten Inhibierung der U-46619-Kontraktion. Zur Überprüfung der Beteiligung von G12/13/ROCK an dem FR-insensitiven Anteil der Kontraktion wurden PAs mit FR und dem ROCK-Inhibitor Y-27632 (10^{-5} M) vorinkubiert. Erst eine gemeinsame Hemmung der Gq-Proteine und ROCK führte zu einer vollständigen Blockierung der Kontraktion (FR + Y-27632: $1,6 \pm 1,1$ %, $n=5$, Abb. 13).

Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die durch U-46619 induzierte Vasokonstriktion in PAs Gq-Protein- und G12/13/ROCK-abhängig ist.

3.1.4 Effekt der FR-Vorbehandlung auf die ET-1 DWK in PAs

Eine Einzeldosis FR (10^{-6} M) konnte die Vorkontraktion durch ET-1 (3×10^{-9} M) um $71,8 \pm 1,2$ % relaxieren. Die Hemmung der ROCK durch Y-27632, nicht aber von Gi-Proteinen durch PTX, führte zu einer deutlich stärkeren relaxierenden Wirkung von FR in den Einzeldosis-Experimenten (FR + Y-27632: $95,7 \pm 1,3$ %, Abb. 11). Zur differenzierteren Beurteilung des Kontraktionsmechanismus sowie zur Vermeidung von zeitabhängigen Relaxationsprozessen wurde die Reihenfolge der Applikationen vertauscht. Zunächst wurden die PAs mit dem Lösungsmittel inkubiert und im Anschluss dosisabhängig mit ET-1 kontrahiert (10^{-12} M – 10^{-7} M). In den Kontrollen war bei steigenden ET-1-Konzentrationen ein Anstieg der Kontraktionskraft mit typischem sigmoidalem Verlauf zu sehen. Als Positivkontrolle für die ET-Rezeptorblockade wurde der im PH-Tiermodell erfolgreich angewandte (S. J. Chen *et al.*, 1995; Clozel *et al.*, 1994) und klinisch eingesetzte ET_{A/B}-Rezeptorantagonist Bosentan verwendet (Klinger *et al.*, 2019). Die Vorinkubation mit Bosentan (10^{-6} M, 7-minütige Vorinkubation) führte zu einer Rechtsverschiebung der DWK. Die Kontraktionsamplituden bei 10^{-7} M ET-1 wurden jeweils auf die Kontrolle (DMSO) normiert (DMSO: $100,0 \pm 5,6$ %, $n=7$, vs. Bosentan: $68,2 \pm 7,2$ %, $n=6$, $p<0,01$). In den mit FR (10^{-6} M) behandelten PAs startete die Kontraktion im Vergleich zur den Lösungsmittel-Kontrollen erst bei 100-fach höherer ET-1-Konzentration. Zudem bewirkte FR abermals eine starke und konstante, auch durch höhere ET-1-

Konzentrationen nicht aufhebbare Reduktion der Kontraktionsstärke im Vergleich zu den Kontrollen (FR: $12,0 \pm 1,4$ %, $n=4$, vs. DMSO, $p<0,001$), was wiederum auf die pseudo-irreversible Hemmung von Gq durch FR hinweist (Schrage *et al.*, 2015). Allerdings konnte keine komplette Inhibierung der ET-1-Kontraktion durch FR ausgelöst werden.

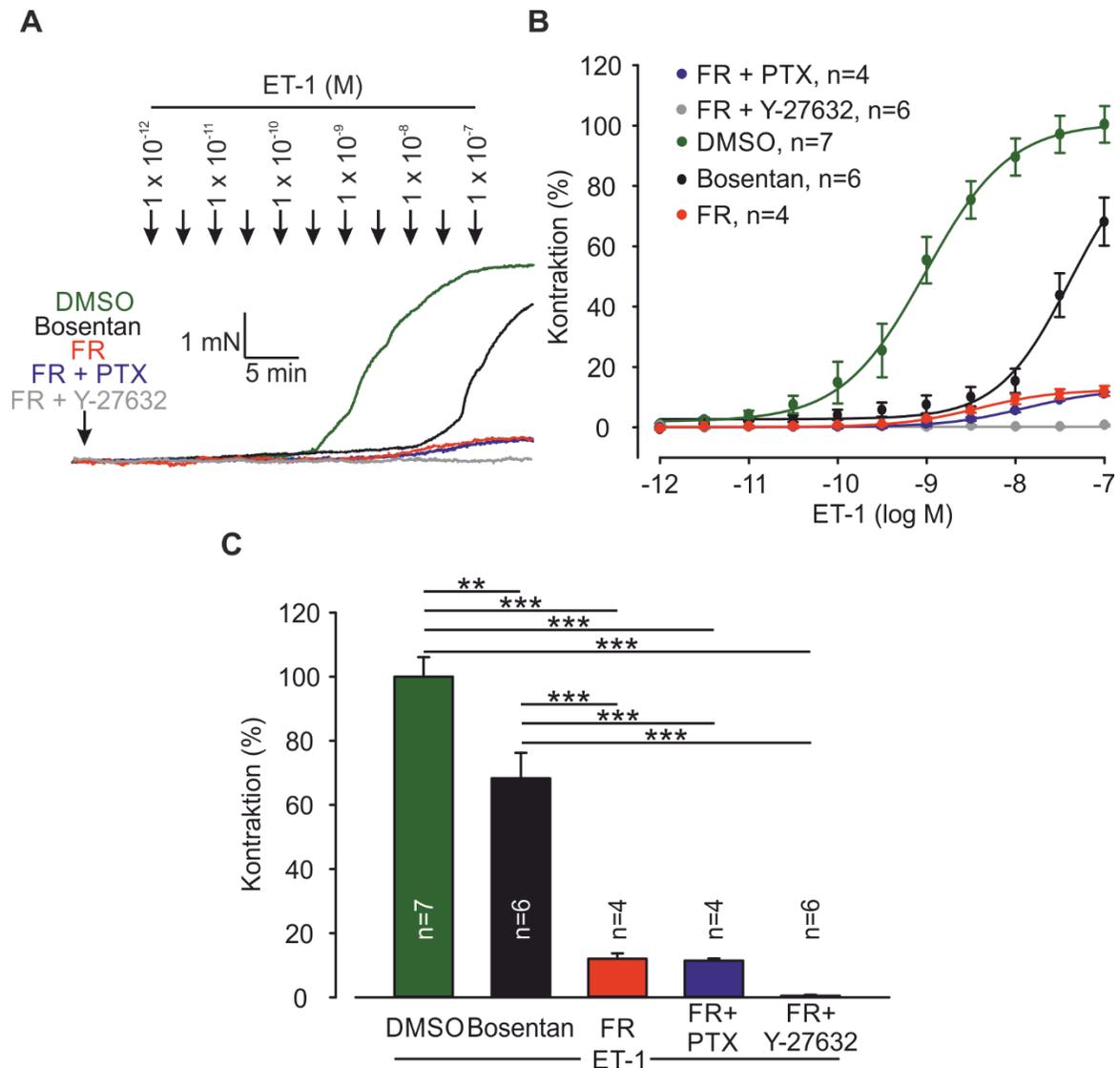


Abb. 14: FR-Inkubation führt zu einer deutlich verringerten ET-1 Kontraktion in PAs. (A, B) Originalkurven (A) und Analyse (B) der ET-1 DWK nach Vorinkubation mit dem Lösungsmittel DMSO, dem ET-1-Rezeptor-Antagonisten Bosentan (10^{-6} M), FR (10^{-6} M) sowie FR + PTX (1 $\mu\text{g/ml}$) oder FR + Y-27632 (10^{-5} M). (C) Statistische Analyse der maximalen Kontraktion nach 10^{-7} M ET-1, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, ANOVA, Post-hoc-Test: Tukey.

Zur Überprüfung der Beteiligung von Gi-Proteinen an der FR-insensitiven Komponente der ET-1-Kontraktion wurden PAs mit FR und dem Gi-Protein-Inhibitor PTX (1 $\mu\text{g/ml}$) 12 Stunden vorinkubiert und im Anschluss mittels ET-1 dosisabhängig kontrahiert. Eine Veränderung der

DWK bzw. maximalen Kontraktion konnte nicht festgestellt werden (FR + PTX: $11,4 \pm 0,5$ %, $n=4$), wodurch eine Beteiligung von Gi-Proteinen ausgeschlossen werden konnte. Die kombinierte Gabe von FR und dem ROCK-Inhibitor Y-27632 (10^{-5} M) führte jedoch zu einer vollständigen Blockierung der Vasokonstriktion durch ET-1 (FR + Y-27632: $1,6 \pm 1,1$ %, $n=5$, Abb. 14), was eine Beteiligung von Gq- und G12/13/ROCK nahelegt.

3.2 Effektivität von FR im Vergleich zu PAH-Medikamenten

Bei den derzeitigen Behandlungsstrategien der PAH kommen verschiedene Medikamente mit unterschiedlichen Zielmolekülen (ET_{A/B}-Rezeptor, Prostazyklin-Rezeptoren, Phosphodiesterasen (PDE)) zum Einsatz (Galiè *et al.*, 2016; Klinger *et al.*, 2019; Lau *et al.*, 2017). Daneben ist ET-1 ein pathophysiologisch entscheidender Mediator der Überkontraktilität bei der PAH (Giaid *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 1991). Um den relaxierenden Effekt des Gq-Inhibitors FR mit demjenigen von etablierten Medikamenten in PAs *ex vivo* zu vergleichen, wurden somit in isometrischen Kraftmessungen DWKs (10^{-9} M – 10^{-5} M) nach ET-1-Vorkontraktion (3×10^{-9} M) durchgeführt.

Die Applikation von FR führte zu einer starken dosisabhängigen pulmonalen Vasodilatation mit einer maximalen Relaxation von $73,4 \pm 2,8$ % (10^{-5} M, $n=7$, Messzeitpunkt: 3 min nach Applikation, Abb. 15A+E), während das Lösungsmittel DMSO keinen Effekt zeigte (DMSO: $1,2 \pm 0,8$ %, $n=8$, Abb. 15E). Der ET_{A/B}-Rezeptor Antagonist Bosentan, der zu den Standardmedikamenten bei PAH gehört (Galiè *et al.*, 2016), konnte nur eine maximale Relaxation von $8,8 \pm 1,9$ % (10^{-5} M, $n=5$, Abb. 15B+E) erreichen. Iloprost, ein Prostazyklin Analog, induzierte bei einer maximalen Dosis von 10^{-5} M eine Relaxation von $27,5 \pm 3,9$ % ($n=6$, Abb. 15C+E). Der PDE5-Inhibitor Sildenafil konnte eine maximale Relaxation von $34,6 \pm 3,5$ % (10^{-5} M, $n=7$, Abb. 15D+E) induzieren. Somit zeigten die getesteten aktuell klinisch verwendeten Wirkstoffe nach vergleichbarer Vorkontraktion mit ET-1 (DMSO: $3,8 \pm 0,2$ mN, FR: $4,4 \pm 0,3$ mN, Bosentan: $4,2 \pm 0,2$ mN, Iloprost: $4,5 \pm 0,2$ mN, Sildenafil: $4,1 \pm 0,2$ mN, $p>0,05$) einen deutlich schwächeren vasorelaxierenden Effekt als der Gq-Inhibitor FR. Im Anschluss an die höchste Dosis Bosentan, Iloprost oder Sildenafil wurde zusätzlich eine Einzeldosis FR (10^{-6} M) appliziert. Diese Einzeldosis erhöhte die Relaxationen in den entsprechenden Messungen deutlich auf jeweils ca. 70 % (Bosentan + FR: $70,4 \pm 2,3$ % vs. Bosentan, $p<0,001$, Iloprost + FR: $68,2 \pm 4,4$ % vs. Iloprost, Sildenafil + FR: $73,4 \pm 3,9$ % vs. Sildenafil, $p<0,001$, Abb. 15F).

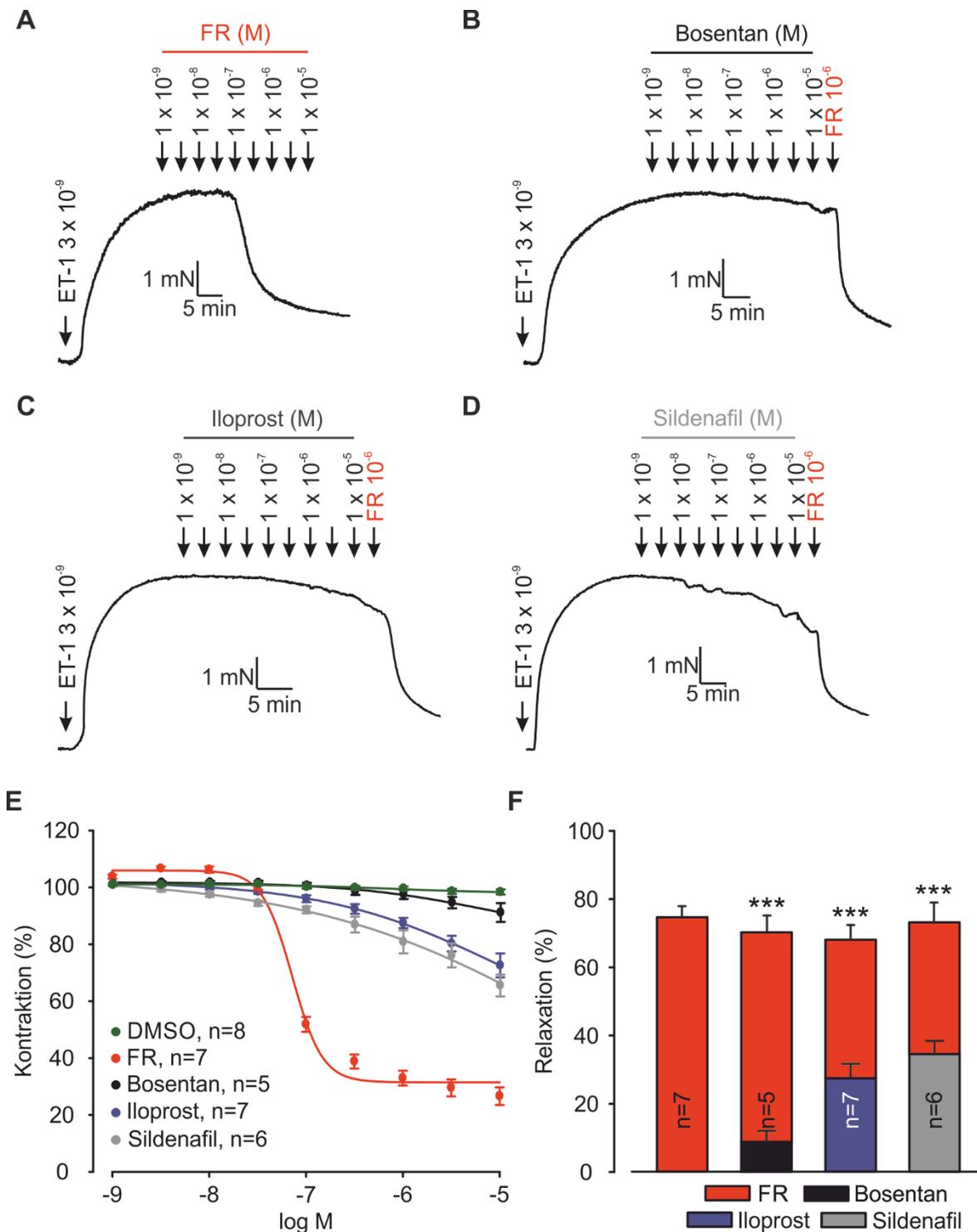


Abb. 15: FR relaxiert PAS deutlich stärker als Wirkstoffe von gängigen PAH-Medikamenten. (A, B, C, D) Originalkurven der DWK (10^{-9} M – 10^{-5} M) von FR (A), Bosentan (B), Iloprost (C) und Sildenafil (D) nach ET-1 Vorkontraktion (3×10^{-9} M). Im Anschluss an die höchste Dosis der PAH Wirkstoffe wurde zusätzlich eine Einzeldosis von FR appliziert. **(E, F)** Analyse der DWK (E) und statistische Auswertung (F). Quantifiziert wurde die Relaxation nach Applikation der höchsten Dosis der DWK sowie nach einer zusätzlichen Einzeldosis FR (10^{-6} M), *** $p < 0,001$, gepaarter T-Test.

Die maximal erreichte Relaxation von ca. 70 % 5 min nach FR-Applikation stimmt mit der Relaxation nach einer FR-Einzeldosis ($71,8 \pm 1,2$ %) und nach der maximalen Dosis von FR in der DWK ($73,4 \pm 2,8$ %) nach ET-1-Kontraktion überein.

Aufgrund der geringen Effekte der klinisch eingesetzten Medikamente in den isometrischen Kraftmessungen wollten wir ihre Wirkung mit FR in einem weiteren krankheitsspezifischen Assay vergleichen. Neben der Gefäßkonstriktion ist ein weiteres Hauptmerkmal der PAH das Remodeling der Gefäße mit Proliferation sowie Migration der glatten Muskelzellen in die kleinen peripheren, normalerweise nicht-muskularisierten PAs (Humbert *et al.*, 2004; Thompson & Lawrie, 2017).

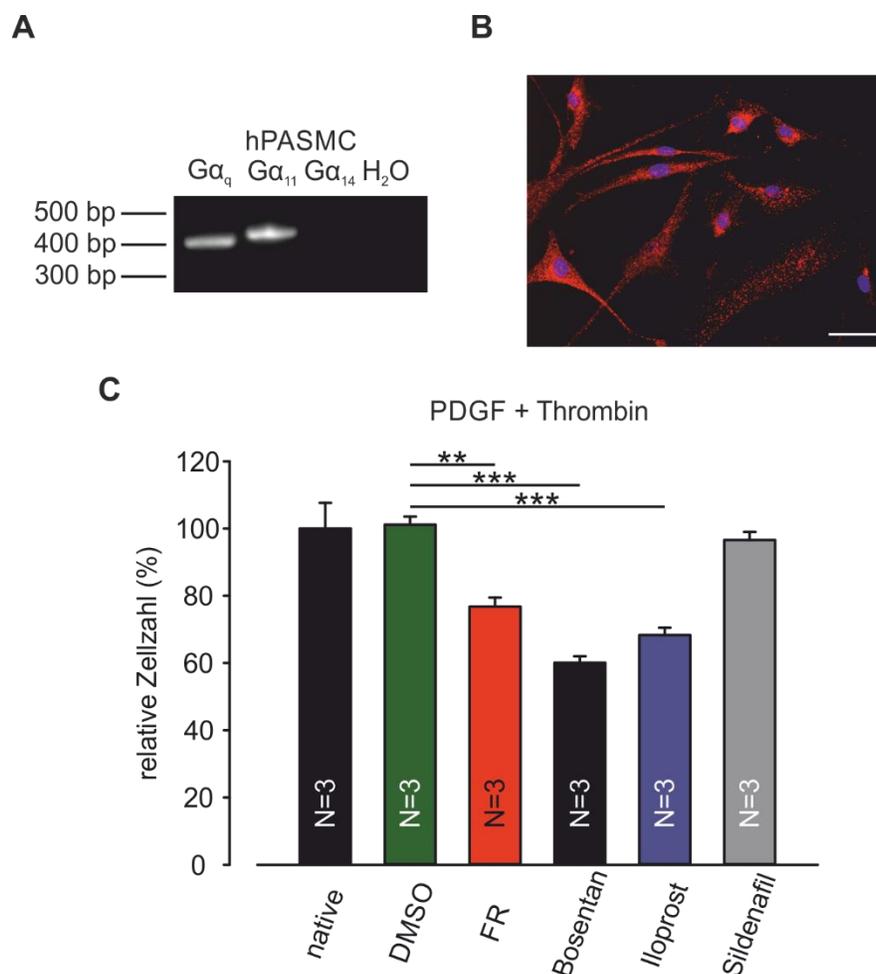


Abb. 16: FR reduziert das Zellwachstum nach PDGF/Thrombin-Stimulation. (A) PCR-Analyse von Gq-Proteinsubtypen in hPASMC. **(B)** Immunfluoreszenz-Färbung von hPASMC mit einem G α_q /G α_{11} spezifischen Antikörper, Maßstabsbalken: 50 μ m. **(C)** Statistische Analyse der Zellzahl an Tag 5. Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von 10^{-6} M eingesetzt, **p < 0,01, ***p < 0,001, ANOVA, Post-hoc-Test: Tukey.

Diese pathophysiologischen Veränderungen werden experimentell üblicherweise mit Hilfe eines Wachstumsassays von glatten Gefäßmuskelzellen nachvollzogen. Dabei kann das Zellwachstum mit dem *platelet derived growth factor* (PDGF, C. Lu *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 2012) und/oder Thrombin (BelAiba *et al.*, 2006; C. Lu *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 2013) stimuliert werden. Beiden Substanzen wird ein aktiver Beitrag zum Gefäßremodeling bei pulmonalen Gefäßerkrankungen zugeschrieben (BelAiba *et al.*, 2006; Perros *et al.*, 2008; Schermuly *et al.*, 2005). Um den Effekt von FR und den Wirkstoffen der PAH-Medikamente auf das Wachstum glatter Muskelzellen zu vergleichen, wurde ein Wachstumsassay mit hPASMCM durchgeführt. Zunächst wurde die Gq-Expression in den hPASMCM überprüft. Die Expression der beiden Subtypen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ konnte durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden, während $G\alpha_{14}$ in diesen Zellen nicht exprimiert wurde (Abb. 16A). Auf Proteinebene konnten die Gq-Proteine über eine immunhistologische Färbung mit einem $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -spezifischen Antikörper dargestellt werden (Abb. 16B). Zur Stimulation des Zellwachstums wurden hPASMCM über drei Tage mit PDGF und Thrombin stimuliert. Neben den Wachstumsfaktoren wurden FR, Bosentan, Iloprost oder Sildenafil (10^{-6} M) appliziert. Die Analyse erfolgte nach drei Tagen durch die Bestimmung der Zellzahl. Die Zellzahlen wurden jeweils auf die Anzahl der nativen hPASMCM, die ausschließlich mit den Wachstumsfaktoren PDGF und Thrombin stimuliert wurden, normiert. Das Lösungsmittel DMSO zeigte keinen Effekt auf die Zellzahl (nativ: $100,0 \pm 6,2$ %, N=3, vs. DMSO: $101,1 \pm 1,9$ %, N=3, $p>0,05$). Die Inhibition von Gq-Proteinen durch FR reduzierte die Zellzahl nach drei Tagen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant ($76,8 \pm 2,1$ %, N=3, vs. DMSO, $p<0,01$). Neben FR führte auch die Applikation des $ET_{A/B}$ -Rezeptor-Antagonisten Bosentan ($60,0 \pm 1,5$ %, N=3, vs. DMSO, $p<0,001$) sowie des Prostazyklin-Analogons Iloprost ($68,3 \pm 1,7$ %, N=3, vs. DMSO, $p<0,001$) zu einer verringerten Zahl hPASMCM im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu blieb die Zellzahl durch die Gabe von Sildenafil unbeeinflusst (Sildenafil: $96,6 \pm 1,9$ %, N=3, vs. DMSO, $p>0,05$).

Zur Charakterisierung der zellbiologischen Ursache des reduzierten Zellwachstums nach FR-Behandlung wurden die Zellen an Tag 5 weiteren Analysen unterzogen. Zum einen wurde ein Annexin V Apoptose-Assay und zum anderen ein Ki 67-Proliferations-Assay durchgeführt. Zur Induktion von Apoptose wurden die Zellen als Positivkontrolle für 5 Stunden mit 2 mM H_2O_2 inkubiert. Diese Behandlung führte zu einem starken Anstieg apoptotischer Zellen auf $74,3 \pm 0,6$ % (N=3, Abb. 17A). Die weitere Analyse zeigte, dass weder das Lösungsmittel noch FR Apoptose induzierten (Anzahl apoptotischer Zellen/Gesamtzellzahl: nativ: $2,2 \pm 0,2$ %, N=3, vs. DMSO: $2,9 \pm 0,1$ %, N=3, vs. FR: $2,4 \pm 0,1$ %, N=3, $p>0,05$).

Nach dem Ausschluss einer apoptotischen Wirkung von FR wurde eine Beeinflussung der Wachstumsrate durch FR als mögliche Ursache für die reduzierte Zellzahl untersucht. Dies kann mit Hilfe von Färbungen des Proliferationsmarkers Ki 67, welcher Zellen im Zellzyklus markiert, nachgewiesen werden. Der Anteil Ki 67-positiver Zellen wurde auf die entsprechende Zahl Ki 67-positiver Zellen in den nativen, nur mit Wachstumsfaktoren behandelten Zellen normiert ($100 \pm 1,8 \%$, $N=4$). Die Lösungsmittel-behandelten Zellen wiesen im Vergleich zu den nativen Zellen eine unveränderte Anzahl Ki 67-positiver Zellen auf (DMSO: $99,5 \pm 0,9 \%$, $N=4$, vs. native, $p>0,05$). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit FR zu einer Reduktion des Anteils Ki 67-positiver Zellen (FR: $93,2 \pm 1,3 \%$, $N=4$, vs. DMSO, $p<0,05$, Abb. 17B)

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die reduzierte Zellzahl in den FR-behandelten Zellen auf eine Reduzierung der Ki 67-positiven Zellen im Zellzyklus, nicht aber auf Apoptose zurückzuführen ist.

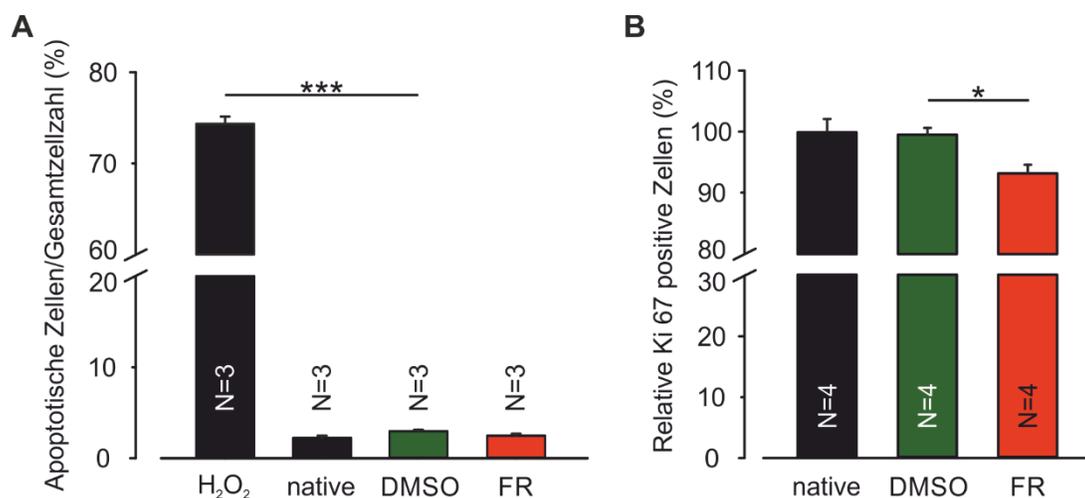


Abb. 17: FR vermindert die Zahl Ki 67-positiver hPASMC. (A) Quantifizierung der Annexin V-positiven apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie an Tag 5. Als Positiv-Kontrolle wurden native Zellen für 5 Stunden mit 2 mM H₂O₂ behandelt. **(B)** Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen an Tag 5, * $p<0,05$, *** $p<0,001$, ANOVA, Post-hoc-Test: Tukey.

3.3 Wirkung von FR auf intrapulmonale Arterien in funktionellen Lungenschnitten

Der Anstieg des pulmonalen Widerstandes bei der PAH wird maßgeblich durch die peripheren kleineren Blutgefäße verursacht (Abdel Kafi *et al.*, 1998). Daher wurde die Wirkung von FR im nächsten Schritt auch an kleinen intrapulmonalen Gefäßen getestet mittels funktionellen Lungenschnitten getestet. Ausgewertet wurde die Veränderung der Lumenfläche der pulmonal-arteriellen Gefäße während der Applikation von pharmakologischen Substanzen. Die

Lumenfläche nimmt bei einer Kontraktion ab und bei Relaxation entsprechend zu. Alle Gefäße wurden zunächst mit 5-HT (10^{-6} M) maximal vorkontrahiert, um die Funktionalität der Gefäße im Schnitt zu überprüfen. Nach dem Auswaschen erfolgte eine submaximale Kontraktion mit 5-HT (10^{-7} M) sowie die zusätzliche Applikation des Lösungsmittels DMSO oder von FR im Plateau.

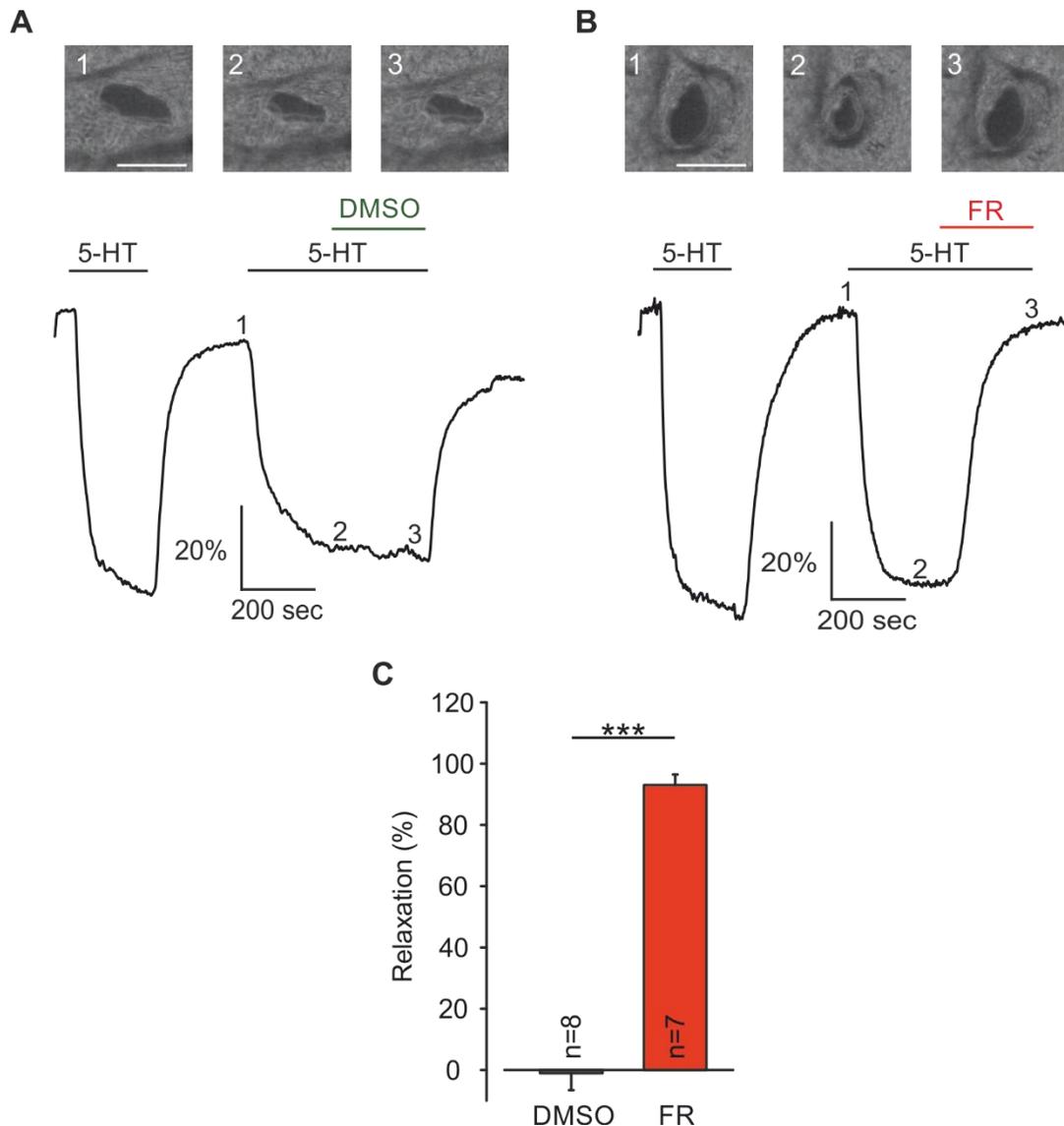


Abb. 18: FR zeigt eine stark relaxierende Wirkung auf intrapulmonale Arterien. (A, B) Phasenkontrastmikroskopie-Bilder von intrapulmonalen Gefäßen nach Lösungsmittel- (DMSO, **A**) oder FR-Applikation (**B**). Die angegebenen Nummern (1-3) finden sich an entsprechender Stelle in den Originalkurven wieder, Maßstabsbalken: 20 μ m. Die Gefäße wurden mit 10^{-6} M 5-HT maximal vorkontrahiert, nach submaximaler Kontraktion durch 5-HT (10^{-7} M) wurde die Testsubstanz appliziert. **(C)** Statistische Analyse der Relaxation der kleinen intrapulmonalen Arterien durch DMSO oder FR (10^{-6} M), ***p<0,001, ungepaarter T-Test.

Dabei führte DMSO nicht zu einer signifikanten Veränderung der Lumenfläche (DMSO: $-1,1 \pm 1,8$ % Relaxation, $n=8$). Im Gegensatz dazu bewirkte FR (10^{-6} M) eine nahezu vollständige Relaxation der intrapulmonalen Gefäße (FR: $93,0 \pm 1,2$ %, $n=7$, vs. DMSO, $p<0,001$, Abb. 18).

Diese Experimente zeigen, dass FR neben den großen PAs auch die pathophysiologisch wichtigen kleineren intrapulmonalen Lungengefäße stark relaxieren kann.

3.4 Effekt von FR auf den pulmonal-arteriellen Druck im System der isoliert-perfundierten Lunge

Im Modell der isoliert perfundierten Maus-Lunge (IPL) kann die Gesamtheit der Lungengefäße *ex vivo* untersucht werden. Dazu wird ein künstlicher Perfusionskreislauf vom rechten Ventrikel über das pulmonale Gefäßsystem zum linken Ventrikel des Herzens etabliert und der pulmonal-arterielle Druck (PAP) über einen Druckaufnehmer erfasst.

Zunächst wurde das Gefäßsystem mit 5-HT (10^{-5} M) maximal vorkontrahiert. Nach dem Auswaschen von 5-HT und der kompletten Relaxation erfolgte die Applikation einer submaximalen 5-HT-Konzentration (10^{-6} M) sowie im Anschluss die zusätzliche Gabe des Lösungsmittels DMSO oder von FR (10^{-6} M) im Plateau. Während das Lösungsmittel keinen Effekt zeigte, führte die Applikation von FR zu einer Reduktion des PAPs (DMSO: $1,0 \pm 2,4$ %, $n=6$, vs. FR: $98,9 \pm 6,4$ % Relaxation, $n=6$, $p>0,001$, Abb. 19).

Das Ergebnis zeigt eindrucksvoll, dass FR auch einen Gq-induzierten PAP-Anstieg in der ganzen Lunge vollständig revertieren kann.

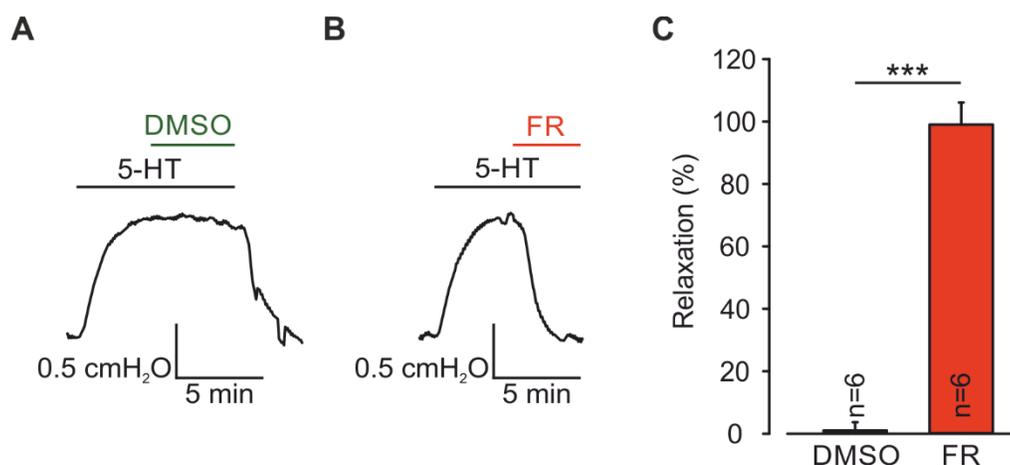


Abb. 19: FR reduziert den pulmonal-arterielle Druck (PAP) in der IPL. (A, B) Originalkurven des PAPs während DMSO (A)- oder FR (10^{-6} M, B)-Perfusion nach Druckerhöhung durch 5-HT (10^{-6} M). (C) Statistische Analyse des PAPs nach Perfusion mit DMSO oder FR (10^{-6} M), *** $p<0,001$, T-Test.

Neben der pharmakologischen Erhöhung des PAPs durch Applikation vasoaktiver Substanzen kann der pulmonale Gefäßdruck auch durch Beatmung mit hypoxischem Gas (0 % O₂/100 % N₂) erhöht werden. Dies entspricht der Auslösung einer hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV). Die HPV ist ein physiologischer Mechanismus, der das Ventilations-Perfusions-Verhältnis innerhalb der Lunge verbessert. Der molekulare Mechanismus der HPV ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

Zur Untersuchung einer potenziellen Beteiligung von Gq-Proteinen an der HPV wurde das Lungengefäßsystem zunächst mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. FR (10⁻⁶ M) perfundiert und die Maus mit Raumluft (21 % O₂) beatmet. Im Anschluss wurde bei fortlaufender Perfusion mit DMSO oder FR die Sauerstoffkonzentration bei der Beatmung auf 0 % O₂ (100% N₂) reduziert, was zur Auslösung einer HPV mit einem Anstieg des PAP führte. Ausgewertet wurde das Maximum dieses Druckanstieges in den jeweiligen Versuchsgruppen. Dieses lag in den Kontrollen bei 0,8 ± 0,1 cmH₂O (n=7) und in der FR-Gruppe bei 0,7 ± 0,2 cmH₂O (n=6) und war somit unabhängig von der FR-Applikation (p>0,05). Dies deutet auf einen Gq-unabhängigen Mechanismus bei der HPV hin.

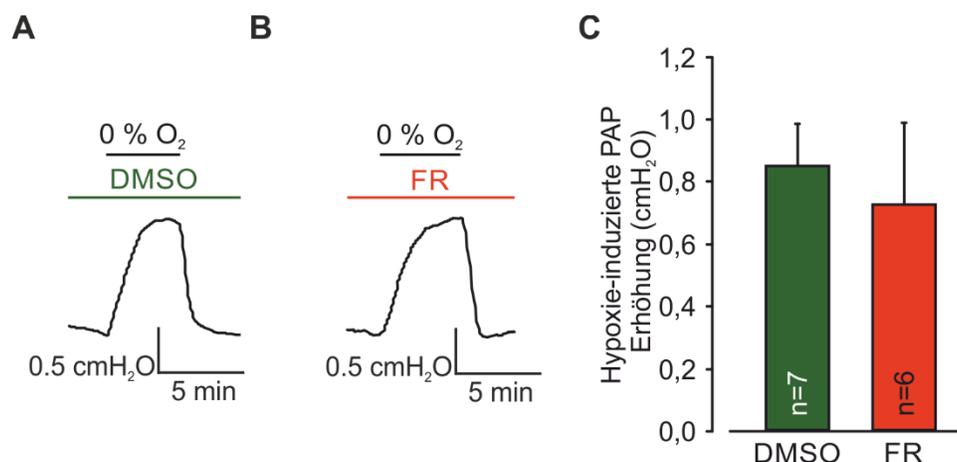


Abb. 20: FR-Inkubation beeinflusst nicht die HPV. (A, B) Originalkurven des gemessenen PAPs während DMSO (A)- oder FR (10⁻⁶ M, B)-Perfusion. Die akute HPV wurde durch Ventilation mit hypoxischem Gas (0 % O₂/100 % N₂) ausgelöst. (C) Statistische Analyse des PAPs bei hypoxischer Beatmung, ungepaarter T-Test.

3.5 Wirkung von FR auf das kardiovaskuläre System nach einmaliger lokaler Gabe *in vivo*

Die starken relaxierenden Effekte des pan-Gq-Hemmers FR auf die PAs in den *ex vivo* Kontraktionsstudien im Myographen, in funktionellen Lungenschnitten und der IPL legten nahe,

dass die vasorelaxierende Wirkung von FR auch *in vivo* auftritt. Um dies zu überprüfen, wurde FR (2,5 µg/Maus) einmalig intratracheal (i.t.) lokal in das Zielorgan Lunge appliziert. Nach einer Stunde wurde eine Rechtsherzkathetermessung mit Hilfe eines Millar 1F Katheters durchgeführt. Dadurch konnte zunächst ein möglicher Effekt von FR auf den basalen Druck im rechten Ventrikel untersucht werden. Um einen potenziellen vasodilatierenden Effekt einer Testsubstanz im pulmonalen Gefäßsystem messen zu können, ist es üblich, nach Applikation der entsprechenden Substanz den verbleibenden Effekt eines Vasokonstriktors zu bestimmen. Dies ist nötig, da das pulmonale Gefäßsystem durch einen sehr geringen basalen Tonus charakterisiert ist, der kaum weiter verringert werden kann (Champion *et al.*, 1999). In unseren Experimenten wurde nach FR-Gabe der Vasokonstriktor 5-HT appliziert. Um den Effekt von FR einschätzen und mit gegenwärtig klinisch verwendeten Wirkstoffen vergleichen zu können, wurde in einer Vergleichsgruppe der therapeutisch bei PAH eingesetzte PDE5-Inhibitor Sildenafil (Klinger *et al.*, 2019, 3 µg/Maus, i.t.) verwendet. Dieser wurde ausgewählt, da er in unseren isometrischen Kraftmessungen den stärksten vasodilatierenden Effekt zeigte und somit am ehesten mit FR vergleichbar sein könnte.

3.5.1 Hämodynamischer Effekt von FR in gesunden Tieren

Um die Auswirkung eines akuten Effekts von FR auf den pulmonalen Blutdruck zu untersuchen, wurden zunächst gesunde Tiere, welche unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, untersucht.

Eine Stunde nach der Applikation des Lösungsmittels DMSO, von FR (2,5 µg/Maus) oder Sildenafil (3 µg/Maus) wurde zunächst der basale rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) gemessen. Dieser war in allen Versuchsgruppen vergleichbar (DMSO unter normoxischen Bedingungen (DMSO-Nx): $22,4 \pm 0,5$ mmHg, n=8, vs. FR-Nx: $21,6 \pm 0,5$ mmHg, n=9, vs. Sildenafil-Nx: $22,9 \pm 0,6$ mmHg, n=8, $p > 0,05$, Abb. 21C). Ebenso war die Herzfrequenz ähnlich (DMSO-Nx: $470,1 \pm 8,2$ Schläge pro Minute (1/min) vs. FR-Nx: $449,5 \pm 12,6$ 1/min vs. Sildenafil-Nx: $428,6 \pm 10,6$ 1/min, $p > 0,05$, Abb. 21D). Im Anschluss an die Messung der Parameter unter basalen Bedingungen erfolgte die intravaskuläre Gabe (i.v.) von 5-HT (10 µl, 5×10^{-3} M). Diese führte in den Lösungsmittel-behandelten Tieren zu einem Anstieg des RVSPs um $3,0 \pm 0,6$ mmHg (n=8). In den Tieren, die mit FR behandelt waren, stieg der RVSP deutlich geringer an (FR-Nx: $1,0 \pm 0,2$ mmHg, n=9, vs. DMSO-Nx, $p < 0,01$). Im Vergleich dazu konnte die Gabe von Sildenafil den 5-HT-induzierten Druckanstieg nicht signifikant verringern (Sildenafil-Nx: $2,7 \pm 0,2$ mmHg vs. DMSO-Nx, $p > 0,05$).

Das Experiment zeigt, dass FR bei akuter Gabe den RVSP auch *in vivo* reduzieren kann, wobei Sildenafil keinen vergleichbaren Effekt zeigt.

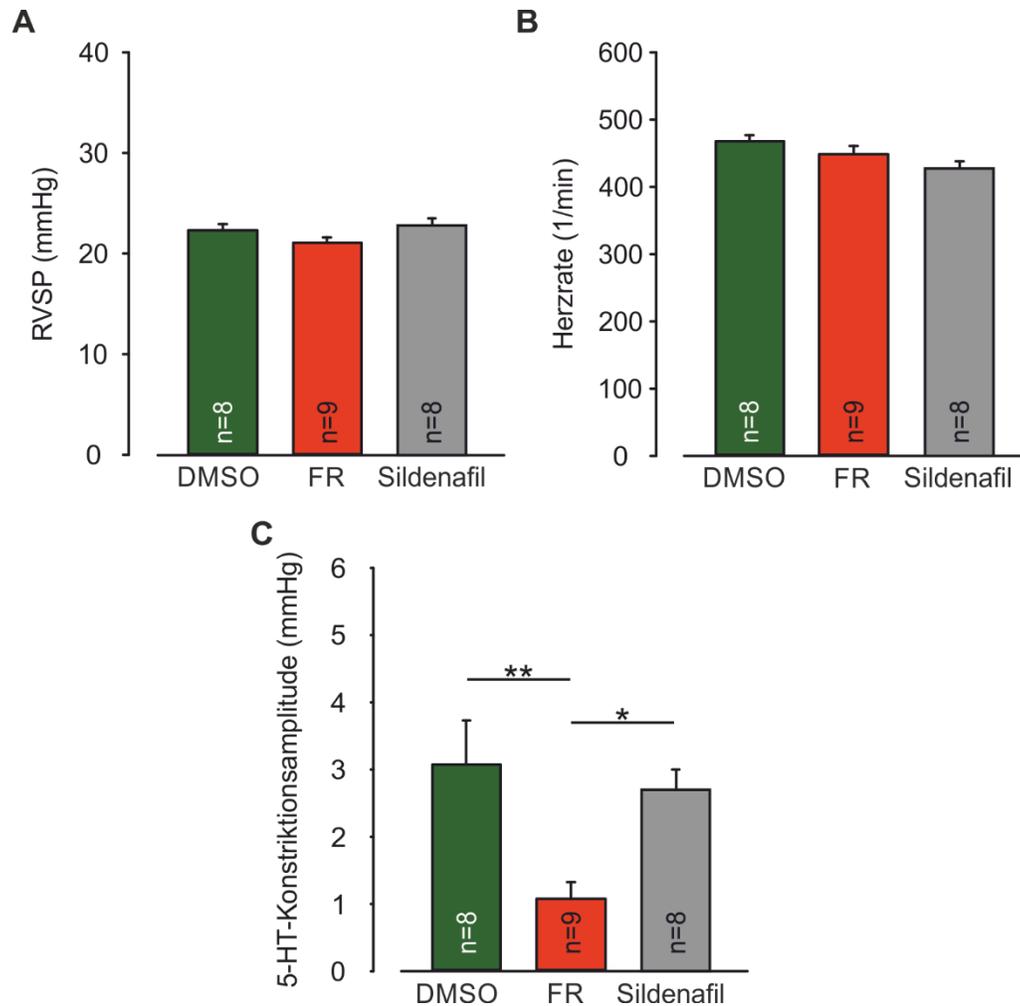


Abb. 21: FR reduziert einen 5-HT-induzierten Druckanstieg *in vivo*. (A, B, C) Statistische Analyse des basalen RVSPs (A), der basalen Herzfrequenz (B) und der 5-HT-induzierten Kontraktionsamplitude in Tieren die mit DMSO, FR (2,5 µg/Maus) oder Sildenafil (3µg/Maus) behandelt wurden (C), *p<0,05, **p<0,01, ANOVA, Post-hoc-Test: Tukey.

3.5.2 Hämodynamischer Effekt von FR in Tieren mit Hypoxie-induzierter PH

Nachfolgend wurde die oben beschriebene Analyse auch in Tieren nach Induktion einer Hypoxie-induzierten PH durchgeführt, um die therapeutische Wirksamkeit von FR im Krankheitsmodell zu untersuchen. Dieses Modell wurde gewählt, da es sich als Standardmodell in der Maus etabliert hat (Bueno-Beti *et al.*, 2018; Stenmark *et al.*, 2009; Vitali *et al.*, 2014).

Nachdem die Tiere zur Ausbildung der Hypoxie-induzierten PH über drei Wochen in einer Atmosphäre mit 10 % O₂ gehalten wurden, wurde eine Stunde vor der hämodynamischen Analyse das Lösungsmittel DMSO, FR (2,5 µg/Maus) oder Sildenafil (3 µg/Maus) i.t. verabreicht. Der Vergleich des RVSPs in den Lösungsmittel-Kontrollen nach Haltung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen zeigt, dass der RVSP, wie erwartet, bei Hypoxie angestiegen ist (DMSO-Nx: 22,4 ± 0,5 mmHg, n=8, vs. DMSO unter hypoxischen Bedingungen (DMSO-Hx): 27,6 ± 0,5 mmHg, n=9, p<0,001).

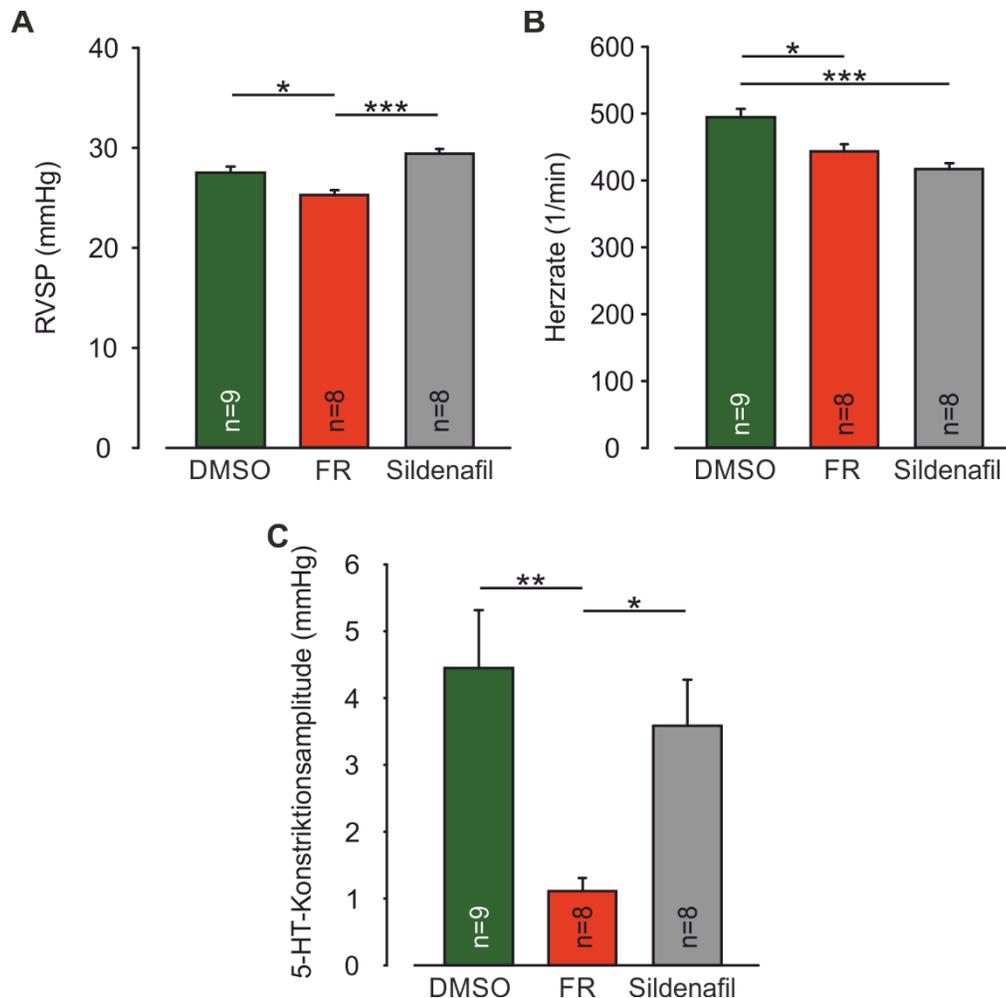


Abb. 22: FR reduziert den RVSP unter Hx-Bedingungen *in vivo*. (A, B, C) Statistische Analyse des basalen RVSPs (A), der basalen Herzfrequenz (B) und des 5-HT-induzierten Druckanstiegs in Tieren, die mit DMSO, FR (2,5 µg/Maus) oder Sildenafil (3 µg/Maus) behandelt wurden (C), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ANOVA, Post-hoc-Test: Tukey.

In den Tieren mit Hypoxie-induzierter PH konnte eine Einzelgabe von FR bereits den basalen RVSP signifikant verringern (FR-Hx: 25,3 ± 0,5 mmHg, n=8, vs. DMSO-Hx, p<0,05). Die Applikation des PDE5-Inhibitors Sildenafil hatte hingegen keinen Einfluss auf den RVSP

(Sildenafil-Hx: $29,5 \pm 0,5$ mmHg, $n=8$, vs. DMSO-Hx, $p>0,05$, Abb. 22A). Die Herzfrequenz der Lösungsmittel-Versuchsgruppe lag bei $497,0 \pm 12,7$ 1/min. Diese war in den FR- und Sildenafil-behandelten Tieren etwas erniedrigt (FR-Hx: $446,0 \pm 10,4$ vs. DMSO-Hx, $p<0,05$, Sildenafil-Hx: $419,6 \pm 9,2$ 1/min vs. DMSO-Hx, $p<0,001$, Abb. 22B). Im Anschluss an die basalen Messungen des RVSP und der Herzfrequenz wurde der Vasokonstriktor 5-HT ($10 \mu\text{l}$, 5×10^{-3} M) appliziert. Dieser führte in Tieren, denen das Lösungsmittel DMSO verabreicht worden war, ähnlich wie unter normoxischen Bedingungen, zu einem rechtsventrikulären (RV) Druckanstieg (DMSO-Hx: $4,4 \pm 0,8$ mmHg, $n=9$). Konkordant zu den Ergebnissen unter normoxischen Bedingungen konnte FR diesen akuten, starken Druckanstieg deutlich abschwächen (FR-Hx: $1,1 \pm 0,1$ mmHg, $n=8$, vs. DMSO-Hx, $p<0,01$). Im Gegensatz zu FR führte die Applikation von Sildenafil zu keiner signifikanten Verringerung des 5-HT-induzierten Druckanstiegs (Sildenafil-Hx: $3,6 \pm 0,6$ mmHg, $n=8$, vs. DMSO-Hx, $p>0,05$, Abb. 22C).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die lokale Einmalgabe von FR den erhöhten basalen RVSP bei Hypoxie-induzierter PH senken kann. Zudem reduzierte FR sowohl unter normoxischen Bedingungen als auch nach Ausbildung einer Hypoxie-induzierten PH den Anstieg des RVSP durch 5-HT *in vivo*.

3.6 Prävention der PH durch FR im Mausmodell

Nachdem wir zeigen konnten, dass FR eine akute Reduktion des RVSP und somit des pulmonal-arteriellen Blutdrucks in Tieren mit Hypoxie-induzierter PH *in vivo* induziert, wollten wir im nächsten Schritt die Wirksamkeit von FR bei der Prävention der Hypoxie-induzierten PH im Mausmodell überprüfen. Zur Induktion der Hypoxie-induzierten PH wurden die Mäuse wieder für drei Wochen bei 10 % O_2 gehalten. Während dieser Zeit erfolgte die repetitive Applikation von FR entweder systemisch durch i.p. Applikation oder lokal i.t.. Zur Analyse wurden die typischen krankheitsbedingten Veränderungen des RVSP, das Gefäßwandremodeling und die Rechtsherzhypertrophie quantifiziert (Stenmark *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2003).

Für die Untersuchung eines potenziell protektiven Effekts von FR auf die Entstehung der Hypoxie-induzierten PH wurde FR ($10 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{l}$ in 0,9 % NaCl) bzw. das Lösungsmittel DMSO über drei Wochen täglich von Montag bis Freitag i.p. verabreicht (Annala *et al.*, 2019). Als Kontrolle wurde FR entsprechend dieses Protokolls auch Normoxie-Tieren appliziert. Zur Analyse diente zunächst eine hämodynamische Kathetermessung, im Anschluss wurden die

Lunge und das Herz entnommen und für histologische und immunhistochemische Analysen verwendet.

In den Normoxie-Kontrolltieren zeigte FR keinen Effekt auf den RVSP (DMSO-Nx: $22,1 \pm 0,2$ mmHg (n=8) vs. FR-Nx: $21,6 \pm 0,3$ mmHg, n=7, $p>0,05$). Die chronische Hypoxie-Exposition führte, wie erwartet, in den DMSO-behandelten Tieren zu einem Anstieg des RVSP (DMSO-Hx: $31,8 \pm 0,8$ mmHg (n=10) vs. DMSO-Nx, $p<0,001$). Dieser Anstieg konnte durch die Applikation von FR stark vermindert werden (FR-Hx: $24,9 \pm 0,4$ mmHg (n=10) vs. DMSO-Hx, $p<0,001$, Abb. 23A). Der linksventrikuläre systolische Druck (LVSP) wurde durch FR sowohl in den Normoxie- als auch in Hypoxie-Tieren etwas reduziert (DMSO-Nx: $81,9 \pm 0,8$ mmHg vs. FR-Nx: $70,3 \pm 1,0$ mmHg, $p<0,001$, FR-Hx: $73,6 \pm 1,5$ mmHg vs. DMSO-Hx: $80,5 \pm 1,8$ mmHg, $p<0,05$), wobei die Haltung der Tiere unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie allein keinen Effekt auf den LVSP zeigte (DMSO-Hx vs. DMSO-Nx, $p>0,05$). Die Herzfrequenzen waren in allen Versuchsgruppen vergleichbar (DMSO-Nx: $511,8 \pm 18,2$ 1/min vs. DMSO-Hx: $458,6 \pm 9,6$ 1/min vs. FR-Nx: $470,6 \pm 12,9$ 1/min vs. FR-Hx: $447,6 \pm 12,9$ 1/min, $p>0,05$, Abb. 23B). Zur Untersuchung der pulmonal-arteriellen Gefäßwanddicke wurden Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen von Lungenschnitten angefertigt und die relative Wanddicke der Arterien, die parallel zu den Bronchien verlaufen, ausgemessen. Die Gefäßwanddicke der pulmonalen Arterien wurde durch FR in den Normoxie-Kontrolltieren nicht beeinflusst (DMSO-Nx: $13,0 \pm 0,2$ % vs. FR-Nx: $12,9 \pm 0,2$ %, $p>0,05$). Wie erwartet, erhöhte sie sich durch die Entstehung der Hypoxie-induzierten PH (DMSO-Hx: $19,5 \pm 1,3$ % vs. DMSO-Nx, $p<0,001$). Die Applikation von FR reduzierte diese Verdickung deutlich (FR-Hx: $14,7 \pm 0,3$ % vs. DMSO-Hx, $p<0,001$, Abb. 23C-G). Zur Untersuchung des Effektes von FR auf die Rechtsherzhypertrophie wurden *Wheat germ agglutinin* (WGA)-Färbungen von Herzschnitten zur Markierung der Zellmembranen angefertigt und die Fläche der Kardiomyozyten des rechten Ventrikels ausgemessen. Unter normoxischen Bedingungen wurde die Kardiomyozyten-Fläche durch die Applikation von FR nicht verändert (DMSO-Nx: $212,9 \pm 2,1$ μm^2 vs. FR-Nx: $210,4 \pm 2,1$ μm^2). Die Entwicklung der Hypoxie-induzierten PH führt typischerweise zu einer Vergrößerung der Kardiomyozyten-Fläche im rechten Ventrikel, welche auch in unseren Experimenten gemessen werden konnte (DMSO-Hx: $287,3 \pm 3,9$ μm^2 vs. DMSO-Nx, $p<0,001$). Auch diesen Effekt konnte FR positiv beeinflussen. Die Gabe von FR reduzierte den Anstieg der Kardiomyozyten-Fläche bei Hypoxie-induzierter PH deutlich (FR-Hx: $251,3 \pm 3,3$ μm^2 vs. DMSO-Hx, $p<0,001$, Abb. 26H-J). Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die chronische Applikation von FR sowohl den Anstieg des RVSP, die pulmonalen Gefäßwandverdickung als auch die Rechtsherzhypertrophie und somit alle Hauptmerkmale einer PH effektiv reduzieren kann.

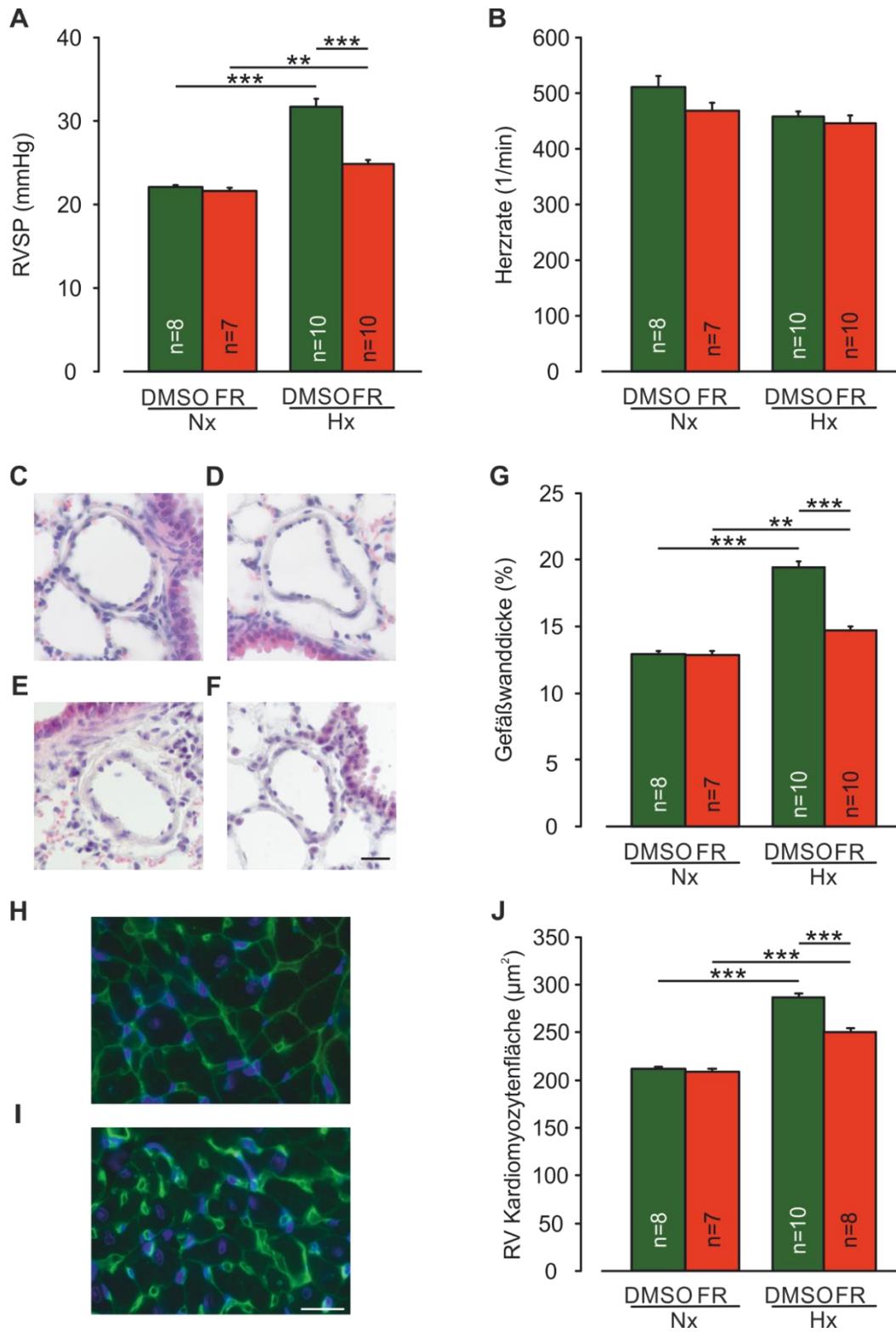


Abb. 23: FR inhibiert die Entstehung der Hypoxie-induzierten PH nach i.p. Applikation. (A, B) Statistische Analyse des RVSP (A) und der Herzfrequenz (B) nach dreiwöchiger Haltung bei 21% O₂ (Nx) bzw. 10 % O₂ (Hx) in Hypoxie-Kammern und täglicher i.p. Applikation (Montag-Freitag) von DMSO oder 10 µg FR. (C, D, E, F, G) HE-Färbungen Bronchus-naher Arterien nach Behandlung mit DMSO-Nx (C), FR-Nx (D) DMSO-Hx (E) und FR-Hx (F, Maßstabsbalken: 20 µM) sowie statistische Analyse der Gefäßwanddicke (G). (H, I, J) WGA-Färbung von Herzschnitten des rechten Ventrikels nach Behandlung mit DMSO-Hx (H) oder FR-Hx (I, Maßstabsbalken: 20 µM) sowie statistische Analyse der RV-Kardiomyozyten-Fläche (J), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ANOVA, Post-hoc-Test: Tukey.

Aufgrund des vorhandenen, wenn auch geringen Effekts von FR auf den systemischen Blutdruck sollte als nächstes untersucht werden, ob eine lokale i.t.-Applikation direkt in die Lunge möglicherweise vorteilhaft gegenüber einer systemischen i.p.-Applikation ist, so dass der Blutdruck unverändert bleibt. Dazu wurde FR (2,5 µg, 50 µl in 0,9 % NaCl) während der dreiwöchigen Versuchsdauer zweimal täglich im Abstand von 12 Stunden i.t. direkt in die Lunge verabreicht. Zur Analyse wurde wiederum eine hämodynamische Messung mittels Katheter durchgeführt und im Anschluss die Lunge und das Herz entnommen und für histologische und immunhistochemische Analysen verwendet.

Auch die chronische lokale i.t. Applikation von FR während der Ausbildung der Hypoxie-induzierten PH führte zu einer signifikanten Verminderung des RVSP im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO-Hx i.t.: 31,2 ± 0,4 mmHg, n=10, vs. FR-Hx i.t.: 27,6 ± 0,6 mmHg, n=10, p<0,001, Abb. 24A). Im systemischen Blutkreislauf kam es jedoch, ähnlich wie bei der i.p.-Applikation, zu einer Reduzierung des LVSP (DMSO-Hx i.t.: 77,9 ± 0,9 mmHg vs. FR-Hx i.t.: 66,6 ± 0,9 mmHg, p<0,001). Die Herzfrequenz wies keine relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf (DMSO-Hx i.t.: 448,7 ± 9,0 1/min vs. FR-Hx i.t.: 416,2 ± 13,8 1/min p>0,05, Abb. 24B). Die Auswertung der Gefäßwanddicke Bronchus-naher arterieller Gefäße zeigte wieder deutlich, dass diese durch FR signifikant verringert werden konnte (DMSO-Hx i.t.: 19,3 ± 1,4 % vs. FR-Hx i.t.: 14,9 ± 1,3 %, p<0,001, Abb. 24C-E).

Die Ergebnisse demonstrieren, dass eine i.t.-Applikation von FR grundsätzlich möglich ist. Ähnlich wie bei der i.p.-Applikation reduzierte FR die Hypoxie-induzierte Erhöhung des RVSP sowie das Gefäßwandremodeling. Allerdings zeigte die lokale i.t.-Applikation aufgrund der ebenfalls vorhandenen systemischen Blutdrucksenkung keinen Vorteil gegenüber der i.p.-Applikation.

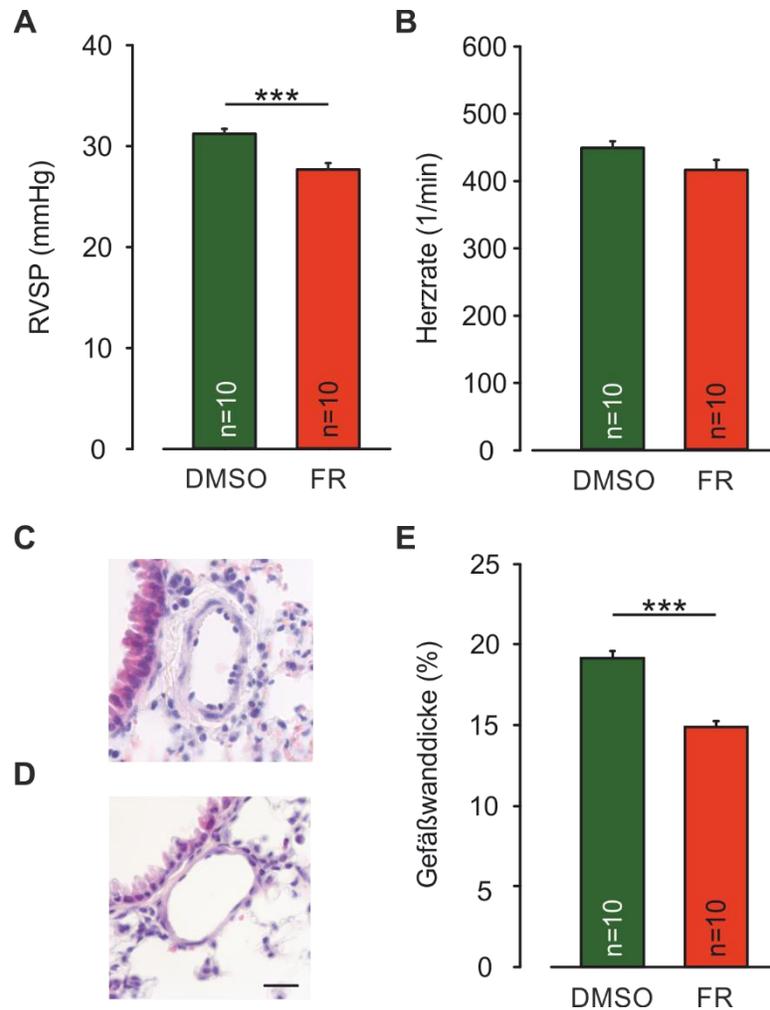


Abb. 24: FR inhibiert die Entstehung der Hypoxie-induzierten PH nach lokaler i.t. Applikation. (A, B) Statistische Analyse des RVSP (A) und der Herzfrequenz (B) nach dreiwöchiger Haltung bei 10 % O₂ in Hx-Kammern bei zweimal täglicher i.t. Applikation von DMSO oder 2,5 µg FR. (C, D, E) HE-Färbungen von Bronchus-nahen Arterien nach Behandlung mit DMSO-Hx (C) und FR-Hx (D, Maßstabsbalken: 20 µM) sowie statistische Analyse der Gefäßwanddicke (E), *p<0,001, ungepaarter T-Test.**

3.7 Behandlung der PH im Mausmodell mit FR

Aufgrund der bei Diagnose der PAH normalerweise bereits bestehenden Erkrankung ist es wichtig, nicht nur die präventive Wirkung, sondern auch die therapeutische Relevanz eines Wirkstoffs zu untersuchen. Dazu wurden die Versuchstiere über 5 Wochen bei 10 % O₂ gehalten. FR (10 µg, 100 µl in 0,9 % NaCl) bzw. DMSO wurden nur in den letzten beiden Wochen, also nach vollständiger Entwicklung der Hypoxie-induzierten PH, verabreicht. Aufgrund der einfacheren Handhabung bei gleichwertigen Effekten wurde für den Versuch zur Behandlung der Hypoxie-induzierten PH wieder auf die i.p.-Applikation zurückgegriffen.

Im Anschluss an die 5 Wochen Hypoxie-Exposition inklusive zweiwöchiger Behandlungsphase mit FR wurden zunächst die hämodynamischen Parameter mittels eines Rechtsherzkatheters bestimmt. Die Behandlung mit FR reduzierte den RVSP deutlich im Vergleich zur Kontrollgruppe, die an Stelle von FR das Lösungsmittel DMSO erhalten hatte (DMSO: $29,1 \pm 0,5$ mmHg, $n=9$, vs. FR $24,5 \pm 0,5$ mmHg, $n=9$, $p<0,001$, Abb. 25A). Der LVSP wurde durch die Applikation von FR ebenfalls gesenkt (DMSO: $82,1 \pm 1,5$ mmHg vs. FR $71,9 \pm 1,3$ mmHg, $p<0,001$), wohingegen die Herzfrequenz in beiden Gruppen ähnlich war (DMSO: $454,3 \pm 9,6$ 1/min vs. FR $470 \pm 7,9$ 1/min, $p>0,05$, Abb. 25B). Nach der Kathetermessung wurden die Lungen für histologische HE-Färbungen aufgearbeitet.

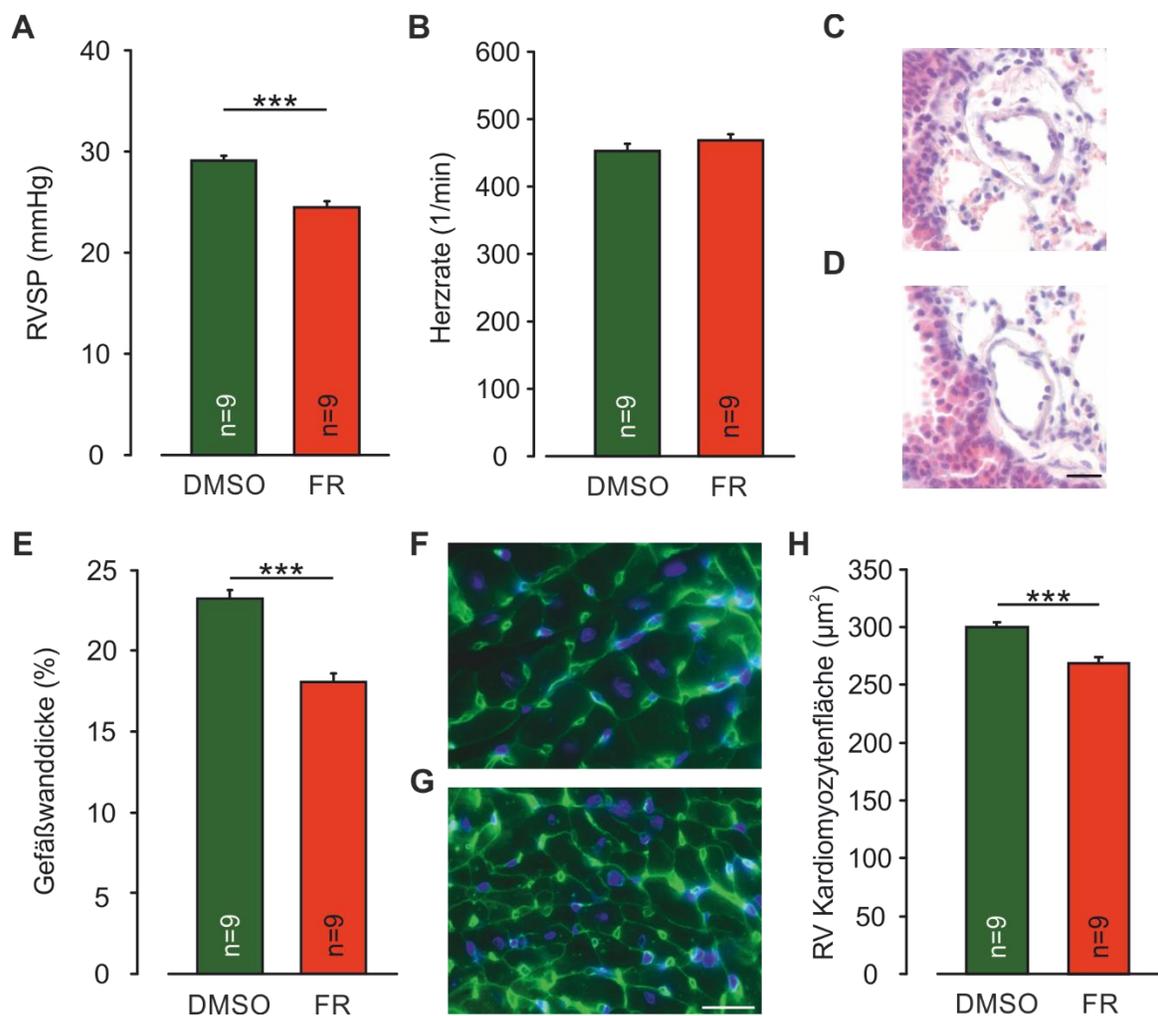


Abb. 25: FR revertiert eine Hypoxie-induzierte PH. (A, B, C) Statistische Analyse des RVSP (A) und der Herzfrequenz (B) nach zweiwöchiger Behandlung einer Hypoxie-induzierten PH mittels täglicher Applikation (Montag-Freitag) von DMSO oder 10 µg FR. (C, D, E) HE-Färbungen Bronchus-naher Arterien nach Behandlung mit DMSO (C) oder FR (D, Maßstabsbalken: 20 µM) sowie statistische Analyse der Gefäßwanddicke (E). (F, G, H) WGA-Färbung des rechten Ventrikels nach Behandlung mit DMSO (F) oder FR (G, Maßstabsbalken: 20 µM) sowie statistische Analyse der RV-Kardiomyozytenfläche (H), *** $p<0,001$, ungepaarter T-Test.

Die Messung der Gefäßwanddicke zeigte, dass eine therapeutische Gabe von FR diese stark reduzieren konnte (DMSO: $23,3 \pm 0,5$ % vs. FR $18,0 \pm 0,5$ %, $p < 0,001$, Abb. 25C-E). Zur Beurteilung der Kardiomyozyten-Fläche wurden WGA-Färbungen von transversalen Herzschnitten des rechten Ventrikels angefertigt. Die Auswertung ergab, dass FR die Kardiomyozyten-Fläche, die einen Marker für die Rechtsherzhypertrophie darstellt, signifikant verringerte (DMSO: $302,4 \pm 4,2$ μm^2 vs. FR: $270,5 \pm 4,7$ μm^2 , $p < 0,001$, Abb. 25F-H).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Gabe von FR nicht nur die Entstehung einer Hypoxie-induzierten PH verhindern kann, sondern dass FR auch nach Ausbildung aller pathophysiologischen Merkmale einen starken therapeutischen Effekt aufweist. Alle Hauptcharakteristika einer PAH, der erhöhte rechtsventrikuläre Druck, die pulmonale Gefäßwandverdickung sowie die Rechtsherzhypertrophie konnten durch FR signifikant reduziert werden. Dies weist darauf hin, dass Gq-Proteine essenzielle Signalmoleküle bei der Entstehung einer Hypoxie-induzierten PH darstellen und ihre Hemmung sich als vielversprechende therapeutische Option erweisen könnte.

4. Diskussion

Das Depsipeptid FR ist ein spezifischer pharmakologischer pan-Gq-Protein-Inhibitor aus der Pflanze *Ardisia crenata* (Patt *et al.*, 2021; Pfeil *et al.*, 2020; Schrage *et al.*, 2015). Gq-Proteine werden in einer Vielzahl von Geweben wie Lunge, Herz, Niere und Gehirn exprimiert (Kamoto *et al.*, 2017). Eine besondere Bedeutung kommt Gq-Proteinen in glatten Muskelzellen zu, da typische Vasokonstriktoren wie 5-HT, ET-1, Angiotensin II, Phenylephrin und TxA ihre konstriktorische Wirkung vor allem über eine Aktivierung von Gq-Proteinen und nachfolgendem Ca²⁺-Anstieg induzieren (Wettschureck & Offermanns, 2005). Gq-Proteine sind damit entscheidend für die Entstehung des Bluthochdrucks der Lunge, der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH). Die aktuellen pharmakologischen Therapien gegen PAH basieren auf der Modulation einzelner GPCRs mit dem Ziel der Vasorelaxation. Ihre Wirkung ist vor allem aufgrund der Beteiligung von unterschiedlichen Gq-gekoppelten Rezeptoren bei der PAH jedoch begrenzt. FR agiert unabhängig von Rezeptoren auf G-Protein-Ebene und inhibiert somit das Gq-Signaling sämtlicher Gq-abhängiger GPCRs. Deswegen könnte FR im Vergleich mit GPCR (Ant)agonisten eine bessere therapeutische Wirkung erzielen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von FR im pulmonalen Gefäßsystem *ex* und *in vivo*, im gesunden Gewebe und bei Hypoxie-induzierter PH charakterisiert.

4.1 FR als potenter Wirkstoff für die Demaskierung des Gq-Signaling bei pulmonalen Kontraktionsmechanismen

Viele wichtige pulmonale Vasokonstriktoren (z.B. 5-HT, ET-1 oder TxA) vermitteln ihren Effekt über GPCRs. Daran sind meist verschiedene G-Proteine beteiligt. So wirken vorwiegend G-Proteine der Gq- und G12/13-Familie, aber auch diejenigen der Gi-Familie, konstriktorisch auf die Gefäße (Strassheim *et al.*, 2018). Bisher konnte eine Beteiligung der jeweiligen G-Proteine nur durch einen genetischen Knockout bestimmt werden, da pharmakologische G-Protein-Inhibitoren, abgesehen von dem Gi-Inhibitor PTX, nicht zur Verfügung standen. Somit haben wir den neuen pharmakologischen Gq-Inhibitor FR zunächst genutzt, um den Beitrag von Gq bei der pulmonalen Vasokonstriktion durch verschiedene Agonisten bzw. Stimuli zu bestimmen.

4.1.1 Beteiligung von Gq-Proteinen an der Kontraktion von verschiedenen pathologisch relevanten Vasokonstriktoren

In unseren Experimenten mit 5-HT-induzierter Vasokonstriktion in PAs konnte FR ähnlich wie der 5-HT_{2A/2C}-Blocker Ketanserin die 5-HT-induzierte Kontraktion komplett verhindern. Dies illustriert, dass die 5-HT-induzierte Kontraktion in den großen PAs der Maus ausschließlich durch den 5-HT_{2A/2C}-Rezeptor und Gq-Proteine vermittelt wird, was bereits in einer früheren Studie aufgezeigt wurde (MacLean *et al.*, 1994; Pithadia & Jain, 2009). Dazu passend wurde auch durch Verwendung des ROCK-Inhibitors Y-27632 gezeigt, dass in PAs von Rindern die 5-HT-induzierte Kontraktion unabhängig von G12/13-ROCK-Signaling ist (Alapati *et al.*, 2007). Ebenfalls konnte in Aorten von Mäusen mit einem G α_{12} /G α_{13} -Knockout in glatten Muskelzellen gezeigt werden, dass sich die 5-HT-vermittelte Kontraktion nicht von der in Wildtyp-Tieren unterschied, so dass eine Beteiligung von G12/13 bei der 5-HT-abhängigen Kontraktion ausgeschlossen werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde in G α_q /G α_{11} -Knockout Mäusen die 5-HT-induzierte Kontraktion in Aorten stark reduziert (Wirth *et al.*, 2008), was den entscheidenden Beitrag von Gq unterstreicht. Die U-46619-induzierte Kontraktion wurde in unseren Experimenten durch die Kombination von Gq- und ROCK-Inhibition komplett aufgehoben. Eine Beteiligung von ROCK an der U-46619-induzierten Kontraktion wurde bereits in PAs von Ratten (McKenzie *et al.*, 2009) und Rindern (Alapati *et al.*, 2007) gefunden. Die Applikation des TxA-Rezeptor-Antagonisten SQ führte in unseren Experimenten zu einer Rechtsverschiebung der U-46619-DWK. Diese Wirkung wurde beispielsweise auch in Mesenterialarterien der Maus gezeigt. Dies deutet auf ähnliches TxA-Signaling auf Rezeptorebene in systemischen und pulmonalen Gefäßen der Maus hin (Siangjong *et al.*, 2013). Ebenfalls ähnlich in systemischen und pulmonalen Arterien ist die G-Protein-Aktivierung durch den TxA Rezeptor. Wirth *et al.* demonstrierten sowohl in Maus-Aorten von glatte Muskel-spezifischen G α_q /G α_{11} - als auch in G α_{12} /G α_{13} -Knockout-Tieren eine Reduktion der U-46619-induzierten Kontraktion, wobei der Effekt in den G α_q /G α_{11} -SMC-Knockout-Tieren stärker ausfiel (Wirth *et al.*, 2008). Eine stärkere Gq-Komponente zeigte sich auch in unseren Experimenten, da FR das Kontraktionsmaximum der U-46619-induzierten DWK um 80% reduzierte. Die zusätzliche Vorinkubation mit Y-27632 führte in unseren Versuchen zu einer vollständigen Inhibition der U-46619-vermittelten Kontraktion, was eine Kopplung des TxA-Rezeptors mit Gq- und G12/13-Proteinen nahelegt. Die Vermittlung des TxA-Signals sowohl über Gq als auch G12/13 wurde auch in humanen Thrombozyten gezeigt (Offermanns *et al.*, 1994) und ist grundsätzlich für verschiedene Rezeptoren bekannt (Riobo & Manning, 2005; Wettschureck & Offermanns, 2005). Hauser *et al.* publizierten, dass 73 % der untersuchten G12/13-

gekoppelten Rezeptoren ebenfalls Gq-Proteine aktivieren (Hauser *et al.*, 2022). Für die ET-1-induzierte pulmonale Vasokonstriktion in der Maus konnten wir ebenfalls nachweisen, dass sie ausschließlich über Gq- und wahrscheinlich G12/13-Proteine vermittelt wird. Gi spielte für die Kontraktion hier keine Rolle. Dies steht im Einklang mit der Studie von Gohla *et al.*. Sie zeigten in aortalen SMC aus Rindern, dass eine Vorinkubation mit PTX die ET-1-induzierte Phosphorylierung von MLC₂₀ nicht verändert, während der ROCK-Inhibitor Y-27632 eine Reduktion der Phosphorylierung bewirkte, was auf eine Kontraktionshemmung hindeutet (Gohla *et al.*, 2000). Auch in Studien, die in der Arteria basilaris von Kaninchen (Miao *et al.*, 2002) oder der PA der Ratte (Barman, 2007) durchgeführt wurden, konnte deutlich gemacht werden, dass Y-27632 die ET-1-induzierte Kontraktion vermindert. Für eine Beteiligung von Gq und G12/13 spricht zudem, dass sowohl in Aorten von Mäusen mit einem glatten Muskel spezifischen $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ - als auch $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -Knockout, die ET-1-induzierte Kontraktion reduziert war, wobei der $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -Knockout eine stärkere Reduktion der Kontraktion bewirkte (Wirth *et al.*, 2008). Diese stärkere Reduktion wurde auch in unseren Experimenten durch pharmakologische Gq-Inhibition erzielt. Die Inkubation mit dem ET_{A/B}-Antagonisten Bosentan führte in den isometrischen Kraftmessungen zu einer Rechtsverschiebung der DWK, was mit Ergebnissen aus PAs, Mesenterialarterien und Schwanzarterien der Ratte übereinstimmt (Angus *et al.*, 2017). Der Vergleich der prozentualen Beiträge von Gq und G12/13 bei der Kontraktion durch ET-1 und U-46619 zeigt, dass diese unterschiedlich und somit Rezeptorspezifisch sind (Hauser *et al.*, 2022).

Mit FR konnten wir in unseren Experimenten erstmals das Ausmaß der Beteiligung von Gq am intrazellulären Signaling durch GPCR-Agonisten in PAs ermitteln. Die 5-HT-, U-46619- und ET-1-induzierten Kontraktionen werden hauptsächlich von Gq- und, je nach Rezeptor, zusätzlich von G12/13-Proteinen vermittelt. Eine Aktivierung von Gi-Proteinen, welche kontraktionsunabhängige Prozesse anstoßen oder deren Beitrag zur Kontraktion nur sehr gering sind, kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden. Daneben publizierten Pfeil *et al.* und Patt *et al.* erst kürzlich, dass aktive Gq-Proteine für die Aktivierung der PLC β durch PTX-sensitive Gi- $\beta\gamma$ -Untereinheiten benötigt werden, da Gq für die Auflösung der Autoinhibition der PLC β verantwortlich ist (Patt *et al.*, 2021; Pfeil *et al.*, 2020). Die pharmakologische Hemmung der Gq-Proteine durch FR in unseren Experimenten, aber auch die genetische Deletion der Gq-Proteine (Wirth *et al.*, 2008), könnte somit die Beteiligung von Gi- $\beta\gamma$ -Untereinheiten überdecken. Zukünftige Studien mit neuen pharmakologischen Werkzeugen könnten helfen die Rolle und Funktion von verschiedenen $\beta\gamma$ -Untereinheiten beim G-Protein-Signaling in PAs aufzuzeigen.

4.1.2 Potenzielle Beteiligung von Gq-Proteinen an der akuten Phase der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion

Neben dem Einsatz von FR zur Untersuchung der Beteiligung von Gq an der pulmonalen Vasokonstriktion durch GPCR-Agonisten, haben wir FR auch verwendet, um einen möglichen Beitrag von Gq bei der Entstehung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) zu testen. An der Entstehung der HPV sind viele verschiedene Moleküle wie L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, nicht-selektive Kationenkanäle, Kalium-Kanäle, Rho-Kinasen und reaktive Sauerstoffspezies beteiligt (Sommer *et al.*, 2008). Zudem wurde publiziert, dass der PLC-DAG-Signalweg eine Rolle spielt. Dieser aktiviert den *transient receptor potential channel 6* (TRPC6), wodurch ein Ca^{2+} -Einstrom und eine Kontraktion ermöglicht wird (Fuchs *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2020; Tabeling *et al.*, 2015). Der exakte Gesamtmechanismus ist aber noch nicht vollständig entschlüsselt. Durch die Beteiligung von PLC und DAG wäre ein Beitrag von Gq an der HPV denkbar. In unseren Experimenten konnte FR die HPV jedoch nicht beeinflussen. Dabei haben wir jedoch nur die initiale Phase untersucht. Die HPV zeichnet sich üblicherweise durch zwei Phasen aus. In der initialen Phase kommt es zu einem schnellen Anstieg des pulmonal-arteriellen Drucks (PAP), welcher im Anschluss wieder absinkt. In der sich anschließenden zweiten Phase erfolgt eine weitere allmähliche, lang anhaltende Konstriktion mit Anstieg des PAP (Jin *et al.*, 1992; Sylvester *et al.*, 2012). Eine eventuelle Beteiligung von Gq an der zweiten Phase der HPV müsste in zukünftigen Studien genauer untersucht werden.

4.2 Vergleich von FR mit aktuellen PAH-Medikamenten

Die PAH ist eine schwerwiegende Erkrankung, die durch einen erhöhten PAP und Gefäßremodeling gekennzeichnet ist. Bei der Behandlung der PAH kommen verschiedene Medikamentenklassen zum Einsatz, die hauptsächlich die Vasorelaxation fördern sollen. Diese greifen vornehmlich in den ET-1-, den Prostazyklin- oder den NO-Signalweg ein. Insbesondere werden ET-1-Rezeptor-Antagonisten, Prostazyklin-Analoga und PDE-Hemmer bzw. sGC-Stimulatoren verwendet (Lau *et al.*, 2017).

4.2.1 Vergleich der FR-induzierten Relaxation *ex vivo*

Bei unserem Vergleich der pulmonalen Relaxationen durch FR mit denjenigen des ET-1-Rezeptorantagonisten Bosentan, des Prostazyklin-Analogons Iloprost sowie des PDE5-Inhibitors Sildenafil erwies sich die Gq-Inhibition mittels FR nach Vorkontraktion durch ET-1 im Myographen bei vergleichbarer Konzentration als überlegen. Insbesondere die geringe

relaxierende Wirkung von Bosentan war dabei überraschend, da mit dem entsprechenden Agonisten ET-1 vorkontrahiert wurde und Bosentan eine sehr starke Rechtsverschiebung der ET-1-DWK bewirkte. Mey *et al.* beschreiben ET-1 als quasi-irreversiblen Agonisten am ET_A-Rezeptor (Mey *et al.*, 2009). ET-1 bindet dabei initial an eine dynamische und im zweiten Schritt an eine quasi-irreversible Bindungsstelle, wodurch die vollständige Agonisten-Wirkung erreicht wird. Antagonisten wie Bosentan konkurrieren somit mit ET-1 nur um die dynamische Bindungsstelle. Nach ET-1-Bindung an beide Bindungsstellen können Antagonisten lediglich die Bindung von ET-1 an die dynamische Bindungsstelle aufheben. Somit ist die Wirkung des Antagonisten nach ET-1-Gabe begrenzt (Meens *et al.*, 2010; Mey *et al.*, 2009). Dieses Konzept könnte auch die geringe Effektivität von Bosentan nach ET-1-Kontraktion im Myographen erklären. Bei Gabe von Bosentan vor ET-1 konkurriert es als kompetitiver Antagonist um die dynamische Bindungsstelle mit ET-1, was die ET-1 Wirkung deutlich reduziert. Bei Applikation von Bosentan nach ET-1 ist dieses bereits quasi-irreversibel gebunden und die Wirkung von Bosentan stark begrenzt. Da FR als GDP-Austausch-Inhibitor direkt am G-Protein wirkt (Schrage *et al.*, 2015), agiert es unabhängig von den Vorgängen am Rezeptor und kann dadurch eine stärkere Wirkung erzielen. Neben Bosentan wurde der Effekt von FR in dieser Arbeit auch mit dem des Prostazyklin-Analogs Iloprost (10 µM) verglichen. Iloprost erreichte in unseren isometrischen Kraftmessungen in den PAs der Maus nach ET-1-Vorkontraktion eine maximale Relaxation von nur ca. 30 %. Für das Ausmaß der pulmonalen Vasorelaxation durch Iloprost ist eine starke Abhängigkeit von der Spezies beschrieben worden. Nach ET-1 Vorkontraktion bewirkte Iloprost in humanen PAs eine maximale Relaxation von 90 %, wohingegen in Ratten-PAs bei gleicher Dosierung keine Relaxation gemessen werden konnte (Benyahia *et al.*, 2015). Andere Untersuchungen zeigten, dass auch der für die Vorkontraktion verwendete Konstriktor Einfluss auf die Relaxationswirkung von Iloprost haben kann. Jain *et al.* publizierten nach U-46619 Kontraktion eine Relaxation durch 10 µM Iloprost von 40 % in intrapulmonalen Arterien der Maus, wobei die Relaxation durch Erhöhung der Konzentration auf 30 µM nicht mehr gesteigert werden konnte (Jain *et al.*, 2014). In Ratten-PAs betrug die Wirkung von 10 µM Iloprost nach U-46619-Stimulation 50 % (Benyahia *et al.*, 2015; Orie *et al.*, 2013) bzw. 65 % (Y. Li *et al.*, 2012) und in humanen PAs 55 % (Benyahia *et al.*, 2015). Insgesamt reihen sich unsere Ergebnisse zu Iloprost gut in die bestehende Literatur ein. Es wird allerdings auch ersichtlich, dass, zumindest in Nagetieren, eine Gq-Inhibition eine stärkere Relaxation als Iloprost auslöst. Das könnte für eine Behandlung einer PAH vorteilhaft sein. Für eine genauere Vorhersage müsste FR in humanen PAs untersucht werden, da eine Übertragung der Iloprost-Effekte auf den Menschen aufgrund der variablen Ergebnisse in

verschiedenen Spezies nur schwer möglich ist. Auch der PDE5-Inhibitor Sildenafil (10 μ M) induzierte im Vergleich zu einer Gq-Inhibition durch FR nach ET-1-Vorkontraktion im Myographen eine deutlich geringere maximale Relaxation von nur ca. 40 %. Andere Veröffentlichungen publizierten ein ähnliches Ausmaß von Sildenafil-induzierten Relaxationen: z.B. konnte eine Relaxation von 40 % nach U-46619-Stimulation in Ratten-PAs (Andersen *et al.*, 2005) gemessen werden oder 50 % in Ratten-PAs bzw. 40 % in humanen PAs nach 5-HT-, ET-1-, U-46619-Mix-Stimulation (Chamorro *et al.*, 2018) sowie 40 % in PAs von Patienten*innen mit idiopathischer pulmonaler Fibrose nach 5-HT-Stimulation (Milara *et al.*, 2016). Die genannten Studien demonstrieren eine begrenzte Wirkung von Sildenafil in pulmonalen Gefäßen *ex vivo*. Im Vergleich zu den oben genannten Untersuchungen in PAs, zeigten Teixeira *et al.* in Aorten von Ratten bei Verwendung ähnlicher Sildenafil Konzentrationen eine 95 %ige Relaxation (Teixeira *et al.*, 2006) wie auch Goulopoulou *et al.* in Mesenterialarterien (Goulopoulou *et al.*, 2015), was auf eine grundsätzlich stärkere Wirkung von Sildenafil in systemischen Gefäßen hindeuten könnte.

Unabhängig von dem vorab gegebenen Medikament führte eine zusätzliche Gq-Inhibition am Ende unserer Messungen zu einer deutlichen Steigerung der Relaxation auf über 70%, was die überlegene und starke vasorelaxierende Wirkung von FR verdeutlicht. Eine besonders effektive Relaxation nach Vorkontraktion durch die o.g. Konstriktoren ist insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen erforderlich. Bei der PAH im Menschen konnte diesbezüglich ermittelt werden, dass 5-HT (Eddahibi *et al.*, 2006; Hervé *et al.*, 1995), ET-1 (Giaid *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 1991) und TxA-Metabolite (Christman *et al.*, 1992; Tuder *et al.*, 1999) in erhöhter Konzentration im Plasma vorliegen. Des Weiteren lösten vergleichbare Konzentrationen dieser Vasokonstriktoren eine stärkere pulmonale Kontraktion im Tiermodell der PAH als in gesunden Tieren aus (H. Li *et al.*, 1994; MacLean *et al.*, 1996; Wan *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2020). Insgesamt kommt es bei der PAH zu einem starken Ungleichgewicht von vasorelaxierenden und vasokontrahierenden Substanzen (Iyinkkel & Murray, 2018; Lai *et al.*, 2014), was die Bedeutung von starken Vasodilatoren für die Behandlung der PAH hervorhebt. Da die FR-Wirkung nicht nur auf einen einzelnen kontraktionsvermittelten Rezeptor beschränkt ist, sondern unabhängig vom Rezeptor auf G-Protein-Ebene eingreift, könnte FR bei der PAH *in vivo*, bei der verschiedene vasokonstringierende Agonisten aktiv sind, einen stärkeren Effekt als die derzeitig eingesetzten Medikamente erzielen.

4.2.2 Vergleich der FR-induzierten Verminderung des Zellwachstums *in vitro*

Neben dem vasodilatierenden Effekt von FR konnten wir zeigen, dass eine Gq-Inhibition auch das Wachstum von hPASMC reduziert. Zur Stimulation des Wachstums haben wir eine Kombination von PDGF und Thrombin verwendet, da beide Mediatoren an der Pathophysiologie der PAH beteiligt sind (BelAiba *et al.*, 2006; Perros *et al.*, 2008; Schermuly *et al.*, 2005). FR reduzierte in unserem Wachstumsversuch den Anteil an proliferierenden Ki 67-positiven Zellen. In einer Vielzahl von Studien, welche jedoch hauptsächlich in glatten Muskelzellen aus den Atemwegen durchgeführt wurden, konnte eine Gq-Abhängigkeit der Proliferation von glatten Muskelzellen demonstriert werden (Billington & Penn, 2003; Inagami & Eguchi, 2000; Iyinkkel & Murray, 2018; Kong *et al.*, 2006; Lambers *et al.*, 2013; Moolenaar, 1991; Schreier *et al.*, 2011). So wurde beispielsweise in glatten Muskelzellen (SMC) aus den Atemwegen gezeigt, dass eine Kombination von Wachstumsfaktoren und Gq-Protein-Signaling für den kooperativen mitogenen Effekt verantwortlich ist (Gosens *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde publiziert, dass FR das Wachstum von EGF- und Thrombin-behandelten SMC aus den Atemwegen hemmt (Carr *et al.*, 2016). Daneben deuteten auch erste Untersuchungen an PASMC aus der Ratte bereits eine Beteiligung von Gq-Proteinen am Zellwachstum an. Dabei wurde das Angiotensin-II-induzierte Zellwachstum durch Gq-Inhibition mittels des Peptid-basierten kompetitiven G-Protein-Antagonisten 2A (GP-2A) reduziert (Tanski *et al.*, 2004), wobei sowohl der genaue Wirkmechanismus, die Stabilität und Permeabilität als auch die Spezifität von GP-2A gegenüber allen anderen G-Proteinen noch untersucht werden muss (H. Zhang *et al.*, 2020). Der genaue Mechanismus der Gq-induzierten Reduzierung des Zellwachstums durch FR wurde auch im Rahmen dieser Arbeit nicht detailliert analysiert.

Neben FR führte in unseren Experimenten überraschenderweise auch die Applikation des ET_{A/B}-Rezeptor-Antagonist Bosentan zu einer Reduzierung des PDGF- und Thrombin-stimulierten Wachstums der hPASMC. Es wurde bereits publiziert, dass ET-1 in hPASMC eine Proliferation induzieren kann, welches durch Blockade von ET_A- und/oder ET_B-Rezeptoren gehemmt werden kann (Davie *et al.*, 2002). Zudem ist beschrieben, dass ET-1 die Wirkung von PDGF auf das Zellwachstum in humanen aortalen glatten Muskelzellen (Yang *et al.*, 1999) bzw. die pro-proliferative Wirkung von Serum in hPASMC (Lambers *et al.*, 2013) synergistisch verstärken kann. Da in unseren Experimenten dem Medium kein exogenes ET-1 zugeben wurde, könnte die Wirkung von Bosentan durch eine Stimulation der Produktion und Ausschüttung von ET-1 durch Thrombin und PDGF in hPASMC erklärt werden. Dieser

Mechanismus wurde bereits in aortalen SMC aus der Ratte (Hahn *et al.*, 1990; Kohno *et al.*, 1995) sowie humanen glatten Muskelzellen aus Peritonealgefäßen (Resink *et al.*, 1990) demonstriert. Ebenso konnten Stow *et al.* zeigen, dass die ET-1-Expression durch eine Vielzahl von Faktoren auf Transkriptionsebene reguliert wird. Zu diesen Faktoren gehört auch Thrombin, welches den Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert und dadurch die ET-1-Expression steigert (Stow *et al.*, 2011). Da ET-1 seine Wirkung unter anderem über Gq-Proteine vermittelt (Fukuroda *et al.*, 1994; LaDouceur *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 2007), könnte FR auch in diesem Signalweg eine Wachstums-hemmende Wirkung entfalten.

Das Prostazyklin-Analogon Iloprost reduzierte in unseren Experimenten ebenfalls das Wachstum der hPASMIC. Dieser Wachstums-reduzierende Effekt von Prostazyklin-Analoga wurde bereits in humanen (Wharton *et al.*, 2000) und bovinen (Shirotani *et al.*, 1991) SMC aus der Aorta demonstriert. Als Ursache wurde eine Verhinderung des Übergangs der Zellen von der G₀/G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus postuliert. Die Wirkung wurde zum Teil durch cAMP vermittelt (Shirotani *et al.*, 1991; Wharton *et al.*, 2000). cAMP zeigte einen ähnlichen Effekt in SMC aus Kaninchenaorten (Y. Fukumoto *et al.*, 1988) und ist als anti-proliferierender second messenger in SMC bekannt (Althoff & Offermanns, 2015; S. A. Smith *et al.*, 2019).

Sildenafil verursachte in unserem Wachstumsversuch keine Reduktion des Zellwachstums. Im Gegensatz dazu konnten Tantini *et al.*, zeigen, dass Sildenafil einen anti-proliferierenden Effekt auf hPASMIC ausübt (Tantini *et al.*, 2005). Dabei ist zu beachten, dass in diesem Assay ausschließlich PDGF und kein Thrombin zur Stimulation des Wachstums verwendet wurde, was die unterschiedlichen Effekte erklären könnte. Als PDE5-Inhibitor führt Sildenafil primär zu einer Anreicherung von cGMP (Bischoff, 2004). Für zellemembrangängiges 8-Br-cGMP wurde bereits demonstriert, dass es im Gegensatz zu 8-Br-cAMP das Serum-induzierte Zellwachstum in glatten Muskelpräparaten aus dem Kaninchen nicht inhibieren kann (Southgate & Newby, 1990). S. Fukumoto *et al.* zeigten, dass cGMP das Zellwachstum von glatten Muskelzellen aus der Nabelschnurarterie nach PDGF-Stimulation ausschließlich zeitlich verzögert, während cAMP zusätzlich zu einem Verbleib der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus führt (S. Fukumoto *et al.*, 1999). Die Verzögerung des Zellwachstums durch cGMP war nur über einen Zeitraum von 30 Stunden zu detektieren. Im Anschluss gingen die Zellen von der G₁-Phase in die nachfolgende S-Phase des Zellzyklus über. Diese zeitlich begrenzte Wirkung von cGMP könnte für die Ineffektivität von Sildenafil in unseren Experimenten verantwortlich sein, da wir das Wachstum über mehrere Tage stimuliert haben.

Neben der überlegenen Wirkung gegenüber allen getesteten Substanzen in unseren Kontraktionsstudien, konnte FR auch im Wachstumsassay ähnlich gute Effekte erzielen wie Bosentan und Iloprost. Somit erscheint eine Gq-Hemmung den anderen getesteten Medikamenten in Bezug auf die pathophysiologischen Veränderungen bei der PAH insgesamt überlegen, da FR sowohl der Vasokonstriktion *ex vivo* als auch dem Wachstum von hPASMC *in vitro* effektiv entgegenwirken kann. Daher wollten wir im nächsten Schritt einen potenziellen *in vivo* Effekt von FR auf den pulmonalen Blutdruck *in vivo* untersuchen.

4.2.3 Vergleich der akuten FR-induzierten Effekte auf den RVSP *in vivo*

Unsere *in vivo*-Experimente in gesunden Tieren, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, zeigen, dass die i.t.-Gabe von FR keinen Effekt auf den basalen RVSP ausübt. Bei Tieren mit Hypoxie-induzierter PH reduzierte eine einzelne Dosis FR den basalen RVSP signifikant. Da das pulmonale Blutdrucksystem ein Niederdrucksystem ist, sind die pulmonalen Arterien unter Ruhebedingungen nur schwach tonisiert. Die Gefäße liegen vornehmlich im relaxierten Zustand mit einem druckpassiven Durchblutungsverhalten vor (Brandes *et al.*, 2019). Dies könnte den unveränderten basalen RVSP nach FR-Applikation in Normoxie-Tieren erklären, wohingegen nach pathologischer Erhöhung des RVSPs durch Entwicklung der Hypoxie-induzierten PH ein blutdrucksenkender Effekt gemessen werden konnte. Üblicherweise werden zur Messung von vasodilatativen Effekten im nicht-stimulierten pulmonalen System Vasokonstriktoren nach dem potentiellen Vasorelaxans verabreicht und die folgende Konstriktion quantifiziert (Champion *et al.*, 1999). Unter diesen Bedingungen bewirkte FR in beiden Versuchsgruppen (Normoxie und Hypoxie-induzierte PH) eine Verminderung der folgenden Agonisten-induzierten Blutdrucksteigerung durch 5-HT. Um die Effektstärke von FR einordnen zu können, wurde zusätzlich die Wirkung von Sildenafil in einer ähnlichen Dosierung getestet. Sildenafil wurde verwendet, da es neben FR in den *ex vivo* Experimenten im Myographen den stärksten relaxierenden Effekt auslöste. Zudem wird Sildenafil klinisch bei der Behandlung der PAH eingesetzt (Klinger *et al.*, 2019; Michelakis *et al.*, 2002) und konnte auch im Tiermodell die Hypoxie-induzierte PH verhindern (Hanasato *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001). Sildenafil hatte in unseren Versuchen sowohl in den Normoxie-Tieren als auch in Tieren mit Hypoxie-induzierter PH keinen maßgeblichen Einfluss auf den basalen Blutdruck nach lokaler Applikation. Des Weiteren wurde die 5-HT-induzierte Blutdrucksteigerung in unseren Experimenten nicht durch vorherige Gabe von Sildenafil beeinflusst. Dass Sildenafil eine blutdrucksenkende Wirkung auf das pulmonale System nach i.t.-Gabe haben kann, wurde von Rashid *et al.* in Mäusen mit Hypoxie-induzierter PH gezeigt

(Rashid *et al.*, 2017). Eine i.t.-Applikation von 0,5 mg/kg Sildenafil reduzierte den pulmonalen mittleren Blutdruck nach einer Stunde um ca. 25 %. In der Studie wurde Sildenafil allerdings in einer ca. 4-5-fach höheren Dosis verabreicht als in unseren Experimenten (Rashid *et al.*, 2017). Da FR sowohl den basalen Blutdruck in hypoxischen Tieren als auch die 5-HT-induzierten Blutdrucksteigerung in normoxischen und Tieren mit Hypoxie-induzierter PH senken konnte, ist die Wirkung des Gq-Inhibitors FR gegenüber Sildenafil in ähnlicher Dosierung überlegen.

Die *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* durchgeführten Experimente mit akuter Gabe von FR legen nahe, dass FR auch bei chronischer Applikation im Krankheitsmodell der Hypoxie-induzierten PH positive Wirkungen erzielen könnte.

4.3 Präventiver und therapeutischer Effekt von FR bei der Hypoxie-induzierten PH *in vivo*

Zur Überprüfung der chronischen FR-Wirkung im Krankheitsmodell wurde das Hypoxie-induzierte PH-Modell der Maus verwendet, welches mit einem gesteigertem RVSP, Gefäßremodeling und Rechtsherzhypertrophie einhergeht (Stenmark *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2003). FR konnte in den durchgeführten Versuchen sowohl nach lokaler direkter Applikation in die Lunge (i.t.) als auch nach systemischer Applikation (i.p.) präventive und therapeutische Effekte erzielen. Die i.p.-Applikationsroute erschien vorteilhaft, um die tägliche Anästhesie der Mäuse, die bei i.t.-Gaben notwendig ist, zu vermeiden. Beide Applikationsarten führten zu vergleichbaren Resultaten.

4.3.1 Prävention und Therapie der Hypoxie-induzierten PH in der Maus durch FR

Die chronische Hypoxie-Exposition führte in unseren Experimenten zu dem erwarteten pathologischen Anstieg des RVSP. FR konnte den RVSP im Krankheitsmodell akut signifikant verringern sowie bei repetitiver chronischer Gabe auch verhindern und nach Ausbildung der Hypoxie-induzierten PH revertieren. Zudem haben wir auch eine deutliche Reduzierung der Gefäßwanddicke pulmonal-arterieller Gefäße durch FR beobachtet. Diese könnte zum einen durch die direkte Reduzierung des vaskulären Tonus vermittelt oder zum anderen in einer direkten Hemmung von proliferationsfördernden Gq-abhängigen Signalwegen begründet sein (Billington & Penn, 2003; Inagami & Eguchi, 2000; Iyinnikel & Murray, 2018; Kong *et al.*, 2006; Lambers *et al.*, 2013; Moolenaar, 1991; Schreier *et al.*, 2011). Der Einfluss von Gq auf Proliferationsprozesse von SMC konnte bereits in einem Mausmodell der Neointima-Bildung

nach Karotisarterien-Ligation demonstriert werden. Hier zeigte sich in SMC-spezifischen $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -Knockout Tieren eine geringere Aktivierung der MAPK sowie der Transkription von *early-response* Genen und somit eine reduzierte Neointima Bildung (Althoff *et al.*, 2012; Althoff & Offermanns, 2015). FR könnte im pulmonalen Gefäßsystem bzw. bei der Hypoxie-induzierten PH über einen ähnlichen Mechanismus wirken, da MAPK ebenfalls sowohl an der 5-HT-induzierten Proliferation in PASMC aus Rindern (Wei *et al.*, 2010) sowie an der Entwicklung einer PH in verschiedenen Modellen der Ratte (Jin *et al.*, 2000; J. Lu *et al.*, 2004) als auch an dem dysreguliertem Wachstum von PASMC aus PAH-Patienten*innen beteiligt sind (Wilson *et al.*, 2015). Als weiteres charakteristisches Merkmal der PAH gilt die Rechtsherzhypertrophie. FR konnte die Zunahme der Kardiomyozyten-Fläche als Maß dieser Hypertrophie verhindern und revertieren. Auch in Herzmuskelzellen sind viele Gq-gekoppelte Rezeptoren wie ET-1-, Angiotensin II-, Noradrenalin- oder 5-HT-Rezeptoren exprimiert, die unter anderem über Ca^{2+} und MAPK eine kardiale Hypertrophie begünstigen können (Rohini *et al.*, 2010; Sánchez-Fernández *et al.*, 2014; Viswanathan *et al.*, 2018; Wettschureck & Offermanns, 2005). So wurde beispielsweise beschrieben, dass die Angiotensin II-induzierte ERK-Rezeptor-Transaktivierung und Hypertrophie im Herzen durch Gq-Proteine vermittelt wird (N. J. Smith *et al.*, 2011). Dementsprechend könnte FR direkt über Signalwege in den Kardiomyozyten eine Reduzierung der RV-Hypertrophie bewirken. Arimoto *et al.* zeigten diesbezüglich, dass die kardiale Überexpression von DAG-Kinasen, welche die Wirkung von Gq-aktivierten second messengern reduzieren, die Agonisten-induzierte Herzhypertrophie verhindert (Arimoto *et al.*, 2006). Daneben postulieren W. Zhang *et al.*, dass die endogene RGS2-Aktivität in Kardiomyozyten wichtig für die Inhibition von Gq-Signaling ist und einer ventrikulären Hypertrophie entgegenwirkt (W. Zhang *et al.*, 2006). Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung von kardialen Gq-Proteinen an Hypertrophie-Prozessen im Herzen kann der Publikation von Wettschureck *et al.* entnommen werden. Sie veröffentlichten, dass die nach transverser aortaler Konstriktion üblicherweise auftretende Linksherzhypertrophie in Herzmuskel-spezifischen $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ Knockout-Tieren nicht zu finden war (Wettschureck *et al.*, 2001). Ebenso führte die Kardiomyozyten-spezifische Expression eines Peptides, welches die Interaktion zwischen Rezeptor und Gq-Protein verhindert, zu einer reduzierten Linksherzhypertrophie nach transverser aortaler Konstriktion (Akhter *et al.*, 1998). Die genannten Studien demonstrieren, dass das Gq-Signaling in Kardiomyozyten eine wichtige Rolle bei Hypertrophie-Vorgängen spielt. Im Gegensatz dazu zeigt eine Publikation von Keys *et al.*, dass die chronische Gabe von Gq-gekoppelten Agonisten wie 5-HT, Angiotensin II und Phenylephrin zur Linksherzhypertrophie führt, diese allerdings nur durch die spezifische

vaskuläre Expression eines Gq-Peptid-Inhibitors, nicht aber durch eine spezifische kardiale Expression, reduziert werden kann. Daher vermuteten sie, dass bei der Agonisten-induzierten Hypertrophie nicht die direkte Rezeptorstimulation am Herzen, sondern das Gq-Signaling in den glatten Muskelzellen bzw. die Erhöhung der Nachlast für die linksventrikuläre Hypertrophie am Herzen verantwortlich ist (Keys *et al.*, 2002). Somit wäre auch in unseren Experimenten neben dem direkten Effekt von FR auf die Kardiomyozyten ein FR-induzierter verringerter Gefäßtonus und somit reduzierter Blutdruck in den PAs eine alternative Erklärung für die reduzierte Kardiomyozyten-Fläche.

4.3.2 Potenzielle Nebenwirkungen bei FR-Applikation

Da Gq-Proteine ubiquitär und insbesondere stark im kardiovaskulären System exprimiert sind, stellt sich bei einer therapeutischen Anwendung eines pharmakologischen Gq-Inhibitors auch die Frage nach potenziellen Nebenwirkungen. In den Experimenten mit repetitiver FR-Applikation (10 µg FR/Maus, Montag bis Freitag, i.p.) fanden wir nach 3 bzw. 5 Wochen einen leichten systemischen Blutdruckabfall um 8-12 mmHg sowohl in gesunden Tieren als auch in den Tieren mit Hypoxie-induzierter PH. Unsere früheren Studien zeigten, dass auch eine orale Einmal-Gabe von 0,2 mg/Maus nach einer Stunde zu einem systemischen Blutdruckabfall von 20 mmHg (Crüsemann *et al.*, 2018) führt, wohingegen eine einmalige Inhalation von 2,5 µg FR akut keinen Effekt auf den systemischen Blutdruck induzierte. Erst die Inhalation einer höheren Dosis von 12,5 µg FR senkte den systemischen Blutdruck leicht (Matthey *et al.*, 2017). Eine basale systemische Blutdruckreduzierung um 10-15 mmHg wurde auch in Mäusen mit $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -SMC-Knockout beschrieben (Wirth *et al.*, 2008). Da Gq-Proteine auch in systemischen Gefäßen den Tonus der glatten Muskulatur mitbestimmen (Althoff & Offermanns, 2015; Wirth *et al.*, 2008), ist eine Reduzierung des systemischen Blutdrucks zu erwarten. Grundlegend ist zu beachten, dass FR auch nach systemischer i.p.-Applikation in der Lunge in ähnlich hohen Konzentrationen wie bei i.t. Gabe zu finden ist. Im Vergleich zur Konzentration in der Lunge war die Konzentration von FR in anderen Organen nach i.p.-Applikation deutlich geringer (Schlegel *et al.*, 2021). Dies könnte mit einer hohen Gq-Expression in der Lunge erklärt werden und für eine stärkere Wirksamkeit in Lungengefäßen als in systemischen Gefäßen sprechen. Leichte systemische hypotensive Nebenwirkungen sind daneben für nahezu alle Medikamentenklassen zur Behandlung der PAH bekannt und publiziert (Sildenafil (Preston *et al.*, 2005), Iloprost (Kingman *et al.*, 2017), Riociguat (Dumitrascu *et al.*, 2006; Ghofrani *et al.*, 2013), Bosentan (Williamson *et al.*, 2000)), wobei ihre positiven Wirkungen auf den pulmonalen Blutdruck überwiegen.

Neben dem Effekt auf den systemischen Blutdruck reduzierte eine Einzeldosis FR auch leicht die Herzfrequenz in der Versuchsgruppe der Hypoxie-induzierten PH. Dies ist bei repetitiver Gabe über 3 Wochen nicht aufgetreten. Dieser Unterschied könnte dadurch begründet sein, dass die letzte Applikation von FR bei repetitiver Gabe mindestens 12 Stunden (i.t.) bzw. 72 Stunden (i.p.) vor der Analyse stattfand, während in den Einzeldosis-Experimenten nur eine Stunde zwischen FR-Applikation und Analyse lag. Eine kurzfristige Reduktion der Herzfrequenz nach FR-Applikation wurde auch von Meleka *et al.* in telemetrischen Analysen beobachtet. Nach subkutaner Applikation von FR sank die Herzfrequenz akut ab und stieg danach innerhalb der ersten Stunden wieder auf die Ausgangswerte an, während die blutdrucksenkende Wirkung von FR deutlich länger persistierte (Meleka *et al.*, 2019). Eine mögliche Begründung für die reduzierte Herzfrequenz bei FR-Gabe könnte der Einfluss von Gq auf G-Protein-aktivierte Kaliumkanäle (GIRK) bei der Herzfrequenzregulation sein. Diese Kanäle werden bei Vagus-Aktivierung durch Azetylcholin über Gi-Proteine aktiviert und vermitteln die parasympathische Reduzierung der Herzfrequenz (Aziz *et al.*, 2018). Mark *et al.* zeigten, dass eine gleichzeitige Aktivierung von Gi- und Gq-Proteinen die Inaktivierung des Kanals beschleunigt (Mark *et al.*, 2000). Eine Gq-Protein-Aktivierung würde somit die Herzfrequenz erhöhen. Fällt diese Komponente durch FR-induzierte Gq-Hemmung weg, könnte dies eine verlangsamte Herzfrequenz zur Folge haben. Des weiteren konnte in atrialen Kardiomyozyten gezeigt werden, dass Ca^{2+} -sensitive Rezeptoren die GIRK-Aktivität hemmen und FR diese Hemmung reduzierte (Kienitz *et al.*, 2019). Daneben wurde gezeigt, dass eine Gq-Aktivierung durch ET-1 oder Phenylephrin die IP_3 -Produktion in murinen Sinusknotenzellen stimuliert und darüber die Schlagfrequenz beschleunigt werden kann (Ju *et al.*, 2012; Kapoor *et al.*, 2015). Zudem führte eine Licht-induzierte Gq-Aktivierung in spontan schlagenden *embryoid bodies* zu einer Steigerung der Schlagfrequenz (Beiert *et al.*, 2014). Der genaue Mechanismus der FR-induzierten Herzfrequenzreduzierung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Prognostisch könnte eine FR-vermittelte Reduzierung der Herzfrequenz in Patienten*innen mit PAH von Vorteil sein. So konnten Hildenbrand *et al.* zeigen, dass eine geringere Herzfrequenz die Langzeit-Prognose bei Patienten*innen mit PAH verbessert (Hildenbrand *et al.*, 2012).

Insgesamt führte eine Gq-Inhibition durch FR zu einer deutlichen Verhinderung und Umkehrung pathophysiologischer Veränderungen im Hypoxie-induzierten PH-Modell in der Maus, was die Beteiligung von Gq-Proteinen an diesen Prozessen hervorhebt. Weitere Studien müssen den therapeutischen Nutzen einer spezifischen Gq-Inhibition bei der Behandlung der PH unter Berücksichtigung potenzieller Nebenwirkungen untersuchen. Im Vergleich zu

anderen Vasodilatoren ist die Effektivität der pharmakologische Gq Inhibition mit FR jedoch sehr vielversprechend.

5. Literaturverzeichnis

- Abdel Kafi, S., Mélot, C., Vachiéry, J.-L., Brimiouille, S. & Naeije, R., 1998, Partitioning of Pulmonary Vascular Resistance in Primary Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 31 (6), 1372–1376.
- Akhter, S. A., Luttrell, L. M., Rockman, H. A. *et al.*, 1998, Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*, 280 (5363), 574–577.
- Alapati, V. R., McKenzie, C., Blair, A. *et al.*, 2007, Mechanisms of U46619- and 5-HT-induced contraction of bovine pulmonary arteries: role of chloride ions. *Br J Pharmacol*, 151 (8), 1224–1234.
- Althoff, T. F., Albarrán Juárez, J., Troidl, K. *et al.*, 2012, Procontractile G protein-mediated signaling pathways antagonistically regulate smooth muscle differentiation in vascular remodeling. *J Exp Med*, 209 (12), 2277–2290.
- Althoff, T. F. & Offermanns, S., 2015, G-protein-mediated signaling in vascular smooth muscle cells - implications for vascular disease. *J Mol Med*, 93 (9), 973–981.
- Andersen, C. U., Mulvany, M. J. & Simonsen, U., 2005, Lack of synergistic effect of molsidomine and sildenafil on development of pulmonary hypertension in chronic hypoxic rats. *Eur J Pharmacol*, 510 (1-2), 87–96.
- Angus, J. A., Hughes, R. J. A. & Wright, C. E., 2017, Distortion of KB estimates of endothelin-1 ETA and ETB receptor antagonists in pulmonary arteries: Possible role of an endothelin-1 clearance mechanism. *Pharmacol Res Perspect*, 5 (6).
- Annala, S., Feng, X., Shridhar, N. *et al.*, 2019, Direct targeting of Gαq and Gα11 oncoproteins in cancer cells. *Sci Signal*, 12 (573).
- Arimoto, T., Takeishi, Y., Takahashi, H. *et al.*, 2006, Cardiac-specific overexpression of diacylglycerol kinase zeta prevents Gq protein-coupled receptor agonist-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Circulation*, 113 (1), 60–66.
- Aziz, Q., Li, Y. & Tinker, A., 2018, Potassium channels in the sinoatrial node and their role in heart rate control. *Channels (Austin)*, 12 (1), 356–366.

- Barman, S. A., 2007, Vasoconstrictor effect of endothelin-1 on hypertensive pulmonary arterial smooth muscle involves Rho-kinase and protein kinase C. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293 (2), L472-9.
- Barst, R. J., 2005, PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*, 115 (10), 2691–2694.
- Beiert, T., Bruegmann, T. & Sasse, P., 2014, Optogenetic activation of Gq signalling modulates pacemaker activity of cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 102 (3), 507–516.
- BelAiba, R. S., Djordjevic, T., Bonello, S. *et al.*, 2006, The serum- and glucocorticoid-inducible kinase Sgk-1 is involved in pulmonary vascular remodeling: role in redox-sensitive regulation of tissue factor by thrombin. *Circ Res*, 98 (6), 828–836.
- Benyahia, C., Ozen, G., Orié, N. *et al.*, 2015, Ex vivo relaxations of pulmonary arteries induced by prostacyclin mimetics are highly dependent of the precontractile agents. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 121 (Pt A), 46–52.
- Bethmann, A. N. von, Brasch, F., Nüsing, R. *et al.*, 1998, Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 157 (1), 263–272.
- Betts, J. G., Young, K. A., Wise, J. A. *et al.* (2017). *Anatomy & physiology* (Revision AP-2013-003(03/17)-LC"). OpenStax College, Rice University.
- Billington, C. K. & Penn, R. B., 2003, Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res*, 4, 2.
- Bischoff, E., 2004, Potency, selectivity, and consequences of nonselectivity of PDE inhibition. *Int J Impot Res*, 16 Suppl 1, S11-4.
- Booden, M. A., Siderovski, D. P. & Der, C. J., 2002, Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA. *Mol Cell Biol*, 22 (12), 4053–4061.
- Brandes, R., Lang, F. & Schmidt, R. F. (2019). *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie* (32. Aufl.). *Springer-Lehrbuch*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56468-4>

- Bressollette, E., Dupuis, J., Bonan, R. *et al.*, 2001, Intravascular ultrasound assessment of pulmonary vascular disease in patients with pulmonary hypertension. *Chest*, 120 (3), 809–815.
- Brown, L. M., Chen, H., Halpern, S. *et al.*, 2011, Delay in recognition of pulmonary arterial hypertension: factors identified from the REVEAL Registry. *Chest*, 140 (1), 19–26.
- Bueno-Beti, C., Hadri, L., Hajjar, R. J. & Sassi, Y., 2018, The Sugen 5416/Hypoxia Mouse Model of Pulmonary Arterial Hypertension. *Methods Mol Biol*, 1816, 243–252.
- Campbell, A. P. & Smrcka, A. V., 2018, Targeting G protein-coupled receptor signalling by blocking G proteins. *Nat Rev Drug Discov*, 17 (11), 789–803.
- Carr, R., Koziol-White, C., Zhang, J. *et al.*, 2016, Interdicting Gq Activation in Airway Disease by Receptor-Dependent and Receptor-Independent Mechanisms. *Mol Pharmacol*, 89 (1), 94–104.
- Casey, P. J., Fong, H. K., Simon, M. I. & Gilman, A. G., 1990, Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (4), 2383–2390.
- Chamorro, V., Morales-Cano, D., Milara, J. *et al.*, 2018, Riociguat versus sildenafil on hypoxic pulmonary vasoconstriction and ventilation/perfusion matching. *PLoS ONE*, 13 (1), e0191239.
- Champion, H. C., Bivalacqua, T. J., D'Souza, F. M. *et al.*, 1999, Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the lung of the mouse in vivo. Effect on agonist-induced and flow-mediated vascular responses. *Circ Res*, 84 (12), 1422–1432.
- Chen, J., DeVivo, M., Dingus, J. *et al.*, 1995, A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science*, 268 (5214), 1166–1169.
- Chen, S. J., Chen, Y. F., Meng, Q. C. *et al.*, 1995, Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*, 79 (6), 2122–2131.
- Christman, B. W., McPherson, C. D., Newman, J. H. *et al.*, 1992, An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 327 (2), 70–75.

- Ciuculan, L., Bonneau, O., Hussey, M. *et al.*, 2011, A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 184 (10), 1171–1182.
- Clozel, M., Breu, V., Gray, G. A. *et al.*, 1994, Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 270 (1), 228–235.
- Crüsemann, M., Reher, R., Schamari, I. *et al.*, 2018, Heterologous Expression, Biosynthetic Studies, and Ecological Function of the Selective Gq-Signaling Inhibitor FR900359. *Angew Chem Int Ed Engl*, 57 (3), 836–840.
- D'Alonzo, G. E., Barst, R. J., Ayres, S. M. *et al.*, 1991, Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*, 115 (5), 343–349.
- Daniel, J.-M., Prock, A., Dutzmann, J. *et al.*, 2016, Regulator of G-Protein Signaling 5 Prevents Smooth Muscle Cell Proliferation and Attenuates Neointima Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36 (2), 317–327.
- Davenport, A. P., Hyndman, K. A., Dhaun, N. *et al.*, 2016, Endothelin. *Pharmacol Rev*, 68 (2), 357–418.
- Davie, N., Haleen, S. J., Upton, P. D. *et al.*, 2002, ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 165 (3), 398–405.
- Dumitrascu, R., Weissmann, N., Ghofrani, H. A. *et al.*, 2006, Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation*, 113 (2), 286–295.
- Eddahibi, S., Guignabert, C., Barlier-Mur, A.-M. *et al.*, 2006, Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation*, 113 (15), 1857–1864.
- Feng, X., Liu, P., Zhou, X. *et al.*, 2016, Thromboxane A2 Activates YAP/TAZ Protein to Induce Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. *J Biol Chem*, 291 (36), 18947–18958.

- Frenken, M. & Kaumann, A. J., 1984, Interaction of ketanserin and its metabolite ketanserinol with 5HT₂ receptors in pulmonary and coronary arteries of calf. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 326 (4), 334–339.
- Fuchs, B., Rupp, M., Ghofrani, H. A. *et al.*, 2011, Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respir Res*, 12, 20.
- Fujioka, M., Koda, S., Morimoto, Y. & Biemann, K., 1988, Structure of FR900359, a cyclic depsipeptide from *Ardisia crenata* Sims. *J. Org. Chem.*, 53 (12), 2820–2825.
- Fukumoto, S., Koyama, H., Hosoi, M. *et al.*, 1999, Distinct role of cAMP and cGMP in the cell cycle control of vascular smooth muscle cells: cGMP delays cell cycle transition through suppression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 activation. *Circ Res*, 85 (11), 985–991.
- Fukumoto, Y., Kawahara, Y., Kariya, K. *et al.*, 1988, Independent inhibition of DNA synthesis by protein kinase C, cyclic AMP and interferon α/β in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 157 (1), 337–345.
- Fukuroda, T., Ozaki, S., Ihara, M. *et al.*, 1994, Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br J Pharmacol*, 113 (2), 336–338.
- Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J.-L. *et al.*, 2016, 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*, 37 (1), 67–119.
- Ghofrani, H.-A., D'Armini, A. M., Grimminger, F. *et al.*, 2013, Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 369 (4), 319–329.
- Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D. *et al.*, 1993, Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 328 (24), 1732–1739.
- Gohla, A., Schultz, G. & Offermanns, S., 2000, Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res*, 87 (3), 221–227.

- Gosens, R., Nelemans, S. A., Grootte Bromhaar, M. M. *et al.*, 2003, Muscarinic M3-receptors mediate cholinergic synergism of mitogenesis in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28 (2), 257–262.
- Goulopoulou, S., Hannan, J. L., Matsumoto, T. *et al.*, 2015, Reduced vascular responses to soluble guanylyl cyclase but increased sensitivity to sildenafil in female rats with type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 309 (2), H297-304.
- Gunaje, J. J., Bahrami, A. J., Schwartz, S. M., Daum, G. & Mahoney, W. M., 2011, PDGF-dependent regulation of regulator of G protein signaling-5 expression and vascular smooth muscle cell functionality. *Am J Physiol Cell Physiol*, 301 (2), C478-89.
- Gutkind, J. S., 1998, Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, 17 (11 Reviews), 1331–1342.
- Hahn, A. W., Resink, T. J., Scott-Burden, T. *et al.*, 1990, Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul*, 1 (9), 649–659.
- Hanasato, N., Oka, M., Muramatsu, M. *et al.*, 1999, E-4010, a selective phosphodiesterase 5 inhibitor, attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats. *The American journal of physiology*, 277 (2), L225-32.
- Hauser, A. S., Avet, C., Normand, C. *et al.*, 2022, Common coupling map advances GPCR-G protein selectivity. *Elife*, 11.
- Hauser, A. S., Chavali, S., Masuho, I. *et al.*, 2018, Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell*, 172 (1-2), 41-54.e19.
- Hedberg, A., Hall, S. E., Ogletree, M. L., Harris, D. N. & Liu, E. C., 1988, Characterization of 5,6-3HSQ 29,548 as a high affinity radioligand, binding to thromboxane A2/prostaglandin H2-receptors in human platelets. *J Pharmacol Exp Ther*, 245 (3), 786–792.
- Hervé, P., Launay, J.-M., Scrobhaci, M.-L. *et al.*, 1995, Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *The American Journal of Medicine*, 99 (3), 249–254.
- Hildenbrand, F. F., Fauchère, I., Huber, L. C. *et al.*, 2012, A low resting heart rate at diagnosis predicts favourable long-term outcome in pulmonary arterial and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. A prospective observational study. *Respir Res*, 13, 76.

- Hoshikawa, Y., Voelkel, N. F., Gesell, T. L. *et al.*, 2001, Prostacyclin receptor-dependent modulation of pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 164 (2), 314–318.
- Huang, J., Zhou, H., Mahavadi, S., Sriwai, W. & Murthy, K. S., 2007, Inhibition of G α q-dependent PLC- β 1 activity by PKG and PKA is mediated by phosphorylation of RGS4 and GRK2. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292 (1), C200-8.
- Humbert, M., Kovacs, G., Hoeper, M. M. *et al.*, 2022, 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*, 43 (38), 3618–3731.
- Humbert, M., Montani, D., Evgenov, O. V. & Simonneau, G., 2013, Definition and classification of pulmonary hypertension. *Handb Exp Pharmacol*, 218, 3–29.
- Humbert, M., Morrell, N. W., Archer, S. L. *et al.*, 2004, Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 43 (12 Suppl S), 13S-24S.
- Hurowitz, E. H., Melnyk, J. M., Chen, Y. J. *et al.*, 2000, Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein α , β , and γ subunit genes. *DNA Res*, 7 (2), 111–120.
- Inagami, T. & Eguchi, S., 2000, Angiotensin II-mediated vascular smooth muscle cell growth signaling. *Braz J Med Biol Res*, 33 (6), 619–624.
- Iyinkkel, J. & Murray, F., 2018, GPCRs in pulmonary arterial hypertension: tipping the balance. *Br J Pharmacol*, 175 (15), 3063–3079.
- Jain, P. P., Hosokawa, S., Xiong, M. *et al.*, 2020, Revisiting the mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction using isolated perfused/ventilated mouse lung. *Pulm Circ*, 10 (4), 2045894020956592.
- Jain, P. P., Leber, R., Nagaraj, C. *et al.*, 2014, Liposomal nanoparticles encapsulating iloprost exhibit enhanced vasodilation in pulmonary arteries. *Int J Nanomedicine*, 9, 3249–3261.
- Jin, N., Hatton, N., Swartz, D. R. *et al.*, 2000, Hypoxia activates jun-N-terminal kinase, extracellular signal-regulated protein kinase, and p38 kinase in pulmonary arteries. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23 (5), 593–601.
- Jin, N., Packer, C. S. & Rhoades, R. A., 1992, Pulmonary arterial hypoxic contraction: signal transduction. *The American journal of physiology*, 263 (1 Pt 1), L73-8.

- Ju, Y.-K., Woodcock, E. A., Allen, D. G. & Cannell, M. B., 2012, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and pacemaker rhythms. *J Mol Cell Cardiol*, 53 (3), 375–381.
- Kamato, D., Mitra, P., Davis, F. *et al.*, 2017, Gαq proteins: molecular pharmacology and therapeutic potential. *Cell Mol Life Sci*, 74 (8), 1379–1390.
- Kamato, D., Thach, L., Bernard, R. *et al.*, 2015, Structure, Function, Pharmacology, and Therapeutic Potential of the G Protein, Gα/q,11. *Front Cardiovasc Med*, 2, 14.
- Kandathil, A. & Chamarthy, M., 2018, Pulmonary vascular anatomy & anatomical variants. *Cardiovasc Diagn Ther*, 8 (3), 201–207.
- Kapoor, N., Tran, A., Kang, J. *et al.*, 2015, Regulation of calcium clock-mediated pacemaking by inositol-1,4,5-trisphosphate receptors in mouse sinoatrial nodal cells. *J Physiol*, 593 (12), 2649–2663.
- Karoor, V., Oka, M., Walchak, S. J. *et al.*, 2013, Nephilysin regulates pulmonary artery smooth muscle cell phenotype through a platelet-derived growth factor receptor-dependent mechanism. *Hypertension*, 61 (4), 921–930.
- Katada, T. & Ui, M., 1982, Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79 (10), 3129–3133.
- Kaur, H., Carvalho, J., Looso, M. *et al.*, 2017, Single-cell profiling reveals heterogeneity and functional patterning of GPCR expression in the vascular system. *Nat Commun*, 8, 15700.
- Keys, J. R., Greene, E. A., Koch, W. J. & Eckhart, A. D., 2002, Gq-coupled receptor agonists mediate cardiac hypertrophy via the vasculature. *Hypertension*, 40 (5), 660–666.
- Kienitz, M.-C., Niemeyer, A., König, G. M. *et al.*, 2019, Biased signaling of Ca²⁺-sensing receptors in cardiac myocytes regulates GIRK channel activity. *J Mol Cell Cardiol*, 130, 107–121.
- Kingman, M., Archer-Chicko, C., Bartlett, M. *et al.*, 2017, Management of prostacyclin side effects in adult patients with pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*, 7 (3), 598–608.
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T. P. & Brautigan, D. L., 2000, Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain

- phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (14), 9897–9900.
- Klinger, J. R., Elliott, C. G., Levine, D. J. *et al.*, 2019, Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension in Adults: Update of the CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*, 155 (3), 565–586.
- Knapp, J., Aleth, S., Balzer, F. *et al.*, 2006, Comparison of contractile responses in isolated mouse aorta and pulmonary artery: Influence of strain and sex. *J Cardiovasc Pharmacol*, 48 (1), 820–826.
- Kohno, M., Kano, H., Horio, T. *et al.*, 1995, Inhibition of endothelin production by adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 25 (6), 1185–1190.
- Kong, K. C., Billington, C. K., Gandhi, U., Panettieri, R. A. & Penn, R. B., 2006, Cooperative mitogenic signaling by G protein-coupled receptors and growth factors is dependent on G(q/11). *FASEB J*, 20 (9), 1558–1560.
- Kostenis, E., Pfeil, E. M. & Annala, S., 2020, Heterotrimeric Gq proteins as therapeutic targets? *J Biol Chem*, 295 (16), 5206–5215.
- Kovacs, G., Berghold, A., Scheidl, S. & Olschewski, H., 2009, Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J*, 34 (4), 888–894.
- Kuschak, M., Namasivayam, V., Rafehi, M. *et al.*, 2020, Cell-permeable high-affinity tracers for Gq proteins provide structural insights, reveal distinct binding kinetics and identify small molecule inhibitors. *Br J Pharmacol*, 177 (8), 1898–1916.
- LaDouceur, D. M., Flynn, M. A., Keiser, J. A., Reynolds, E. & Haleen, S. J., 1993, ETA and ETB receptors coexist on rabbit pulmonary artery vascular smooth muscle mediating contraction. *Biochem Biophys Res Commun*, 196 (1), 209–215.
- Lai, Y.-C., Potoka, K. C., Champion, H. C., Mora, A. L. & Gladwin, M. T., 2014, Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ Res*, 115 (1), 115–130.
- Lambers, C., Roth, M., Zhong, J. *et al.*, 2013, The interaction of endothelin-1 and TGF- β 1 mediates vascular cell remodeling. *PLoS ONE*, 8 (8), e73399.

- Lan, N. S. H., Massam, B. D., Kulkarni, S. S. & Lang, C. C., 2018, Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Diseases*, 6 (2), 38.
- Lannér, M. C., Raper, M., Pratt, W. M. & Rhoades, R. A., 2005, Heterotrimeric G proteins and the platelet-derived growth factor receptor-beta contribute to hypoxic proliferation of smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 33 (4), 412–419.
- Lapadula, D., Farias, E., Randolph, C. E. *et al.*, 2019, Effects of Oncogenic Gαq and Gα11 Inhibition by FR900359 in Uveal Melanoma. *Mol Cancer Res*, 17 (4), 963–973.
- Lau, E. M. T., Giannoulatou, E., Celermajer, D. S. & Humbert, M., 2017, Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*, 14 (10), 603–614.
- Li, H., Elton, T. S., Chen, Y. F. & Oparil, S., 1994, Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung. *The American journal of physiology*, 266 (5 Pt 1), L553-60.
- Li, Y., Connolly, M., Nagaraj, C. *et al.*, 2012, Peroxisome proliferator-activated receptor-β/δ, the acute signaling factor in prostacyclin-induced pulmonary vasodilation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46 (3), 372–379.
- Lu, C., Giordano, F. J., Bao, X., Morris, K. C. & Rothman, A., 1998, Antisense fosB RNA inhibits thrombin-induced hypertrophy in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circulation*, 98 (6), 596–603.
- Lu, J., Shimpo, H., Shimamoto, A. *et al.*, 2004, Specific inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase with FR167653 attenuates vascular proliferation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 128 (6), 850–859.
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y. *et al.*, 2005, The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (12), 11134–11139.
- MacLean, M. R., Clayton, R. A., Hillis, S. W. *et al.*, 1994, 5-HT₁-receptor-mediated vasoconstriction in bovine isolated pulmonary arteries: influences of vascular endothelium and tone. *Pulm Pharmacol*, 7 (1), 65–72.
- MacLean, M. R., Sweeney, G., Baird, M. *et al.*, 1996, 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 119 (5), 917–930.

- Mamazhakypov, A., Viswanathan, G., Lawrie, A., Schermuly, R. T. & Rajagopal, S., 2021, The role of chemokines and chemokine receptors in pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol*, 178 (1), 72–89.
- Mangmool, S. & Kurose, H., 2011, G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins*, 3 (7), 884–899.
- Mark, M. D., Ruppertsberg, J. P. & Herlitze, S., 2000, Regulation of GIRK channel deactivation by Gαq and Gαi/o pathways. *Neuropharmacology*, 39 (12), 2360–2373.
- Matthey, M., Roberts, R., Seidinger, A. *et al.*, 2017, Targeted inhibition of Gq signaling induces airway relaxation in mouse models of asthma. *Sci Transl Med*, 9 (407).
- McKenzie, C., MacDonald, A. & Shaw, A. M., 2009, Mechanisms of U46619-induced contraction of rat pulmonary arteries in the presence and absence of the endothelium. *Br J Pharmacol*, 157 (4), 581–596.
- Meens, M. J. P. M. T., Compeer, M. G., Hackeng, T. M. *et al.*, 2010, Stimuli of sensory-motor nerves terminate arterial contractile effects of endothelin-1 by CGRP and dissociation of ET-1/ET(A)-receptor complexes. *PLoS ONE*, 5 (6), e10917.
- Meleka, M. M., Edwards, A. J., Xia, J. *et al.*, 2019, Anti-hypertensive mechanisms of cyclic depsipeptide inhibitor ligands for Gq/11 class G proteins. *Pharmacol Res*, 141, 264–275.
- Mey, J. G. R. de, Compeer, M. G. & Meens, M. J. P. M. T., 2009, Endothelin-1, an Endogenous Irreversible Agonist in Search of an Allosteric Inhibitor. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 246–257.
- Miao, L., Dai, Y. & Zhang, J., 2002, Mechanism of RhoA/Rho kinase activation in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283 (3), H983-9.
- Michelakis, E., Tymchak, W., Lien, D. *et al.*, 2002, Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation*, 105 (20), 2398–2403.
- Milara, J., Escrivá, J., Ortiz, J. L. *et al.*, 2016, Vascular effects of sildenafil in patients with pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: an ex vivo/in vitro study. *Eur Respir J*, 47 (6), 1737–1749.

- Montani, D., Günther, S., Dorfmüller, P. *et al.*, 2013, Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis*, 8 (1), 97.
- Moolenaar, W. H., 1991, G-protein-coupled receptors, phosphoinositide hydrolysis, and cell proliferation. *Cell Growth Differ*, 2 (7), 359–364.
- Murthy, K. S., 2006, Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu. Rev. Physiol.*, 68 (1), 345–374.
- Murthy, K. S., Zhou, H., Grider, J. R. & Makhlof, G. M., 2003, Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284 (6), G1006-16.
- Neves, S. R., Ram, P. T. & Iyengar, R., 2002, G protein pathways. *Science*, 296 (5573), 1636–1639.
- Offermanns, S., 2001, In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in G α -deficient mice. *Oncogene*, 20 (13), 1635–1642.
- Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K. & Schultz, G., 1994, G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A₂ and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (2), 504–508.
- Ogawa, A., Firth, A. L., Ariyasu, S. *et al.*, 2013, Thrombin-mediated activation of Akt signaling contributes to pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Physiol Rep*, 1 (7), e00190.
- Ogawa, A., Firth, A. L., Smith, K. A., Maliakal, M. V. & Yuan, J. X.-J., 2012, PDGF enhances store-operated Ca²⁺ entry by upregulating STIM1/Orai1 via activation of Akt/mTOR in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302 (2), C405-11.
- Ohtsu, H., Higuchi, S., Shirai, H. *et al.*, 2008, Central role of G α_q in the hypertrophic signal transduction of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 149 (7), 3569–3575.
- Onken, M. D., Makepeace, C. M., Kaltenbronn, K. M. *et al.*, 2018, Targeting nucleotide exchange to inhibit constitutively active G protein α subunits in cancer cells. *Sci. Signal.*, 11 (546), eaao6852.

- Orie, N. N., Ledwozyw, A., Williams, D. J., Whittle, B. J. & Clapp, L. H., 2013, Differential actions of the prostacyclin analogues treprostinil and iloprost and the selexipag metabolite, MRE-269 (ACT-333679) in rat small pulmonary arteries and veins. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 106, 1–7.
- Patt, J., Alenfelder, J., Pfeil, E. M. *et al.*, 2021, An experimental strategy to probe Gq contribution to signal transduction in living cells. *J Biol Chem*, 100472.
- Perros, F., Montani, D., Dorfmüller, P. *et al.*, 2008, Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 178 (1), 81–88.
- Pfeil, E. M., Brands, J., Merten, N. *et al.*, 2020, Heterotrimeric G Protein Subunit Gαq Is a Master Switch for Gβγ-Mediated Calcium Mobilization by Gi-Coupled GPCRs. *Mol Cell*, 80 (6), 940-954.e6.
- Pithadia, A. B. & Jain, S. M., 2009, 5-Hydroxytryptamine Receptor Subtypes and their Modulators with Therapeutic Potentials. *J Clin Med Res*, 1 (2), 72–80.
- Preston, I. R., Klinger, J. R., Houtches, J. *et al.*, 2005, Acute and chronic effects of sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*, 99 (12), 1501–1510.
- Rashid, J., Patel, B., Nozik-Grayck, E. *et al.*, 2017, Inhaled sildenafil as an alternative to oral sildenafil in the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH). *J Control Release*, 250, 96–106.
- Resink, T. J., Hahn, A. W., Scott-Burden, T. *et al.*, 1990, Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 168 (3), 1303–1310.
- Rhee, S. G., 2001, Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.*, 70 (1), 281–312.
- Ringvold, H. C. & Khalil, R. A. (2017) Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. In *Advances in Pharmacology. Vascular Pharmacology - Smooth Muscle* (Bd. 78, S. 203–301). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.06.002>
- Riobo, N. A. & Manning, D. R., 2005, Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family. *Trends Pharmacol Sci*, 26 (3), 146–154.

- Rohini, A., Agrawal, N., Koyani, C. N. & Singh, R., 2010, Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res*, 61 (4), 269–280.
- Roulet, F. (1948)Das Einbettungsverfahren. In F. Roulet (Hg.), *Methoden der Pathologischen Histologie* (S. 79–113). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-3933-2_9
- Rubanyi, G. M. & Polokoff, M. A., 1994, Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 46 (3), 325–415.
- Rybalkin, S. D., Yan, C., Bornfeldt, K. E. & Beavo, J. A., 2003, Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res*, 93 (4), 280–291.
- Sadana, R. & Dessauer, C. W., 2009, Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neurosignals*, 17 (1), 5–22.
- Sánchez-Fernández, G., Cabezudo, S., García-Hoz, C. *et al.*, 2014, Gαq signalling: the new and the old. *Cell Signal*, 26 (5), 833–848.
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A. *et al.*, 2017, A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 16 (1), 19–34.
- Savale, L., Tu, L., Rideau, D. *et al.*, 2009, Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res*, 10 (1), 6.
- Schemuly, R. T., Dony, E., Ghofrani, H. A. *et al.*, 2005, Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*, 115 (10), 2811–2821.
- Schlegel, J. G., Tahoun, M., Seidinger, A. *et al.*, 2021, Macrocyclic Gq Protein Inhibitors FR900359 and/or YM-254890–Fit for Translation? *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* Advance online publication.
- Schneider, M. P., Boesen, E. I. & Pollock, D. M., 2007, Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 731–759.
- Schrage, R., Schmitz, A.-L., Gaffal, E. *et al.*, 2015, The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. *Nat Commun*, 6, 10156.
- Schreier, B., Döhler, M., Rabe, S. *et al.*, 2011, Consequences of epidermal growth factor receptor (ErbB1) loss for vascular smooth muscle cells from mice with targeted deletion of ErbB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31 (7), 1643–1652.

- Selbie, L. A., King, N. V., Dickenson, J. M. & Hill, S. J., 1997, Role of G-protein beta gamma subunits in the augmentation of P2Y₂ (P2U)receptor-stimulated responses by neuropeptide Y Y1 Gi/o-coupled receptors. *Biochem J*, 328 (Pt 1) (1), 153–158.
- Shirotani, M., Yui, Y., Hattori, R. & Kawai, C., 1991, U-61, 431F, a stable prostacyclin analogue, inhibits the proliferation of bovine vascular smooth muscle cells with little antiproliferative effect on endothelial cells. *Prostaglandins*, 41 (2), 97–110.
- Siangjong, L., Gauthier, K. M., Pfister, S. L., Smyth, E. M. & Campbell, W. B., 2013, Endothelial 12(S)-HETE vasorelaxation is mediated by thromboxane receptor inhibition in mouse mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304 (3), H382-92.
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S. *et al.*, 2019, Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 53 (1), 1801913.
- Sitbon, O., Humbert, M., Jaïs, X. *et al.*, 2005, Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 111 (23), 3105–3111.
- Sitbon, O., Sattler, C., Bertoletti, L. *et al.*, 2016, Initial dual oral combination therapy in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 47 (6), 1727–1736.
- Smith, N. J., Chan, H.-W., Qian, H. *et al.*, 2011, Determination of the exact molecular requirements for type 1 angiotensin receptor epidermal growth factor receptor transactivation and cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*, 57 (5), 973–980.
- Smith, S. A., Newby, A. C. & Bond, M., 2019, Ending Restenosis: Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by cAMP. *Cells*, 8 (11).
- Sommer, N., Dietrich, A., Schermuly, R. T. *et al.*, 2008, Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J*, 32 (6), 1639–1651.
- Sommer, N., Ghofrani, H. A., Pak, O. *et al.*, 2021, Current and future treatments of pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol*, 178 (1), 6–30.
- Southgate, K. & Newby, A. C., 1990, Serum-induced proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells from the contractile state is inhibited by 8-Br-cAMP but not 8-Br-cGMP. *Atherosclerosis*, 82 (1-2), 113–123.

- Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J. & McMurtry, I. F., 2009, Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297 (6), L1013-32.
- Stewart, D. J., Levy, R. D., Cernacek, P. & Langleben, D., 1991, Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med*, 114 (6), 464–469.
- Stow, L. R., Jacobs, M. E., Wingo, C. S. & Cain, B. D., 2011, Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J*, 25 (1), 16–28.
- Strassheim, D., Karoor, V., Stenmark, K., Verin, A. & Gerasimovskaya, E., 2018, A current view of G protein-coupled receptor - mediated signaling in pulmonary hypertension: finding opportunities for therapeutic intervention. *Vessel Plus*, 2.
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W. & Gilman, A. G., 1996, Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36 (1), 461–480.
- Sylvester, J. T., Shimoda, L. A., Aaronson, P. I. & Ward, J. P. T., 2012, Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev*, 92 (1), 367–520.
- Tabeling, C., Yu, H., Wang, L. *et al.*, 2015, CFTR and sphingolipids mediate hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (13), E1614-23.
- Takasaki, J., Saito, T., Taniguchi, M. *et al.*, 2004, A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (46), 47438–47445.
- Tanski, W. J., Roztocil, E., Hemady, E. A., Williams, J. A. & Davies, M. G., 2004, Role of Galphaq in smooth muscle cell proliferation. *J Vasc Surg*, 39 (3), 639–644.
- Tantini, B., Manes, A., Fiumana, E. *et al.*, 2005, Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*, 100 (2), 131–138.
- Teixeira, C. E., Priviero, F. B. M. & Webb, R. C., 2006, Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 316 (2), 654–661.
- Thompson, A. A. R. & Lawrie, A., 2017, Targeting Vascular Remodeling to Treat Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends Mol Med*, 23 (1), 31–45.

- Tonelli, A. R., Arelli, V., Minai, O. A. *et al.*, 2013, Causes and circumstances of death in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 188 (3), 365–369.
- Townsley, M. I., 2012, Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Compr Physiol*, 2 (1), 675–709.
- Tuder, R. M., Cool, C. D., Geraci, M. W. *et al.*, 1999, Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 159 (6), 1925–1932.
- Tutunea-Fatan, E., Caetano, F. A., Gros, R. & Ferguson, S. S. G., 2015, GRK2 targeted knock-down results in spontaneous hypertension, and altered vascular GPCR signaling. *J Biol Chem*, 290 (8), 5141–5155.
- Vermeersch, P., Buys, E., Pokreisz, P. *et al.*, 2007, Soluble guanylate cyclase- α 1 deficiency selectively inhibits the pulmonary vasodilator response to nitric oxide and increases the pulmonary vascular remodeling response to chronic hypoxia. *Circulation*, 116 (8), 936–943.
- Viswanathan, G., Mamazhakypov, A., Schermuly, R. T. & Rajagopal, S., 2018, The Role of G Protein-Coupled Receptors in the Right Ventricle in Pulmonary Hypertension. *Front Cardiovasc Med*, 5, 179.
- Vitali, S. H., Hansmann, G., Rose, C. *et al.*, 2014, The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up. *Pulm Circ*, 4 (4), 619–629.
- Vizza, C. D., Lang, I. M., Badagliacca, R. *et al.*, 2022, Aggressive Afterload Lowering to Improve the Right Ventricle: A New Target for Medical Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension? *Am J Respir Crit Care Med*, 205 (7), 751–760.
- Walsh, M. P., Susnjar, M., Deng, J. *et al.* (2006) Phosphorylation of the Protein Phosphatase Type 1 Inhibitor Protein CPI-17 by Protein Kinase C. In M. Greg (Hg.), *Protein Phosphatase Protocols* (Bd. 365, S. 209–224). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-267-X:209>
- Wan, J., Yamamura, A., Zimnicka, A. M. *et al.*, 2013, Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca^{2+} channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305 (2), L154-64.

- Wang, L.-Y., Lee, K.-T., Lin, C.-P. *et al.*, 2017, Long-Term Survival of Patients with Pulmonary Arterial Hypertension at a Single Center in Taiwan. *Acta Cardiol Sin*, 33 (5), 498–509.
- Wang, T., Dowal, L., El-Maghrabi, M. R., Rebecchi, M. & Scarlata, S., 2000, The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta(2) links the binding of gbetagamma to activation of the catalytic core. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (11), 7466–7469.
- Wei, L., Liu, Y., Kaneto, H. & Fanburg, B. L., 2010, JNK regulates serotonin-mediated proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 298 (6), L863-9.
- Wenzel, D., Schmidt, A., Reimann, K. *et al.*, 2006, Endostatin, the proteolytic fragment of collagen XVIII, induces vasorelaxation. *Circ Res*, 98 (9), 1203–1211.
- Wettschureck, N. & Offermanns, S., 2002, Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med*, 80 (10), 629–638.
- Wettschureck, N. & Offermanns, S., 2005, Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, 85 (4), 1159–1204.
- Wettschureck, N., Rütten, H., Zywiets, A. *et al.*, 2001, Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nat Med*, 7 (11), 1236–1240.
- Wharton, J., Davie, N., Upton, P. D. *et al.*, 2000, Prostacyclin analogues differentially inhibit growth of distal and proximal human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation*, 102 (25), 3130–3136.
- Williamson, D. J., Wallman, L. L., Jones, R. *et al.*, 2000, Hemodynamic effects of Bosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with pulmonary hypertension. *Circulation*, 102 (4), 411–418.
- Wilson, J. L., Yu, J., Taylor, L. & Polgar, P., 2015, Hyperplastic Growth of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Subjects with Pulmonary Arterial Hypertension Is Activated through JNK and p38 MAPK. *PLoS ONE*, 10 (4), e0123662.
- Wirth, A., Benyó, Z., Lukasova, M. *et al.*, 2008, G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med*, 14 (1), 64–68.

- Wu, X., Lu, W., He, M. *et al.*, 2020, Structural and functional definition of the pulmonary vein system in a chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension rat model. *Am J Physiol Cell Physiol*, 318 (3), C555-C569.
- Yaghi, S., Novikov, A. & Trandafirescu, T., 2020, Clinical update on pulmonary hypertension. *J Investig Med*, 68 (4), 821–827.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S. *et al.*, 1988, A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332 (6163), 411–415.
- Yang, Z., Krasnici, N. & Lüscher, T. F., 1999, Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation*, 100 (1), 5–8.
- Zaima, K., Deguchi, J., Matsuno, Y. *et al.*, 2013, Vasorelaxant effect of FR900359 from *Ardisia crenata* on rat aortic artery. *J Nat Med*, 67 (1), 196–201.
- Zhang, H., Nielsen, A. L. & Strømgaard, K., 2020, Recent achievements in developing selective Gq inhibitors. *Med Res Rev*, 40 (1), 135–157.
- Zhang, W., Anger, T., Su, J. *et al.*, 2006, Selective loss of fine tuning of Gq/11 signaling by RGS2 protein exacerbates cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (9), 5811–5820.
- Zhao, L., Mason, N. A., Morrell, N. W. *et al.*, 2001, Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 104 (4), 424–428.
- Zhao, L., Mason, N. A., Strange, J. W., Walker, H. & Wilkins, M. R., 2003, Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic Peptide activity. *Circulation*, 107 (2), 234–237.

6. Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	Aktivator-Protein 1
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklische Adenosinmonophosphat
cdk	cyclin-dependent kinase (zyklin-abhängigen Kinase)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cGMP	zyklisches Guaninmonophosphat
CMC	Carboxymethylcellulose
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-,FR-Sildenafil-Hx	Gabe von DMSO/FR/Sildenafil unter hypoxischen Bedingungen
DMSO-,FR-Sildenafil-Nx	Gabe von DMSO/FR/Sildenafil unter normoxischen Bedingungen
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺)
DWK	Dosiswirkungskurve
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
eNOS	endotheliale NO Synthase
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
ET-1	Endothelin-1
F	French
FR	FR900359
GAP	<i>GTPase-activating protein</i> (GTPase-aktivierende Proteine)

GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanosine triphosphate exchange factor</i> (GTP-Austauschfaktor)
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
G-Proteine	Guaninnukleotid-bindende Proteine
GRK	GPCR-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
hPASC	humane pulmonal arterielle glatte Muskelzellen
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPL	isoliert perfundierte Lunge
IP-Rezeptor	Prostazyklin-Rezeptor
JAK2	Janus-Kinase 2
LARG	Leukämie-assoziiertes Rho-Guaninaustauschfaktor
LC	<i>light chain</i> (leichte Kette)
LV	linksventrikulär
LVSP	<i>left ventricular systolic pressure</i> (linksventrikulärer systolischer Druck)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (mitogen-aktivierte Proteinkinase)
min	Minute
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i> (Myosin-leichte-Ketten-Kinase)
MLCP	<i>myosin light chain phosphatase</i> (Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mN	Millinewton
Na ⁺	Natrium
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
PA	Pulmonalarterie
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PASC	pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> (thrombozytenabgeleiteter Wachstumsfaktor)
PFA	Paraformaldehyd
PH	pulmonale Hypertonie
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA, -C, -G	Proteinkinase A, -C, -G
PLC β	Phospholipase C β
PSS	Physiologische Kochsalzlösung
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTX	Pertussis Toxin
qRT-PCR	quantitative reverse-Transkriptase PCR
RGS	<i>regulator of G protein signaling</i>
RhoGEF	Rho-Guaninaustauschfaktor
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RV	rechtsventrikulär
RVSP	<i>right ventricular systolic pressure</i> (rechtsventrikulärer systolischer Druck)
s.	siehe
s.c.	subkutan
sek	Sekunde
sGC	<i>Soluble guanylyl cyclase</i> (zytosolische Guanylatzyklase)
SQ	SQ 29,548
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TRP	<i>transient receptor potential</i> (transientes Rezeptor Potential)
TxA	Thromboxan
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (vaskulärer Endothelwachstumsfaktor)
vs.	versus
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
WGA-Färbungen	<i>Wheat germ agglutinin</i> -Färbung
wt	Wildtyp
YM	YM254890
z.B.	zum Beispiel