

Die Rolle der microRNA-100 in der pulmonalen Hypertonie

von Viktor Schmitz

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Die Rolle der microRNA-100 in der pulmonalen
Hypertonie**

von Viktor Schmitz

aus Breisach am Rhein

München 2021

**Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

**Angefertigt am: Universitäts-Herzzentrum Freiburg-Bad Krozingen,
Klinik für Kardiologie und Angiologie I
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau**

Mentor: Dr. rer. nat. Franziska Pankratz

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Nikolai Klymiuk

Tag der Promotion: 6. Februar 2021

In Liebe, Wertschätzung und Dankbarkeit

widme ich meine Doktorarbeit

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Pulmonale Hypertonie.....	7
1.1.1	Einteilung.....	8
1.1.2	Ätiologie und Genese der PAH.....	15
1.1.2.1	BMPR2.....	15
1.1.2.2	EPDR1	16
1.1.3	Diagnostik.....	17
1.1.3.1	Anatomie und Physiologie des rechten Ventrikels	18
1.1.3.2	Ultraschall	18
1.1.3.3	Elektrokardiogramm	20
1.1.3.4	Lungenfunktionstest und Blutgasanalyse	21
1.1.3.5	Genetische Tests	21
1.1.3.6	Bluttest	21
1.1.3.7	Computertomographie.....	22
1.1.3.8	Magnetresonanztomographie (MRT).....	22
1.1.4	Therapieoptionen.....	22
1.1.4.1	Stufe eins der Behandlungsstrategie.....	22
1.1.4.2	Stufe zwei der Behandlungsstrategie	23
1.1.4.3	Stufe drei der Behandlungsstrategie	25
1.1.5	Epidemiologie und Überlebenszeit	26
1.1.6	PAH in der Tiermedizin.....	27
1.2	MicroRNAs.....	30
1.2.1	Entdeckung der microRNAs	30
1.2.2	Bedeutung von microRNAs	31
1.2.3	Biogenese von microRNAs.....	31
1.3	Ziel dieser Arbeit	33

2	Material	34
2.1	Geräte und Gebrauchsgegenstände	34
2.2	Verbrauchsmaterialien	36
2.3	Chemikalien und Reagenzien	37
2.4	Puffer und Lösungen.....	39
2.5	Kits.....	41
2.6	Oligonukleotide	41
2.6.1	Primer für SYBRGreen PCR.....	41
2.6.2	Taqman und PrimePCR Assays	41
2.7	Marker.....	42
2.8	Enzyme.....	42
2.9	Antikörper	42
2.9.1	Western Blot.....	42
2.10	Programme	43
3	Methoden.....	44
3.1	Sterilisation von Gebrauchsmitteln und Lösungen.....	44
3.2	Zellkultur	44
3.2.1	Kultivierung von Zellen	44
3.2.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	45
3.2.3	Transfektion.....	45
3.2.4	Isolation von RNA.....	46
3.2.4.1	Zellyse/ Gewebehomogenisierung	46
3.2.4.2	DNase-Behandlung.....	47
3.2.4.3	Reverse Transkription	47
3.2.5	Isolation von Proteinen	48
3.2.5.1	Zellyse/Gewebehomogenisierung	48
3.2.5.2	Messung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test.....	48

3.2.5.3	Vorbereitung der Proben für eine Gelelektrophorese	49
3.2.6	Western Blot Analyse	49
3.2.7	<i>Next-Generation-Sequenzierung</i> der hPASMC-Zellen	50
3.2.8	PCR – Polymerase-Kettenreaktion.....	50
3.2.8.1	Quantitative Echtzeit-PCR (Q-PCR).....	51
3.2.8.2	microRNA-PCR	52
3.3	Tierversuch	53
3.3.1	Verwendete Versuchstiere.....	53
3.3.2	Cre/loxP System und Tamoxifeninduktion	54
3.3.3	Hypoxie-Kammer und Monitoring	55
3.3.4	Echokardiographie.....	56
3.3.5	Tötung von Versuchsmäusen	57
3.3.6	Organentnahme.....	57
3.4	Histologie	58
3.4.1	Entwässern.....	59
3.4.2	Einbetten	59
3.4.3	Schneiden.....	59
3.4.4	Färben	59
3.4.5	Mikroskopie	60
3.4.6	Auswertung.....	60
3.5	Statistische Auswertung der Daten	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Zellversuche.....	62
4.1.1	Überprüfung der Transfektionseffizienz und miR-100-Modulation in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen.....	62
4.1.2	Transkriptomanalyse von transfizierten hPASMCs nach miR-100 Modulation	63

4.1.3	Die BMPR2-Expression ist nach miR-100 Modulation in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen reguliert.....	65
4.1.4	Die EPDR1-Expression ist nach miR-100 Modulation in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen reguliert.....	66
4.2	Tierversuch	68
4.2.1	Körpergewicht der Versuchstiere vor und nach der Tamoxifeninjektion	68
4.2.2	Körper-Parameter der Versuchstiere nach dem Versuch	69
4.2.3	Echokardiographie der Versuchstiere.....	72
4.2.3.1	Echokardiographisch unveränderte LV-Ejektionsfraktionen und Abweichungen in den RVIDd/LVIDd-Quotienten der Versuchstiere	72
4.2.3.2	Beurteilung der TAPSE	73
4.2.3.3	Beurteilung des PAT/PET-Quotienten.....	74
4.2.4	Histologische Untersuchung der Lungengefäße.....	75
4.2.5	Keine Veränderung der miR-100-Expression in den Lungen der Versuchstiere.....	77
4.2.6	Keine Veränderung der BMPR2-Expression in den Lungen der Versuchstiere.....	78
4.2.7	EPDR1-Expression in Lungen der Versuchstiere	79
4.2.8	Detektierbar erhöhte miR-100-Expression in den Aorten der transgenen Versuchstiere.....	81
4.2.9	Erhöhte BMPR2-Expression in den Aorten der transgenen Versuchstiere unter hypoxischen Bedingungen	82
4.2.10	Erhöhte EPDR1-Expression in den Aorten der transgenen Versuchstiere unter Hypoxie	83
5	Diskussion.....	85
5.1	Diskussion der Methodik.....	85
5.1.1	Tiermodell.....	85
5.1.2	<i>In vitro</i> -Versuche	86
5.1.3	Cre/loxP-System.....	86

5.1.4	Hypoxie-Kammer	87
5.1.5	Gewebeentnahme	88
5.1.6	qRT-PCR und „stem-loop“ basierende TaqMan-PCR	89
5.1.7	Western Blot	89
5.2	Diskussion der Ergebnisse	91
5.2.1	Einfluss der miR-100 auf die PAH	91
5.2.2	BMPR2 und EPDR1 in der Entstehung der PAH	93
5.2.3	Beeinflussung des Tiermodells der PAH durch miR-100	96
6	Zusammenfassung	98
7	Summary	99
	Literaturverzeichnis	II
	Abbildungsverzeichnis	XVIII
	Tabellenverzeichnis	XIX
	Abkürzungsverzeichnis	XX
	Zusätzliche Daten	XXIII
	Anhang	XXVII
	Danksagung	XXVII

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie stellt in erster Linie keine Diagnose dar, sondern spiegelt einen hämodynamischen Zustand wider (Hoepfer, Ghofrani et al. 2017). Man spricht von pulmonaler Hypertonie, wenn der mittlere pulmonal-arterielle Blutdruck (mPAP) einen mittels Rechtsherzkatheter gemessenen Wert von 25 mmHg in Ruhe oder 30 mmHg bei körperlicher Arbeit überschreitet (Rubin 1997). Bei gesunden Menschen beträgt der normale pulmonal-arterielle Blutdruck in Ruhe $14,0 \pm 3,3$ mmHg (Kovacs, Berghold et al. 2009). Auf dem im Februar 2018 durchgeführten 6. *World Symposium on Pulmonary Hypertension* in Nizza wurde vorgeschlagen, den Grenzwert des pulmonal-arteriellen Blutdruckes auf 20 mmHg zu senken, sodass man ab diesem Grenzwert bereits auf ein erhöhtes Risiko der Erkrankung schließen könne (Condon, Nickel et al. 2019). Die Druckerhöhung in den pulmonalen Gefäßen kann verschiedene zugrunde liegende Mechanismen besitzen. Ursächlich für die Erkrankung der Gefäße in der Lunge kann beispielsweise eine Reduzierung der Innendurchmesser dieser sein, welche zu einer präkapillaren Druckerhöhung mit Rückstau in die rechte Herzkammer führt. Aber auch die Erkrankung der linken Herzkammer mit einem darauffolgenden Rückstau in die Lungengefäße kann der Grund für die hämodynamischen Veränderungen sein. Die genaue Unterteilung der pulmonalen Hypertonie wird im Abschnitt 1.1.1. aufgeführt. Die Untergruppe der pulmonal-arteriellen Hypertonie, welche in dieser Arbeit behandelt und untersucht wird, präsentiert sich zusätzlich durch eine präkapillare pulmonale Hypertonie mit einem normalen pulmonal-arteriellen Verschlussdruck (*pulmonary arterial wedge pressure*, PAWP) von ≤ 15 mmHg. Darüber hinaus zeigt sie einen erhöhten Lungengefäßwiderstand, welcher sich in einem pulmonal-vaskulären Widerstand (*pulmonary vascular resistance*, PVR) von $>240 \text{ dyn} \times \text{s} \times \text{cm}^{-5}$ oder 3 Wood-Einheiten äußert (Galie, Humbert et al. 2016, Hoepfer, Ghofrani et al. 2017). Die Folge einer präkapillaren Druckerhöhung stellt langfristig die Schädigung der rechten Herzkammer und schlussendlich das Rechtsherzversagen dar. Die Stärke der Druckerhöhung steht in starkem Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten (Vonk-Noordegraaf, Haddad et al. 2013). Dabei spielen zwei Komponenten in der

Hämodynamik eine wichtige Rolle: Das ist zum einen der mittlere pulmonal-arterielle Druck (mPAP), welcher vom Durchmesser der kleinen distalen Arterien in der Lunge abhängt und sich im pulmonal-vaskulären Widerstand (PVR) widerspiegelt, und zum anderen die elastischen Eigenschaften des Gefäßbaumes der Lunge, welche als Volumendehnbarkeit (*Compliance* der Arterien) abgeschätzt wird (Chemla, Lau et al. 2015). Bei Erhöhung des PVR und der verringerten Dehnbarkeit entsteht eine Druckerhöhung und somit ein Rückstau in die rechte Herzkammer. Der pulmonal-vaskuläre Widerstand lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$PVR = \frac{(mPAP - PAWP)}{CO}$$

PVR = pulmonal-vaskulärer Widerstand

mPAP = mittlerer pulmonal-arterieller Druck

PAWP = Lungenkapillaren-Verschlussdruck (spiegelt enddiastolischen Druck im linken Ventrikel wider)

CO = Herzzeitvolumen

Bei der präkapillaren Druckerhöhung liegt die Ursache in der Steigerung der PVR, welche durch proliferative Vorgänge und Vasokonstriktion der pulmonalen Arterien als Antwort auf chronische Schädigung der Gefäße hervorgerufen wird (McLaughlin, Shah et al. 2015). Dahingegen zeigt sich bei der PH aufgrund von linksventrikulären Erkrankungen, zusätzlich zum veränderten mPAP von mehr als 25 mmHg, ein erhöhter PAWP von mehr als 15 mmHg (Guazzi and Borlaug 2012).

1.1.1 Einteilung

Schätzungen gehen davon aus, dass die globale Bevölkerung zu circa 1 % von pulmonaler Hypertonie betroffen ist und über 65-jährige Menschen sogar zu 10 % veränderte Druckverhältnisse aufweisen (Hoepfer, Ghofrani et al. 2017). Wie bereits genannt, beschreibt der Begriff der pulmonalen Hypertonie weniger eine Erkrankung, als vielmehr einen hämodynamischen Zustand. Dieser veränderte Blutdruck im

Lungenkreislauf kann allerdings eine Vielzahl von Ursachen besitzen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt die Pulmonale Hypertonie in fünf Untergruppen (Simonneau, Galie et al. 2004, Hoeper, Ghofrani et al. 2017). Die Klassifikation beinhaltet in den einzelnen Gruppen jeweils Erkrankungen mit ähnlichen pathologischen und haemodynamischen Charakteristika, sowie gleichen Behandlungsweisen (Simonneau, Gatzoulis et al. 2013). Diese fünf Untergruppen werden zusätzlich je nach Genese der Erkrankung in weitere Untergruppen unterteilt.

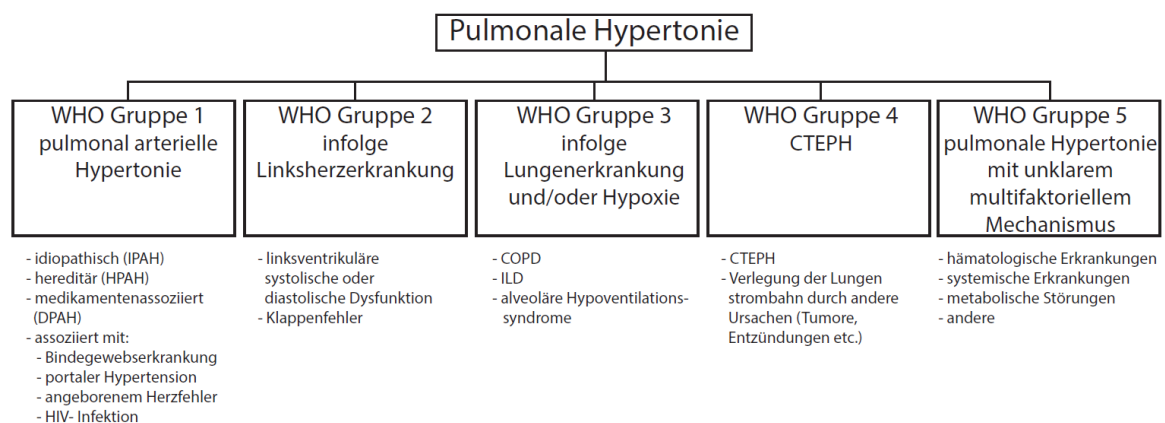


Abbildung 1: Klassifizierung der pulmonalen Hypertonie modifiziert nach Galie N, Humbert M, Vachieri JL, et al.

In Gruppe 1 ist die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) aufgeführt, welche weitere Untergruppen beinhaltet. Neben dem erhöhten Blutdruck in den Gefäßen zeigen sich zusätzlich weitere Arteriopathien, wie eine verdickte *Tunica intima, media* oder *adventitia* der peripher gelegenen Arterien. Eine zusätzliche Muskularisation der präkapillaren Arteriolen wird ebenfalls beobachtet (Firth, Mandel et al. 2010). Diese Veränderungen resultieren im weiteren Verlauf in plexiformen Läsionen. Grund für diese sind die Proliferation der Endothelzellen, Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen, sowie eine Ansammlung der zirkulierenden Entzündungs- und Vorläuferzellen (Tuder, Groves et al. 1994). Diese genannten Veränderungen führen zu einem erhöhten präkapillaren Blutdruck und einem Anstieg des Druckes in der rechten Herzkammer, der final zu einem Rechtsherzversagen führen kann (Naeije and Manes 2014). Die 5-Jahres-Überlebenszahlen der PAH sind mit 65,4 % vergleichsweise niedrig (Farber, Miller et al. 2015).

Die erste Untergruppe der PAH ist die idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH). Bei dieser Form der PAH ist derzeit keine bestimmte Ursache bekannt (Firth, Mandel et al. 2010).

Bei der zweiten Untergruppe handelt es sich um die Gruppe der *hereditären*, also vererbten Varianten (HPAH). Hier sind familiäre Zusammenhänge bekannt und einige Signalwege identifiziert, welche für die Entstehung der HPAH verantwortlich sind. Fälle innerhalb einer Familie zeigen häufig ähnliche klinische und histopathologische Eigenschaften, was für dieselbe Ursache spricht (Machado, Aldred et al. 2006). Verantwortlich für die Erkrankung sind bekanntermaßen die Gruppen der *Bone morphogenetic protein*-Signalwege (BMPs) und die der *Transforming-growth-factor- β* -Signalwege (TGF- β) (Graf, Haimel et al. 2018). Bereits nachgewiesen sind dort die Mutationen der Gene *BMPR2* (*Bone morphogenetic protein receptor 2*), *ACVRL1* (*Activin A receptor like type 1*), *CAV1* (*Caveolin 1*), *ENG* (*Endoglin*) und *SMAD-9* (*Mothers against decapentaplegic homolog 9*) (Garcia-Rivas, Jerjes-Sanchez et al. 2017, Morrell NW 2018). 70 % der Familien, welche eine HPAH aufweisen, haben eine nachgewiesene Mutation auf dem Genlocus 2q33, welcher das Gen des *BMPR2* enthält. Des Weiteren zeigen auch 25 % der Personen, die an einer IPAH erkrankt sind eine Mutation an dieser Stelle (Morrell 2006). Patienten welche eine Mutation des *BMPR2* aufweisen, sind im Verhältnis jünger und präsentieren eine stärkere Manifestation der Erkrankung (Evans, Girerd et al. 2016). Mutationen im Transkriptionsfaktor *TBX4* (*T-Box Transcription Factor 4*), einem wichtigen Regulator in der embryonalen Entwicklung, wurden bei Kindern, welche an PAH erkrankt sind, nachgewiesen (Graf, Haimel et al. 2018).

Bei der dritten Untergruppe der PAH handelt es sich um medikamentenassoziierte Varianten der PAH (DPAH), die jedoch in der Gesamtheit der Fälle lediglich einen Anteil von 10,5 % der Erkrankten in der Gruppe der PAH ausmachen (McGee, Whitehead et al. 2018). Auslösende Medikamente sind vor allem Anorektika, wie zum Beispiel Aminorex, Fenfluramin oder Dexfenfluramin, die den Serotonin-, Noradrenalin- und Dopaminspiegel erhöhen und somit zu einem verringerten Hungergefühl führen (Eddahibi 2001, McGee, Whitehead et al. 2018). Diese Medikamente wirken hemmend auf die Wiederaufnahme von Serotonin, jedoch nicht nur zentral in Neuronen im Gehirn, sondern auch in Thrombozyten, pulmonalen Endothelzellen und glatten Muskelzellen, da diese einen identischen Serotonin-Transporter besitzen (Ramamoorthy S and Chang AS 1993). Dieser Transporter

steht im Verdacht, mitverantwortlich für die Proliferation der glatten Muskelzellen zu sein (Eddahibi, et al. 1999). Da zusätzlich die Expression dieses Transporters in Lungenarterien deutlich höher als im menschlichen Gehirn zu sein scheint, lässt dies vermuten, dass eine erhöhte Expression eine direkte Auswirkung auf die Proliferation der glatten Muskelzellen in der PAH hat (Ramamoorthy S and Chang AS 1993, Eddahibi 2001). Diese Medikamente wurden vom Markt genommen, nachdem sie mit der Entstehung von PAH in Zusammenhang gebracht wurden (Koch 1998). Ein weiteres Medikament, welches auch im Verdacht steht PAH auszulösen, ist der Proteinkinaseinhibitor Dasatinib. Dasatinib wird bei der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie eingesetzt (Simonneau, Gatzoulis et al. 2013). Es wird angenommen, dass dieses Präparat in pulmonalen Gefäßen eine Schädigung der Endothelzellen hervorruft, was eine anschließende Vasokonstriktion zur Folge hat (Ozgun Yurttas and Eskazan 2018). Erstmals wurde 1993 erwähnt, dass eine Verbindung zwischen dem Gebrauch von Methamphetaminen und PAH besteht (Schaiberger, Kennedy et al. 1993). Patienten mit einer Methamphetamin-assoziierten PAH (Meth-APAH) zeigen deutliche plexiforme Läsionen und schlitzförmige Kanäle im arteriellen Lumen und haben lediglich eine 5-Jahres-Überlebensrate von 47,2 % (Ramirez, Perez et al. 2018).

Weitere Ursachen für die Entstehung der PAH liegen in bestimmten Vorerkrankungen, so wird eine Erkrankung mit systemischer Sklerose (SSc) in Verbindung mit PAH gebracht. Eine groß angelegte Metaanalyse zeigte, dass 9 % der an SSc erkrankten Personen an einer präkapillaren PH leiden und eine 1-Jahres-Überlebensrate zwischen 78-93 % aufweisen (Avouac, Airo et al. 2010, Condliffe and Howard 2015). Ein ebenso auslösender Faktor für eine PAH kann die Infektion mit humanem Immundefizienzvirus (HIV) sein (Almodovar, Hsue et al. 2011). Mehrere virale Proteine des HI-Virus scheinen in der Pathogenese eine Rolle zu spielen, wobei der genaue Mechanismus der Entstehung immer noch unklar zu sein scheint (Jarrett and Barnett 2017).

In Gruppe 2 der WHO-Klassifizierung werden pulmonale Hypertonien aufgeführt, welche infolge einer Linksherzerkrankung entstehen. In diesem Fall entsteht die pulmonale Hypertonie sekundär zu einer linksventrikulären Veränderung in Form von beeinträchtigter Relaxation und Dehnbarkeit. Dieser chronisch kardiogen erhöhte Blutdruck führt in den pulmonalen Kapillaren zu einer Kaskade von anatomischen

und funktionellen Effekten (Guazzi and Arena 2010). Der erhöhte Druck ist Folge eines Rückstaus aus dem Herzen in die Lunge und wird deshalb als postkapillär bezeichnet (Rosenkranz, Gibbs et al. 2016). Ursachen für den Rückstau in die Lungengefäße können unter anderem systolisch und/oder diastolisch linksventrikuläre Dysfunktionen darstellen. Auch Mitralklappeninsuffizienzen oder -stenosen führen zu einer Druckerhöhung in den Lungengefäßen (Martinez, Bernard et al. 2016). Bei verringerter passiver Dehnbarkeit (*Compliance*) des linken Vorhofes oder einer erhöhten Nachlast infolge von verlegten abführenden Gefäßen des Herzens (z.B. Aorta) erhöht sich der Druck in den Pulmonalgefäßen ebenfalls (Maeder, Schoch et al. 2017). Bei dieser Art der pulmonalen Hypertonie ist ein hoher Lungenkapillar-Verschlussdruck (PAWP) bei gleichzeitig geringem transpulmonalem Gradienten und pulmonal-vaskulärem Widerstand (PVR) vorhanden (Guazzi and Borlaug 2012). Circa 65-80 % der pulmonalen Hypertonien fallen in die Gruppe 2 der WHO (Rosenkranz, Gibbs et al. 2016). Die Diagnosestellung der einzelnen Formen sollte gewissenhaft und genau durchgeführt werden, da Therapieoptionen für die PAH bei der PH aufgrund von Linksherzerkrankungen unwirksam sein können. Der Grund dafür liegt in der unterschiedlichen Genese und somit auch in verschiedenen Entstehungsmechanismen (Rosenkranz 2015).

Gruppe 3 der WHO fasst pulmonale Hypertonien zusammen, welche aufgrund von Lungenerkrankungen entstehen. Zugrundeliegende Erkrankungen sind unter anderem die chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD), die interstitielle Lungenerkrankung (ILD) und das alveoläre Hypoventilationssyndrom. Die Ätiologie dieser Form der PH ist sehr komplex und multifaktoriell (Nathan, Barbera et al. 2019). Bei der COPD handelt es sich um eine Erkrankung, die mit chronischer systemischer Inflammation einhergeht. Zusätzlich ist die COPD häufig mit Komorbiditäten vergesellschaftet (Negewo, Gibson et al. 2015). Patienten, die eine PAH aufgrund einer COPD aufweisen, haben eine deutlich schlechtere Prognose als Patienten, die nur an einer COPD erkrankt sind (Medrek, Sharafkhaneh et al. 2017). Patienten mit COPD zeigen unter Anstrengung einen schnellen Anstieg des mPAP, was für einen Verlust der Dehnbarkeit der Lungengefäße und der Fähigkeit zur Gefäßneubildung spricht (Boerrigter, Bogaard et al. 2012). Die histopathologischen Veränderungen bei diesen Patienten zeigen erstaunlicherweise eine große Übereinstimmung mit denen der IPAH (Nathan, Barbera et al. 2019).

Bei der ILD handelt es sich um eine Kombination aus chronischer Inflammation innerhalb der Lunge, welche zum einen aus Ansammlungen von Entzündungszellen (vor allem Lymphozyten und Makrophagen) und zum anderen aus erhöhten Konzentrationen von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Zelloberflächenproteinen besteht. Zusätzlich ist sie durch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Lungenfibrose, welche häufig durch schlechte Umwelteinflüsse oder Arzneimitteleinnahme entsteht, geprägt (Bagnato and Harari 2015, Kalchiem-Dekel, Galvin et al. 2018). Patienten, die an ILD erkrankt sind, zeigen eine erhöhte Gefährdung, an PH zu erkranken (Seeger, Adir et al. 2013).

Das alveoläre Hypoventilationssyndrom stellt eine Gasaustauschstörung innerhalb der Lunge dar, die durch unzureichende Gasbewegung zustande kommt. Folgen davon sind eine Hyperkapnie und damit einhergehende Hypoxämie (Desole S 2008). Bei andauernder Hypoxämie wandelt sich die anfängliche Vasokonstriktion zu einer Proliferation der Gefäße um, was dann zu einem erhöhten Gefäßwiderstand führt (Rabinovitch M 1979). Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Hypoxie eine wichtige Komponente bei der Entstehung der pulmonalen Hypertonie infolge chronischer Lungenerkrankungen darstellt (MacNee 1994), jedoch ist der genaue Vorgang zur Entwicklung einer PH aufgrund einer primären Lungenerkrankung nicht schlussendlich geklärt (Desole S 2008).

In Gruppe 4 werden pulmonale Hypertonien zusammengefasst, die aufgrund von Verlegungen der Strombahnen entstehen. Hierbei ist die chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) zu erwähnen. Sie entsteht hauptsächlich bei Patienten mit Emboli oder venösen Thrombosen, welche nicht aufgelöst werden. Diese bilden in den Gefäßen eine Obstruktion mit anschließenden Umbauprozessen, was zu einem erhöhten PVR führt, der schlussendlich ein Herzversagen mit tödlichen Folgen hervorrufen kann (Moser KM 1990, Fedullo, Kerr et al. 2011).

Die einzige Möglichkeit, Patienten mit einer CTEPH zu behandeln, liegt in der chirurgischen Entfernung der Obstruktion (Pepke-Zaba, Delcroix et al. 2011). Des Weiteren kann eine Verlegung gleichermaßen durch pathologische Prozesse, wie Tumoren oder Entzündungen auftreten.

Als letzte Gruppe werden pulmonale Hypertonien mit unklarem multifaktoriellem Mechanismus zusammengefasst. Für das Entstehen einer PH sind hier vor allem hämatologische, systemische und metabolische Erkrankungen verantwortlich. Zudem werden myeloproliferative Erkrankungen in den Zusammenhang mit PH gebracht (Kalantari and Gomberg-Maitland 2016). Aber auch Splenektomie und die Sichelzellanämie oder die Thalassämie stellen Risikofaktoren für die Ausprägung der PH dar (Aessopos and Farmakis 2005, Jais, loos et al. 2005, Simonneau, Robbins et al. 2009). Bei den systemischen Erkrankungen sind Sarkoidose und die pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose (PLCH) als auslösende Faktoren zu erwähnen (Handa T 2006, Le Pavec, Lorillon et al. 2012). Bei den metabolischen Erkrankungen werden besonders drei Grunderkrankungen erwähnt, zum einen die Thyreoiderkrankung, die Glykogenspeicherkrankheit und die lysosomale Speicherkrankheit Morbus Gaucher (Kalantari and Gomberg-Maitland 2016).

In allen Gruppen der pulmonalen Hypertonie unterscheiden sich die Zahlen der Prävalenzen, als auch die der Inzidenzen teilweise bedeutend. So lag 2014 in Deutschland bei der pulmonal-arteriellen Hypertonie eine Inzidenz von 3,9 pro 1 Million Einwohnern und bei der chronisch thromboembolischen Form eine Inzidenz von 4,0 pro 1 Million vor (Hoeper, Ghofrani et al. 2017), wohingegen die Prävalenz im gleichen Jahr bei 25,9 pro 1 Million Einwohnern lag (Hoeper, Huscher et al. 2016). Verglichen mit anderen europäischen Ländern treten in Deutschland ähnliche Häufigkeiten bei pulmonal-arterieller Hypertonie auf (Hoeper, Huscher et al. 2016). Im Geschlechterverhältnis erkranken Frauen mit 1,7:1 deutlich häufiger als Männer (Rich, Dantzker et al. 1987). Über die Häufigkeiten der weiteren Formen der pulmonalen Hypertonie sind jedoch nur wenige genaue Zahlen bekannt. Das hängt damit zusammen, dass die ursächliche Erkrankung lediglich einen auslösenden Faktor für die pulmonale Hypertonie darstellt und somit häufig als primäre Erkrankung angesehen wird. Es werden vermutlich viele Patienten mit einer Linksherzerkrankung, welche schlussendlich eine daraus resultierende postkapillare pulmonale Hypertonie entwickeln, nicht in Statistiken über pulmonale Hypertonie einbezogen. Realistisch ist, dass circa 65-80 % aller pulmonalen Hypertonien die Folge einer Linksherzerkrankung sind, was vermuten lässt, dass sie deutlich häufiger auftreten als zum Beispiel pulmonal-arterielle Hypertonien (Rosenkranz, Gibbs et al. 2016).

1.1.2 Ätiologie und Genese der PAH

1.1.2.1 BMPR2

Bei 70-80 % der Patienten, welche mit HPAH erkrankt sind, liegt eine Mutation des *Bone Morphogenetic Protein Receptor 2* (BMPR2) zugrunde (Machado, Aldred et al. 2006, Pousada, Balaira et al. 2014). Das Gen des BMPR2 ist auf Chromosom 2 (2q33) lokalisiert (Machado et al. 2006). Der BMPR2 ist ein Transmembranrezeptor, welcher als Serin/Threonin-Kinase zur Superfamilie der *Transforming-Growth Factor- β* (TGF- β) gehört und *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) binden kann. Diese sind verantwortlich für Embryogenese, Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose (Upton and Morrell 2013, Orriols, Gomez-Puerto et al. 2017). Mutationen bei Liganden der TGF- β führen zur Entwicklung einer Vielzahl von Krankheiten wie zum Beispiel der erblichen Chondrodysplasie oder dem Syndrom der persistierenden Müllerschen Gänge (PMDS) (Massagué, Blain et al. 2000). BMPs gehören zu der größten Gruppe der Zytokine und wurden ursprünglich als regulierende Moleküle im Wachstum und der Differenzierung des Knochens und des Knorpels entdeckt (Miyazono, Maeda et al. 2005). Mittlerweile ist bekannt, dass sie in vielen weiteren Zellen, unter anderem in mesenchymalen und epithelialen Zellen multifunktionale Aufgaben einnehmen (Kawabata, Imamura et al. 1998). Der BMPR2 bildet mit einem weiteren BMPR2 und zwei BMPR1 ein Heterotetramer, welches in der Zellmembran vorliegt (Mundy, Oyajobi et al. 2008). Dieser Rezeptorkomplex leitet einen intrazellulär verlaufenden Signalweg ein, sobald ein passender Ligand daran bindet (Kim, Park et al. 2017). Passende Liganden können BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, sowie *Growth and Differentiation Factor-5* und *-6* (GDF-5 und GDF-6) sein (Morrell 2006). Der BMPR2 phosphoryliert nach Bindung eine Glycin-Serin reiche Domäne am intrazellulären Ende des BMPR1, welcher wiederum zytoplasmatische Signalproteine phosphoryliert (Morrell 2006). Bei diesen Signalproteinen handelt es sich um SMAD-Proteine (SMAD-1, SMAD-5, SMAD-8), die ebenfalls zur TGF- β gehören und aufgrund ihrer rezeptorvermittelten Aktivierung R-SMADs genannt werden (Macias, Martin-Malpartida et al. 2015). SMAD-Proteine bestehen aus zwei Domänen. Zum einen bestehen sie aus einer N-terminalen Domäne, welche eine Bindung an DNA ermöglicht und zum anderen aus einer C-terminalen Domäne, welche Bindungen an Proteine ermöglicht (Massague 2012). Diese R-SMADs verbinden sich über ihre C-terminale Domäne mit einem SMAD-4, das als Partner

angesehen und deshalb als Co-SMAD bezeichnet wird (Heldin, Miyazono et al. 1997, Massague, Seoane et al. 2005). Dieser entstandene Komplex ist nun in der Lage, in den Nukleus zu gelangen um dort über verschiedene Mechanismen an die DNA zu binden. Zum einen kann der Komplex über die N-terminale Domäne der R-SMADs direkt an die DNA binden, zum anderen besteht die Möglichkeit, Coaktivatoren oder Corepressoren zu aktivieren (Massague, Seoane et al. 2005). Somit ist der BMP-Signalweg befähigt, direkt Einfluss auf die Transkription der DNA zu nehmen (Heldin, Miyazono et al. 1997). Ein Funktionsverlust oder eine Reduktion der BMPR2-Expression, hervorgerufen durch eine Mutation, hat zur Folge dass sich eine PAH entwickeln kann (Upton and Morrell 2013). Des Weiteren können Störungen im Ablauf des BMP-Signalweges zu Skeletterkrankungen, weiteren Gefäßerkrankungen und Krebs führen (Morrell, Bloch et al. 2016).

1.1.2.2 EPDR1

Ependymin-related Proteine (EPDRs) wurden mittlerweile in verschiedensten Geweben entdeckt, wobei deren Funktionen immer noch nicht endgültig erforscht sind (Park, Kim et al. 2019). EPDRs ähneln dem Ependymin, welches ursprünglich in der extrazellulären und zerebrospinalen Flüssigkeit des Hirns von Knochenfischen gefunden wurde und dort das am häufigsten vorkommende Glykoprotein darstellt. Studien zeigten, dass es vor allem in der Festigung von Erinnerungen, der neuronalen Regeneration und der Calcium-Homöostase eine wichtige Rolle einnimmt (Shashoua 1991, Schmidt 1995). Die in Säugetieren existierenden, ähnlich aufgebauten Proteine werden *Mammalian Ependymin Related Proteins* (MERPs) genannt und kommen sowohl bei Mäusen, als auch bei Menschen in den verschiedensten Geweben aber auch Krebszellen vor (Apostolopoulos, Sparrow et al. 2001, Gregorio-King, McLeod et al. 2002) und übernehmen dort auch nicht-neuronale Aufgaben (McDougall, Hammond et al. 2018). Studien zeigen, dass die humane Form vor allem erhöhte Transkriptionslevel in Darmkrebszellen aufweist, woraufhin das Gen *Upregulated in Colorectal Cancer Gen 1* (UCC1) benannt wurde (Nimmrich, Erdmann et al. 2001). Im weiteren Verlauf werden sämtliche Formen „EPDR1“ bezeichnet. Bei der Therapie der PAH stellt das Ansprechen der unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten eine grundlegende Säule zur Verbesserung der Behandlungserfolge dar. Ein geringer Anteil der Patienten weist eine

Vasodilatator-responsive Form der PAH auf, ein deutlich größerer Teil hingegen reagiert nicht-responsiv auf Vasodilatoren. Eine Arbeitsgruppe um Hemnes *et al.* hat bei diesen beiden Gruppen die Unterschiede in kultivierten Lymphozyten und peripherem Blut genauer untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass eine Reihe von Genen unterschiedlich stark in den beiden Gruppen exprimiert ist. Bei einem dieser in beiden Gruppen unterschiedlich exprimierten Genen handelt es sich um EPDR1, welcher bei Vasodilatator-responsiven Patienten signifikant hochreguliert ist. Anhand der 25 in der Arbeit gefundenen Gene, lässt sich bei betroffenen Personen eine Aussage treffen, ob der Einsatz eines Vasodilatators in Frage kommt (Hemnes, Trammell *et al.* 2015). In diesem Zusammenhang besteht die Vermutung, dass EPDR1 in der Entstehung der pulmonalen Hypertonie eine Rolle spielt.

1.1.3 Diagnostik

Patienten, welche an einer PAH erkrankt sind, präsentieren sich häufig mit unspezifischen Symptomen und weisen kein pathognomonisches Bild auf. Eine häufig zu sehende Einschränkung stellt eine Belastungsdyspnoe dar (Montani, Gunther *et al.* 2013). Die durchschnittliche Dauer zwischen Auftreten der ersten Symptome bis zur Diagnosestellung beträgt in der Regel bis zu zwei Jahre, wobei in 10 % der Patienten sogar nach drei Jahren noch keine Diagnosestellung stattgefunden hat (Rich, Dantzker *et al.* 1987). Müdigkeit, *Angina pectoris* („Brustenge“) und Synkopen, welche vor allem nach Anstrengung auftreten, deuten häufig auf eine kardiale Beeinträchtigung hin (Rubin 1997). Spätere Symptome, wie ein Anschwellen des Bauchs als Folge einer Aszites oder Ödeme an den Gliedmaßen, sind erst bei bereits bestehendem Rechtsherzversagen zu beobachten (Lau, Tamura *et al.* 2015). Aufgrund der unspezifischen Symptome, wird der genauen Diagnosestellung eine große Relevanz zugesprochen, um einer Verschlechterung der Erkrankung früh entgegenwirken zu können.

Die Diagnosestellung der PAH benötigt genaue Untersuchungen, wie zum Beispiel das Elektrokardiogramm, die transthorakale Echokardiographie oder das Röntgen. Der Lungenfunktionstest, die Blutgasanalyse, die Computertomographie oder Belastungstests können weitere Hinweise auf eine Erkrankung liefern (Montani, Gunther *et al.* 2013). Nicht nur die Ätiologie, sondern auch der Schweregrad der Erkrankung kann durch die Erfassung der Symptome und die ausführliche

Untersuchung des Patienten bestimmt werden (Lau, Tamura et al. 2015). Die Wichtigsten dieser diagnostischen Methoden werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer erklärt.

1.1.3.1 Anatomie und Physiologie des rechten Ventrikels

Der rechte Ventrikel stellt eine der beiden Herzkammern dar. Er besitzt eine komplexe Struktur und besteht hauptsächlich aus drei Anteilen. Dies sind zum einen der Einflusstrakt, die trabekuläre Spitze und der Ausflusstrakt (Perdhana and Purnomo 2018). Die Muskelmasse des rechten Ventrikels beträgt nur etwa ein Sechstel der Muskelmasse des linken Ventrikels. Er pumpt venöses Blut in den Lungenkreislauf und benötigt dafür einen geringeren Druck als die linke Herzhälfte für den Körperkreislauf. Die rechte Herzhälfte pumpt das gleiche Volumen, wie die linke Herzhälfte, jedoch aufgrund des verminderten pulmonalen Widerstandes mit lediglich ungefähr 25 % der linksventrikulär benötigten Kraft (Voelkel, Quaife et al. 2006). Das venöse Blut fließt über die Hohlvenen in den rechten Vorhof und gelangt von dort durch die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel. Dieser pumpt durch eine Einwärtsbewegung und einen Zug der freien Wand sowie durch eine hauptsächlich längsverlaufende Kontraktion der Kammer, das Blut durch die Pulmonalklappe in die Pulmonalgefäße (Kukulski, Hubbert et al. 2000, Moceri, Baudouy et al. 2014). Der rechte Ventrikel reagiert mit Dilatation oder Hypertrophie sehr sensibel auf Erhöhungen im pulmonal-vaskulären Widerstand und einer damit einhergehenden Druck- oder Volumenüberladung (Dias, Assad et al. 2002, Chin, Kim et al. 2005).

1.1.3.2 Ultraschall

Die Untersuchung des Herzens mittels Ultraschall (Echokardiographie) wird transthorakal durchgeführt und bietet die beste Möglichkeit nicht-invasiv und kostengünstig eine große Anzahl an Messwerten zu generieren (Moceri, Baudouy et al. 2014). Sie lässt eine Unterscheidung zwischen kongenitalen, valvulären und myokardialen Ursachen zu und ermöglicht, eine Abschätzung der systolischen Druckverhältnisse in den Pulmonalarterien zu treffen (Martin-Duran, Larman et al. 1986). Ein präkapillarer Rückstau führt in der rechten Herzhälfte zu einer Trikuspidalinsuffizienz, welche mittels Doppler-Sonographie dargestellt werden kann.

Dabei lässt sich die Druckerhöhung aufgrund des Höchstwertes der Insuffizienz in der Trikuspidalklappe abschätzen (Hellenkamp, Unsöld et al. 2018). Der Druck im rechten Vorhof (RAP) kann ebenfalls nicht gemessen werden, sondern wird aufgrund des sich während Inspiration verändernden Durchmessers der Vena cava inferior beurteilt (siehe Tabelle 1). Zur Abschätzung des pulmonal-arteriellen systolischen Druckes (PASP) wird die modifizierte Bernoulli-Gleichung angewendet. Diese Formel bezieht den zuvor geschätzten RAP und den Grad der Trikuspidalinsuffizienz mit ein (Parasuraman, Walker et al. 2016). Die errechneten Werte korrelieren sehr gut mit Werten, welche mittels Rechtsherzkatheterisierung erhoben wurden (Yock and Popp 1984, Currie, Seward et al. 1985).

$$PASP = 4[TR_{max}]^2 + RAP$$

<i>PASP</i> =	pulmonal-arterieller systolischer Druck
<i>TR_{max}</i> =	Gradient der Trikuspidalinsuffizienz
<i>RAP</i> =	Druck im rechten Vorhof

Zudem kann der Durchmesser beziehungsweise die Größe des rechten Ventrikels untersucht werden, der bei fortgeschrittener Erkrankung bereits dilatiert ist. Die Funktion des interventrikularen Septums gibt ebenfalls einen Anhaltspunkt für den Fortschritt der Erkrankung und damit der Schädigung des Herzens. Ein veränderter Durchmesser der Pulmonalarterien ist mit der Echokardiographie gleichermaßen darstellbar (Galie, Hoeper et al. 2009, Rudski, Lai et al. 2010, Lau, Tamura et al. 2015).

Tabelle 1: Bestimmung des Drucks im rechten Vorhof anhand des sich während der Inspiration verändernden Durchmessers der V. cava inferior.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Inc., Copyright © 2015 (Galiè, Humbert et al. 2015)

Durchmesser V. cava inferior	Grad des Kollaps während der Inspiration	Druck im rechten Vorhof (RAP)
< 2,1 cm	> 50%	3 mmHg (0-5 mmHg)
> 2,1 cm	< 50% oder < 20% bei geringer Inspiration	15 mmHg (10-20 mmHg)
In Szenarien, in denen die in der Tabelle angegebenen Werte nicht übereinstimmen, wird von einem mittleren Wert von 8 mmHg (5-10 mmHg) ausgegangen.		

Als abschließendes Ziel der echokardiographischen Untersuchung sollte stets die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung mit PH formuliert werden. Hierfür dient die von der European Society of Cardiology (ESC) und der European Respiratory Society (ERS) entwickelte Tabelle 2 als Grundlage (Galiè, Humbert et al. 2015).

Tabelle 2: Beurteilung der Wahrscheinlichkeit für eine PH anhand der Trikuspidalregurgitation.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Inc., Copyright © 2015 (Galiè, Humbert et al. 2015)

Höchstwert der Geschwindigkeit der Trikuspidalregurgitation (m/s)	Vorliegen weiterer Zeichen einer PH im Ultraschall	Echokardiographische Wahrscheinlichkeit für eine PH
≤ 2,8 oder nicht messbar	nein	niedrig
≤ 2,8 oder nicht messbar	ja	mittel
2,9 – 3,4	nein	
2,9 – 3,4	ja	hoch
> 3,4	nicht nötig	

1.1.3.3 Elektrokardiogramm

Das Elektrokardiogramm (EKG) kann in der Diagnosestellung unterstützend wirken, jedoch lässt ein normales EKG keine Erkrankung mit Pulmonaler Hypertonie ausschließen. Veränderungen im EKG sind vornehmlich bei schwerer Erkrankung zu sehen (Galiè, Humbert et al. 2015). Zu diesen Veränderungen zählen unter anderem ein P-Pulmonale, welches sich im EKG als eine Erhöhung der P-Welle um mehr als 0,2 mV darstellt und ein Zeichen für eine Druck- bzw. Volumenbelastung des rechten

Vorhofs ist. Des Weiteren sind im EKG Achsenabweichungen nach rechts und rechtsventrikuläre Hypertrophien mögliche Charakteristika einer Erkrankung mit PH (Bonderman, Wexberg et al. 2011). Eine Verlängerung des QRS-Komplexes und der QT-Zeit sprechen für eine starke Ausprägung der Erkrankung mit Pulmonaler Hypertonie (Rich, Thenappan et al. 2013).

1.1.3.4 Lungenfunktionstest und Blutgasanalyse

Lungenfunktionstests und Blutgasanalysen können eine Beteiligung von zugrundeliegenden Erkrankungen der Atemwege oder des Parenchyms aufdecken. Normalerweise zeigen Patienten mit einer PAH eine moderate Reduktion des Lungenvolumens. Die Diffusionskapazität der Patienten mit PAH kann physiologisch sein, wobei die meisten eine verminderte Diffusionskapazität für Kohlenstoffmonoxid (CO) aufweisen. Sollte die Diffusionskapazität weniger als 45 % des normalen Wertes betragen, deutet dies auf ein schlechtes *Outcome* des Patienten hin (Sun, Hansen et al. 2003, Trip, Nossent et al. 2013). Bei einer Erkrankung mit PAH, sind normalerweise der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO₂) in Ruhezustand normal und der arterielle Kohlenstoffdioxidpartialdruck (PaCO₂) verringert (Hoepfer, Pletz et al. 2007).

1.1.3.5 Genetische Tests

Über 300 unabhängige Mutationen im Gen des BMPR2 sind mittlerweile bekannt (Machado, Eickelberg et al. 2009). Patienten mit einer spontanen (IPAH) oder einer familiären Form (HPAH) der PH sollten dazu beraten werden, einen genetischen Test durchführen zu lassen. Ist keine genetische Veränderung des BMPR2 vorhanden, kann zusätzlich noch eine etwaige Mutation von ACVRL1 und ENG untersucht werden. Bei einem negativen Befund sind somit die häufigsten Ursachen einer genetischen Komponente ausgeschlossen (Machado, Eickelberg et al. 2009).

1.1.3.6 Bluttest

Bluttests sind für die Diagnosestellung der PH nicht nützlich, stellen aber teilweise ein diagnostisches Mittel für zugrundeliegende Erkrankungen der PH dar. Deshalb sollte routinemäßig eine biochemische und hämatologische Blutuntersuchung, sowie eine Untersuchung der Schilddrüse bei Patienten durchgeführt werden. Weitere Tests, die Aufschluss auf die Leberfunktion geben, sollten ebenfalls in Erwägung gezogen werden. Häufig herrscht, bei Erkrankung mit PH, ein Rückstau in die

Lebergefäße vor, was zu einer Schädigung dieser führen kann (Galiè, Humbert et al. 2015).

1.1.3.7 Computertomographie

Die Computertomographie (CT) ermöglicht es, wichtige Informationen bezüglich vaskulärer, kardialer, parenchymatöser und mediastinaler Veränderungen zu erhalten. Detaillierte Einblicke in das Lungenparenchym lassen interstitielle Lungenerkrankungen und Emphyse erkennen. Eine CT-Angiographie mit Kontrastmittel ist außerdem hilfreich bei der Erkennung einer CTEPH und lässt eine Beurteilung zu, ob diese operabel ist (Ley, Ley-Zaporozhan et al. 2012).

1.1.3.8 Magnetresonanztomographie (MRT)

Bei der Magnetresonanztomographie (MRT) des Herzens, kann der rechte Ventrikel gut reproduzierbar auf Größe, Morphologie und Funktion untersucht werden. Des Weiteren ist diese nicht-invasive Methode der Bildgebung besonders für die Darstellung des Blutflusses, des Schlagvolumens, des Herzzeitvolumens und der pulmonal-arteriellen Dehnbarkeit geeignet. Veränderungen können auf eine Erkrankung mit Pulmonaler Hypertonie hinweisend sein (Galiè, Humbert et al. 2015). Besonders für die Nachverfolgung des Krankheitsverlaufes von Patienten stellt die MRT-Untersuchung eine Methode der Wahl dar (Montani, Gunther et al. 2013).

1.1.4 Therapieoptionen

Die Therapie von Pulmonaler Hypertonie, insbesondere von pulmonal-arterieller Hypertonie, erweist sich als äußerst komplex. Die zugrundeliegende Einteilung des Schweregrades der Erkrankung und das Ansprechen der Therapie müssen permanent mit einbezogen werden und fordern in diesem Zusammenhang eine engmaschige Kontrolle der Patienten. Die *European Society of Cardiology* (ESC) und die *European Respiratory Society* (ERS) schlagen derzeit eine dreistufige Behandlungsstrategie vor (Galiè, Corris et al. 2013, Galiè, Humbert et al. 2015).

1.1.4.1 Stufe eins der Behandlungsstrategie

Die erste Stufe der oben aufgeführten Behandlungsstrategie umfasst neben ausgiebiger Diagnostik ebenfalls symptomatische Therapien, wie Sauerstoffgabe, orale Antikoagulantien und Diurese. Zudem sollte in dieser Behandlungsstufe eine

Überweisung in Spezialzentren erfolgen. Orale Antikoagulantien werden auf der Grundlage gegeben, da postmortale Sektionen von PAH-Patienten zeigten, dass diese häufig an vaskulären thrombotischen Läsionen gelitten haben (Fuster, Steele et al. 1984). Ebenfalls sind häufig Unregelmäßigkeiten in der Koagulation und in den Signalwegen der Fibrinolyse erkennbar (Huber, Beckmann et al. 1994, Hoeper, Sosada et al. 1998, Herve, Humbert et al. 2001). Ein dekompenziertes Rechtsherzversagen kann zu Flüssigkeitsrückstau und erhöhtem venösen Blutdruck führen. Dieser Rückstau betrifft die Leber in Form einer Stauungsleber, was in Aszites und peripheren Ödemen resultieren kann (Stickel, Gin-Sing et al. 2019). Die Gabe von Diuretika bei Patienten mit solchen Symptomen zeigt eine deutliche Verbesserung der Symptome, jedoch sollte im Anschluss an die Medikation eine gute Überwachung der renalen Funktion und des Kalziumhaushaltes durchgeführt werden, um keine Schädigung hervorzurufen (Galiè, Humbert et al. 2015).

1.1.4.2 Stufe zwei der Behandlungsstrategie

Die zweite Stufe der Behandlung sollte nach Möglichkeit in Spezialzentren durchgeführt werden. Sie beinhaltet bevorzugt eine initiale Therapie mit Kalziumkanalblockern bei vasoresponsiven Patienten. Kalziumkanalblocker haben eine blutdrucksenkende und gefäßerweiternde Eigenschaft, welche sich hier zu Nutze gemacht wird (McKeever RG 2020 Jan). Wirkstoffe die verwendet werden können sind: Nifedipin, Diltiazem und Amlodipin (Rich, Kaufmann et al. 1992, Sitbon, Humbert et al. 2005). Die Auswahl des Wirkstoffs beruht weitestgehend auf der Herzfrequenz des Patienten. In diesem Zusammenhang werden Patienten mit einer Bradykardie in Ruhe, bevorzugt mit Nifedipin oder Amlodipin behandelt. Patienten mit einer in Ruhe gemessenen Tachykardie, sollten mit Diltiazem behandelt werden. Die Behandlung fordert eine strikte Überwachung und sollte eine Nachkontrolle alle drei Monate nach sich ziehen, um einen Therapieerfolg aber auch Nebenwirkungen zu registrieren (Galiè, Humbert et al. 2015).

Patienten, welche keine Vasoreaktivität nach Gabe der Kalziumkanalblocker zeigen, sollten nicht damit behandelt werden, da diese ein erhöhtes Risiko von unerwarteten Nebenwirkungen wie Hypotension, Synkopen und Rechtsherzversagen besitzen (Galie, Ussia et al. 1995).

Es sind derzeit drei Signalwege bekannt, die in der Entstehung der PAH eine Rolle spielen. Darunter sind der Endothelin-, der Stickstoffmonoxid- (NO) und der

Prostacyclin-Signalweg (Chester and Yacoub 2014). Diese Signalwege dienen den im Folgenden beschriebenen Strategien und Medikamenten als Behandlungsgrundlage.

Den ersten therapeutischen Ansatz bietet der Einsatz von Phosphodiesterase-5-Hemmern (PDE-5-Hemmer). PDE-5 ist ein Enzym, welches bei Hemmung über den NO/cGMP-Signalweg zu einer Vasodilatation führt. Pulmonale Gefäße beinhalten eine große Menge dieses PDE-5, sodass eine deutliche klinische Besserung bei einer Hemmung zu erreichen ist. Des Weiteren wirken die PDE-5-Hemmer antiproliferativ auf die glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien (Tantini, Manes et al. 2005, Wharton, Strange et al. 2005). Derzeit finden drei Wirkstoffe als PDE-5-Hemmer Anwendung. Der erste Wirkstoff ist Sildenafil, welcher ein selektiver Inhibitor des PDE-5 darstellt. Mehrere Studien zeigen nach Behandlung einen positiven Effekt auf die Leistungsbereitschaft, die Symptome der PH und die Hämodynamik im Patienten (Sastry, Narasimhan et al. 2004, Galie, Ghofrani et al. 2005, Singh, Rohit et al. 2006). Nebenwirkungen sind nur sehr mild bis moderat und umfassen lediglich Kopfschmerzen oder Epistaxis (Galiè, Humbert et al. 2015). Der zweite Wirkstoff ist Tadalafil, welcher einmal täglich verabreicht werden muss. Auch hier zeigen Studien einen positiven Einfluss auf die Leistungsbereitschaft, die Symptome, die Hämodynamik und die Dauer bis zur klinischen Verschlechterung des Patienten (Galie, Brundage et al. 2009). Der dritte Wirkstoff ist Vardenafil, welcher ähnliche positive Eigenschaften wie die beiden bereits aufgeführten Wirkstoffe aufweist. Die Nebenwirkungen sind denen des Sildenafils sehr ähnlich (Jing, Yu et al. 2011).

Das im Prostacyclin-Signalweg wichtige Prostacyclin ist ein starkes kardioprotektives Hormon, welches vorwiegend von Endothelzellen produziert wird und sehr potent die Thrombozytenaggregation inhibiert. Außerdem induziert es eine Vasodilatation, wirkt zytoprotektiv und antiproliferativ (Moncada and Vane 1979, Jones, Benjamin et al. 1995, Mitchell, Ahmetaj-Shala et al. 2014). In Patienten mit PAH wurde eine Dysregulation dieses Hormons festgestellt (Galie, Manes et al. 2003). Die Gabe von Prostacyclin-Analoga stellt sich als adäquates Therapeutikum für die Behandlung der PAH dar. In den frühen 1990er Jahren starteten Mediziner mit der Prostacyclin-Therapie und verzeichneten deutlich erhöhte Überlebensraten bei den Patienten (Hossmann, Auel et al. 1984). Eine 1996 durchgeführte wegweisende Studie belegte

ebenfalls die therapeutische Wirkung der Prostacyclin-Analoga, indem eine Patientengruppe über 12 Wochen eine Prostacyclin-Infusion mit Epoprostenol bekam. Sie wiesen, im Vergleich mit Patienten welche mit der bisher herkömmlichen Therapie behandelt wurden (Antikoagulanzen, orale Vasodilatoren, Diuretika, Herzglykoside und Sauerstoff), deutlich höhere Überlebensraten auf (Barst, Rubin et al. 1996). Der hauptsächliche Nachteil der Behandlung mit Epoprostenol erwies sich in der nur sehr kurzen Halbwertszeit von wenigen Minuten, was eine dauerhafte Verabreichung mittels Venenkatheter und Infusion nach sich zieht. Prostacyclin-Analoga mit einer deutlich längeren Halbwertszeit wurden mit Iloprost und Treprostinil gefunden (Mitchell, Ahmetaj-Shala et al. 2014).

Endothelin-1 (ET-1) ist ein sehr potentes Peptidhormon, welches durch Binden an einen Endothelin-Rezeptor, eine Vasokonstriktion hervorrufen kann. Dieser Endothelin-Rezeptor liegt auf der Oberfläche der glatten Muskelzellen (Davenport, Hyndman et al. 2016). Patienten, die an PAH erkrankt sind, zeigen eine Aktivierung des Endothelin-Systems, sowohl im Lungengewebe, als auch im Plasma. Durch eine Stoffgruppe der Endothelin-Rezeptor-Antagonisten ist es möglich diese Aktivierung des Rezeptors und die damit einhergehende Vasokonstriktion in den Patienten zu minimieren. Hierfür stehen mehrere Wirkstoffe zur Verfügung. Bosentan wurde in mehreren Studien als ein potenter Endothelin-Rezeptor-Antagonist beschrieben und wirkt sich positiv auf die Leistungsbereitschaft, die hämodynamischen Zustände, die Symptome und die Rechtsherzfunktion aus (Chen, Chen et al. 1995, Correale, Ferraretti et al. 2018). Weitere Wirkstoffe sind Ambrisentan und Macitentan (Galie, Badesch et al. 2005, Pulido, Adzerikho et al. 2013).

Eine Kombinationstherapie aus zwei oder mehr dieser Wirkstoffe wirkt sich positiv auf den klinischen Verlauf der Erkrankung aus. Der Grundgedanke dieser Kombination sollte die Behandlung aller drei zugrundeliegenden Signalwege sein (Galiè, Palazzini et al. 2010).

1.1.4.3 Stufe drei der Behandlungsstrategie

Die dritte Stufe dieser Behandlungsstrategie umfasst schlussendlich eine Kontrolle der Patienten auf die Reaktion und die Wirksamkeit der Medikamente. Bei nicht

wirksamer Behandlung zielt die Therapie auf eine Lungentransplantation ab.

1.1.5 Epidemiologie und Überlebenszeit

Zu Beginn der Erfassung der PAH-Erkrankungen wurde von dem US-amerikanischen Gesundheitsinstitut NIH ein mittleres Alter der Erkrankten bei Diagnosestellung von 35 ± 15 Jahren registriert (Rich, Dantzker et al. 1987). In den letzten Jahrzehnten hat jedoch ein starker Wandel in der PAH-Epidemiologie stattgefunden und so steigen die Zahlen der Menschen, die in höherem Alter eine Diagnosestellung erfahren. Aufzeichnungen über PAH-Erkrankungen in Frankreich zeigen derzeit ein mittleres Alter bei Diagnosestellung von 52 ± 15 Jahren (Humbert, Sitbon et al. 2010). Die US-amerikanisch basierte Studie zur Überwachung und Management von PAH-Patienten, „REVEAL“, präsentiert ebenfalls ein mittleres Alter von 35 ± 15 Jahren bei Diagnosestellung. Register aus Großbritannien und Irland, welche sich auf Daten aus einem Zeitraum von 2001-2009 beziehen, zeigen ein mittleres Alter von 45-52 Jahren bei Stellung der Diagnose (Ling, Johnson et al. 2012). Die europäische COMPERA-Studie hat Patientendaten zwischen 2007-2011 ausgewertet und zeigt, dass 64 % aller Patienten älter als 65 Jahre waren (Hoepfer, Huscher et al. 2013). Neben immer älter werdenden Patienten häufen sich zusätzlich auch die Komorbiditäten, welche mit PAH vergesellschaftet sind. So tritt systemische Hypertension bei 27-42 %, Übergewicht bei 30-38 %, Diabetes mellitus Typ 2 bei 14 % und koronare Herzkrankheit bei 10-12 % der Patienten mit PAH zusätzlich auf (Lau, Giannoulatou et al. 2017). Ein Grund für das steigende Alter der Patienten bei Diagnosestellung liegt unter anderem darin, dass ein zunehmendes Bewusstsein für PAH in der Gesellschaft entsteht, es durch Einsatz von Medikamenten Therapiemöglichkeiten gibt und die nicht-invasive Diagnostik mit zum Beispiel Ultraschall, einen immer höheren Stellenwert einnimmt. Zusätzlich wurde vermutlich in der Vergangenheit ein großer Anteil der PAH-Erkrankungen bei älteren Patienten falsch diagnostiziert bzw. aufgrund von Komorbiditäten nicht entdeckt (Halpern and Taichman 2009, Lau, Giannoulatou et al. 2017).

Betrachtet man die Geschlechterverteilung, so erkranken Frauen mit 62-80 % deutlich häufiger als Männer (Humbert, Sitbon et al. 2006, Peacock, Murphy et al. 2007, Badesch, Raskob et al. 2010, Thenappan, Shah et al. 2010, Lee, Ling et al. 2012, Ling, Johnson et al. 2012, Hoepfer, Huscher et al. 2013). Ebenso tragen

Frauen mit 42 % ein deutlich höheres Risiko eine BMPR2-Mutation zu besitzen. Im Vergleich dazu zeigen nur ca. 14 % der Männer eine Mutation im BMPR2, jedoch weisen sie eine deutlich geringere Überlebenszeit gegenüber den Frauen auf (Lau, Giannoulatou et al. 2017).

Überlebenszeiten sind aus den verschiedenen bereits angegebenen Studien und Registern entnommen und sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Überlebenszeiten und –raten bei PAH-Erkrankung

Register	Zeitraum	Ø- Überlebenszeit (Jahre)	1-Jahres- Überlebensrate	3-Jahres- Überlebensrate	5-Jahres- Überlebensrate
NIH	1981- 1985	2,8	68%	48%	34%
Frankreich	2002- 2003		86%		55%
US-REVEAL	2006- 2009		85%	68%	57%
COMPERA	2007- 2011		92%	83%	74%
Frankreich	2007- 2013		97%	94%	83%

1.1.6 PAH in der Tiermedizin

Die pulmonale Hypertonie in der Tiermedizin nimmt einen immer größer werdenden Stellenwert ein. Beim Hund ist sie häufig mit Erkrankungen, wie der myxomatösen Mitralklappenerkrankung, den tromboembolischen und parasitären Erkrankungen, den kongenitalen Shunts im Herzen und verschiedenen respiratorischen Problemen vergesellschaftet (Stepien 2009, Kellihan and Stepien 2012, Borgarelli, Abbott et al. 2015, Visser, Im et al. 2016). Eine der häufigsten Ursachen für die pulmonal-arterielle Hypertonie bei Tieren stellt jedoch die Erkrankung mit Herzwürmern dar, die beim Absterben thrombotische Eigenschaften in den Gefäßen einnehmen und eine pulmonal-arterielle Druckerhöhung auslösen. Auf die mechanische Verlegung der Arterien folgt ein proliferativer Umbauprozess, der irreversible strukturelle Schäden nach sich ziehen und zu einer anhaltenden pulmonalen Hypertonie führen kann (Johnson, Boon et al. 1999). Die am häufigsten vorkommende Klasse der

pulmonalen Hypertension ist die der pulmonalen Hypertension durch Linksherzerkrankungen (Pyle RL 2004). Der zugrundeliegende Mechanismus bei dieser Art der PH ist eine Druckerhöhung im linken Vorhof, sodass es zu einer Abflussstörung aus den Lungengefäßen und einem ansteigenden Druck in diesen kommt (Baldauf 2019). Ein dauerhaft erhöhter Druck in den Pulmonalgefäßen führt unter anderem über ein verschobenes Verhältnis zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation zu einem irreversiblen Umbau der Gefäßwand (Stepien 2009). Hunde, die an einer Mitralklappenendokardiose leiden, zeigen häufig (31%) eine PH (Serres, Chetboul et al. 2007). Andersherum zeigen sogar bis zu 63% der wegen PH vorstellig werdenden Hunde eine Mitralklappenendokardiose (Baldauf 2019). Des Weiteren stellen die dilatative Kardiomyopathie, ein AV-Block 3. Grades, Vorhofflimmern und die Mitralklappendysplasie Ursachen für das Entstehen einer PH aufgrund einer Linksherzerkrankung dar (Borgarelli, Zini et al. 2004). Ein ebenfalls großer Anteil der Pulmonalen Hypertonien entsteht durch Erkrankungen der Atemwege und eine damit einhergehender Hypoxie. Aufgrund einer Vasokonstriktion, die durch eine Hypoxie ausgelöst wird, kommt es zu einem proliferativen Umbauprozess in den Pulmonalgefäßen (Baldauf 2019). Wie schon in der Humanmedizin, kommt auch hier die Echokardiographie als eines der wichtigsten diagnostischen Instrumente in Frage. Eine Untersuchung mittels Rechtsherzkatheter ist jedoch trotzdem die Methode der Wahl, wird aber in der Klinik aufgrund des hohen Aufwandes nicht sehr häufig praktiziert (Reinero, Visser et al.). Die Doppler-Untersuchung ist bei der Bestimmung des pulmonal-arteriellen Drucks (PASP) unerlässlich. Wie bereits unter 2.1.3.2 beschrieben, wird auch in der Tiermedizin die Geschwindigkeit der Trikuspidalregurgitation zur Abschätzung des Druckgradienten zwischen rechtem Ventrikel und rechtem Vorhof genutzt. Hierfür wird ebenfalls die modifizierte Bernoulli-Gleichung verwendet (Serres, Chetboul et al. 2006, Soydan, Kellihan et al. 2015).

Die Therapie stellt sich häufig als schwierig dar, da die zugrundeliegende Erkrankung zunächst erkannt und anschließend richtig behandelt werden muss. Die kausale Erkrankung äußert sich teilweise mit einem progressiven Verlauf und bedarf einer zügigen und strikten Therapie. Aber auch eine symptomatische Therapie der PH ist zwingend nötig und beinhaltet neben Sauerstoff-Supplementierung auch eine Diurese, eine Vasodilatation und eine Bronchodilatation (siehe Tabelle 4) (Baldauf 2019).

Tabelle 4: Medikamente zur Behandlung der PH

Erstellt aus Bach et al. 2006; Baldauf 2019

Wirkstoff/Substanz	Dosierung	Funktion
Sauerstoff	50-100 ml/kg KGW/min (max.4l)	Verbesserung des Ventilations- Perfusions-Verhältnis
Diuretika - Pimobendan - Dobutamin	0,2-0,6 mg/kg KGW/Tag 2,5-20 µg/kg KGW/min im Dauertropf	Entgegenwirken der Kongestionserscheinungen
Antikoagulanzen - Clopidogrel - Aspirin - Heparin - niedermolekulares Heparin	3-4 mg/kg KGW p.o. alle 24h 0,5-10 mg/kg KGW p.o. alle 24h 300-500 IU/kg KGW i.v., dann 100-300 IU/kg KGW s.c. alle 6-8h 0,8 mg/kg KGW s.c. alle 8h	Reduktion der Thromben
Vasodilatoren - Sildenafil	1-3 mg/kg KGW p.o. alle 8- 12h	Vasodilatation und somit Senkung des Blutdrucks

Die Prognose bei Hunden mit PH stellt sich verhalten dar. Es sind mediane Überlebenszeiten zwischen 3-91 Tagen nach Diagnosestellung beschrieben, wobei die Tiere bereits Symptome wie Kollaps, Synkopen, respiratorische Leiden und Husten über einen Zeitraum von 3 Tagen bis 5 Monate zeigten, bevor sie vorstellig wurden (Bach, Rozanski et al. 2006, Brown, Davison et al. 2010), jedoch muss bei Formulierung der Prognose stets die zugrundeliegende Erkrankung mit beurteilt werden (Baldauf 2019).

1.2 MicroRNAs

1.2.1 Entdeckung der microRNAs

MicroRNAs (miR) sind kurze, 21–25 Nukleotide (nt) lange, nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (RNA), die auf post-transkriptioneller Ebene eine Schlüsselrolle in der Regulation der Genexpression einnehmen (Huntzinger and Izaurralde 2011, Ambros and Ruvkun 2018). (Wahid, Shehzad et al. 2010). Lee *et al.* beschrieben 1993 erstmals, dass das im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) vorkommende *lin-4*-Gen für kein Protein, sondern zwei kurze RNA-Moleküle kodiert. Diese beiden RNA-Moleküle, weisen eine Länge von ungefähr 22 und 61 Nukleotiden auf, wobei das längere Molekül eine Haarnadel-Struktur besitzt und als Vorläufer für das kürzere Molekül dient (Lee, Feinbaum et al. 1993, Bhaskaran and Mohan 2014). Die Basenabfolgen dieser beiden RNA-Moleküle zeigen sich als komplementär zu einer sich wiederholenden Basensequenz in der untranslatierten Region des 3`-Endes (3`-UTR) der *messengerRNA* (mRNA), welche vom Gen *lin-14* abgelesen wurde (Wightman, Ha et al. 1993). Durch eine Antisense-Bindung mit der *lin-14* mRNA ist es der *lin-4* RNA möglich, regulatorisch auf diese zu wirken. Die Folge ist eine verminderte Proteinbiosynthese, bei gleichbleibenden *lin-14* mRNA-Leveln (Lee, Feinbaum et al. 1993, Wightman, Ha et al. 1993). Im Jahre 2000 entdeckten zeitgleich zwei Arbeitsgruppen die kurze 21 nt lange RNA *let-7* welche für die Entwicklung eines adulten *C.elegans* aus einem Larvenstadium wichtig ist (Reinhart, Slack et al. 2000, Slack, Basson et al. 2000). Es erwies sich in der Folgezeit, dass diese RNA nicht nur in *C.elegans*, sondern auch in anderen Organismen, wie dem Menschen zu finden ist (Pasquinelli, Reinhart et al. 2000). In den darauf folgenden Jahren entwickelte sich ein großes wissenschaftliches Interesse, was dazu führte, dass immer mehr solcher kurzen, zwischen 19 bis 24 nt langen, nicht-kodierenden und aus einem Vorläufer mit Haarnadel-Struktur entstehenden, RNA-Moleküle entdeckt wurden (Bartel 2004). Die Gruppe dieser RNAs wurde daraufhin offiziell als Klasse der microRNAs (miRNAs) anerkannt (Lau, Lim et al. 2001). Die Online-Registrierung für miRNAs übernimmt die online Datenbank *miRbase Sequence Database*, welche derzeit 38.589 Einträge über Vorläufer (*precursor*) miRNAs mit Haarnadelstruktur in 271 verschiedenen Spezies besitzt und die zu 48.885 prozessierten (maturen) miRNAs führen

(<ftp://mirbase.org/pub/mirbase/22/README> ; Version 22; abgerufen am 21.01.2020 um 15:00 Uhr).

1.2.2 Bedeutung von microRNAs

In der Forschung gewinnen microRNAs zunehmend an Bedeutung. In den Jahren seit 1993 wurden mehrere 10.000 miRs entdeckt und die Zahlen der Veröffentlichungen in einschlägigen Fachzeitschriften verzeichnen einen starken Interessenszuwachs auf dem Gebiet der miRNAs. Verschiedene Forschergruppen äußern die Vermutung, dass zwischen 30-80 % der menschlichen Gene von miRNAs beeinflusst sein könnten, wobei eine miRNA üblicherweise mehr als 100 Gene regulieren kann (Lu and Clark 2012). Das Fehlen oder die Mutation von miRNAs führt häufig zu Krankheiten, Krebs oder phänotypischen Unregelmäßigkeiten (Bartel 2004, Calin and Croce 2006).

1.2.3 Biogenese von microRNAs

Schätzungsweise werden circa 50 % der miRNAs aus nicht-proteinkodierenden Transkripten exprimiert. Der Rest liegt meistens in Introns von kodierenden Genen und wird mit ihnen co-transkribiert und separat prozessiert (Saini, Griffiths-Jones et al. 2007). Auch eine intergenetische Lage ist beschrieben (Olena and Patton 2010). Mit Hilfe einer RNA-Polymerase wird von der DNA ein langes, mehrere Hundert Nukleotide langes Primärtranskript, die pri-miRNA (*primary-microRNA*) transkribiert (Bhaskaran and Mohan 2014). Eine Kürzung der pri-miRNA erfolgt durch einen Multiproteinkomplex der aus der RNase III *Drosha* und dem RNA-bindenden Protein *Pasha* (DGCR8) besteht (Lee, Ahn et al. 2003). Die entstandene pre-miRNA (*precursor*) besitzt eine Länge von circa 70 Nukleotiden und eine typische Haarnadelstruktur, wobei sie ein Phosphat am 5`-Ende und einen ~2nt langen Überhang am 3`-Ende besitzt (Lee, Jeon et al. 2002, Bhaskaran and Mohan 2014). Die pre-miRNA wird nun aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert, wofür sie von einem Proteinkomplex, welcher aus einem GTP-bindenden Protein (Ran-GTP) und Exportin-5 besteht, gebunden und in das Zytoplasma geschleust wird (Lund, Guttinger et al. 2004, Wu, He et al. 2018).

Dort wird die pre-miRNA schließlich, durch Abschneiden der Haarnadelstruktur, zu einem reifen ~18-23 Nukleotiden langen Doppelstrang gekürzt (Koscianska, Starega-Roslan et al. 2011). Das verantwortliche Enzym hierfür ist die RNase III *Dicer 1*, welche Unterstützung von dsRNA-bindenden Proteinen wie der RNA-aktivierten Proteinkinase und TRBP (*Transaktivationsresponse RNA binding* Protein) erhält (Lee, Ahn et al. 2003, Chendrimada, Gregory et al. 2005, Bhaskaran and Mohan 2014). Der entstandene doppelsträngige miRNA-miRNA*-Strang wird nun durch eine Helikase in Einzelstränge getrennt, sodass ein Hauptstrang (*guide*-Strang) und ein *passenger*-Strang (miRNA*) entsteht. Der Hauptstrang wird von einem Proteinkomplex gebunden, welcher aus Proteinen der Argonaut- (AGO) und GW182-Familie besteht und bildet mit ihnen einen miRISC (*microRNA-induced-silencing-complex*) (Meister and Tuschl 2004). Argonaut-Proteine sind die entscheidende Komponente des Komplexes und besitzen eine PAZ- und eine PIWI-Domäne, welche für das Binden der miRNA zuständig sind. Die PIWI-Domäne weist zusätzlich noch eine Nuklease-Funktion auf, welche für das Zerschneiden der mRNA verantwortlich ist (Ding and Han 2007). Derzeit sind bei Säugetieren vier verschiedene, im miRISC vorkommende, AGO-Proteine (AGO 1-4) bekannt, wobei lediglich AGO 2 eine endonukleolytische Aktivität aufweist (Meister and Tuschl 2004). Der miRNA*-Strang wird in den häufigsten Fällen abgebaut (Okamura, Liu et al. 2009). Der *guide*-Strang führt den Proteinkomplex durch teilweise komplementäre Bindung zu Ziel-mRNAs, bei denen daraufhin die Translation unterdrückt wird (Zeng 2006). Bindet der miRISC komplementär, so kommt es nicht nur zu einer Hemmung der Translation, sondern zu einem kompletten Abbau der mRNA durch die Endonukleaseaktivität des Komplexes (Bartel 2004, Bagga, Bracht et al. 2005, Wienholds and Plasterk 2005).

1.3 Ziel dieser Arbeit

Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, dass Patienten, die an einer hereditären Form der pulmonal-arteriellen Hypertonie leiden, zu 70 % an einer Mutation des BMPR2 leiden (Rabinovitch 2012). Die regulatorischen Eigenschaften des BMPR2 auf die Proliferation von glatten Muskelzellen führen bei einer Mutation zu unkontrolliertem Wachstum der *Tunica media* der Pulmonalgefäße. Diese Proliferation führt schlussendlich zu einer präkapillaren Druckerhöhung in den Gefäßen und darauffolgend auch in der rechten Herzkammer. Yang *et al.* haben in ihrer Arbeit beschrieben, dass die miR-100 eine direkte regulatorische Komponente des BMPR2 darstellt (Yang, Xuebin et al. 2012). Die hier vorliegende Arbeit soll nun den Zusammenhang der miR-100 mit der Entstehung der pulmonal-arteriellen Hypertonie näher untersuchen. Ziel ist es, sowohl *in vitro* mittels transfizierten miR-100 überexprimierenden Zellen, als auch *in vivo* in einem Mausversuch die Zusammenhänge aufzuklären. Eine Kausaltherapie ist nach wie vor bei der Behandlung dieser Erkrankung nicht vorhanden, weshalb eine genaue Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen für diese essentiell ist. Diese Mechanismen genauer zu verstehen und somit etwaige Angriffspunkte für Arzneimittel zu finden, stellt die Motivation dieser Arbeit dar.

2 Material

2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Tabelle 5: Geräte und Gebrauchsgegenstände

Geräte und Gebrauchsgegenstände	Hersteller
Bechergläser 100–600ml	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad GmbH, München, DE
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad GmbH, München, DE
Dampfsterilisator Varioklav Typ 500	H+P Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, DE
Dispergierer/Homogenisator T 10 basic ULTRA-TURRAX®	IKA, Staufen, DE
Einfrierbox Mr. Frosty Cryo	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Eismaschine ZBE 30-10	Ziegra, Isernhagen, DE
Erlenmeyerkolben 100–250 ml	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
Flaschen 100–2000 ml	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
Gefrierschrank -20 °C Öko super	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Schwerte DE
Gelkammern	Bio-Rad GmbH, München, DE
Gene Amp PCR System 2400	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Heizblock Thermomixer F1.5	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Homogenisatorstempel 1,5 ml	neoLab GmbH, Heidelberg, DE
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Kamera AxioCam HR	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Kryoboxen Rotilabo	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kühlschrank +4 °C Premium	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen, DE
Messzylinder	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
Messzylinder 500–1000 ml	Vitlab GmbH, Großostheim, DE

Microtom Microm HM 325	Thermo Fisher Scientific, Schwerte DE
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad GmbH, München, DE
Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad GmbH, München, DE
Pipettboy Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Pipetten 0,1–1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
PowerPAC 300	Bio-Rad GmbH, München, DE
PowerPAC HC	Bio-Rad GmbH, München, DE
Rotilabo-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Rührfische	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
S1000 Thermal Cycler	Bio-Rad GmbH, München, DE
Sicherheitsarbeitsplatz WIBOjekt Economy	Weiss GWE GmbH, Hude, DE
Spectrophotometer Nanodrop 2000-C	Thermo Fisher Scientific, Schwerte DE
Spektrophotometer SpectraMax Plus	Molecular Devices (Germany) GmbH, Biberach an der Riß, DE
Stickstofftank Cryo Med	Thermo Fisher Scientific, Schwerte DE
Ultra-Clear Water Purification System	Siemens, Barsbüttel, DE
Vortexer Genius 3 Vortex	IKA, Staufen, DE
Vortexer Lab Dancer	IKA, Staufen, DE
Vortexer MS2 Minishaker	IKA, Staufen, DE
Waage BP 211 D	Sartorius AG, Göttingen, DE
Waage BP 4100 S	Sartorius AG, Göttingen, DE
Western Blot Imager ChemiDoc	MP System Bio-Rad GmbH, München, DE
Zellkulturbank Safe 2020 1.2	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, DE
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Sorvall Heraeus, Hanau, DE

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
„Microseal B	Bio-Rad, München, DE
6-Well Platte	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
12-Well Platte	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
96-Well Semi-Skirted PCR Plate	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
5 ml-Polystyrol-Röhrchen	BD Falcon™, Heidelberg, DE
Rotilabo®-Einbettkassetten, POM, mit Deckel, L 40 x B 28 x H 6,8 mm	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, DE
Filterpipettenspitzen „Art Tips“ 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Filterpipettenspitzen „Filter Tips“ 0,1–2 µl	Corning Inc., Kaiserslautern, DE
Handschuhe „Gentle Skin“	Meditrade, Kiefersfelden, DE
Hard-Shell®96-Well PCR Plate	Bio-Rad, München, DE
Kanülen 20G, 24G, 26G	B. Braun, Melsungen, DE
Kanülen 30G	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Kryoröhrchen 2 ml	Corning Inc., Kaiserslautern, DE
Küvetten aus Polystyrol	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Immun-Blot® PVDF-Membran	Bio-Rad, München, DE
Objektträger 76 x 26 mm, Mattrand	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
Parafilm M	Bemis Packaging Germany, Rheinbach, DE
Pasteur-Plastikpipetten 3 ml	Ratiolab, Dreieich, DE
Pipettenspitzen 10 µl TipOne	Starlab, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 100–1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, DE
Reaktionsröhrchen 15–50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Maiskeimöl	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Spritzen 1–20 ml	B. Braun, Melsungen, DE

Stabpipetten 5–25 ml	Corning Inc., Kaiserslautern, DE
T175-T25 flasks	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Acrylamid	Applichem GmbH, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE
Bradford-Dye	Bio-Rad GmbH, München, DE
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Chloroform	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (DPBS 1x)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
ECL-Lösungen	GE Healthcare Europe, München, DE
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Endothelial Cell Basal Medium (EBM)	PromoCell, Heidelberg, DE
Essigsäure	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, DE
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, DE
Glycerin	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Igepal	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
IQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München, DE
Isopropanol/2-Propanol	VWR International, Darmstadt, DE
Lipofectamine® RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Magermilchpulver	Bio-Rad GmbH, München, DE
Methanol	VWR International, Darmstadt, DE

Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, DE
Opti-MEM® I (1x) + GlutaMAX™-I	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
PBS-Tabletten	Gibco life Technologies, Darmstadt, DE
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Proteinase Inhibitor Cocktail	BD Biosciences, Heidelberg, DE
RNase away	Molecular BioProducts, San Diego, US- CA
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg, DE
Sojabohne –Trypsin-Inhibitor Typ II	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
TaqMan™ universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
TAqMan™ Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad GmbH, München, DE
Tris Ultra	Appllichem GmbH, Darmstadt, DE
Trizma® base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE

2.4 Puffer und Lösungen

Zellyse

RIPA-Puffer

<u>(Stammlösung)</u>	2,5 ml	Tris-HCl (1 mol/l) (pH 8,0)
	100 µl	EDTA (0,5 M) (pH 8,0)
	1,5 ml	NaCl (5 mol/l)
	5 ml	Igepal 10 %
	5 ml	Natriumdeoxycholat 5 %
	0,5 ml	SDS 10 %
	35,4 ml	H ₂ O

SDS-PAGE

Trenngelpuffer

90,86 g	Trisbase (1,5 mol/l)
H ₂ O zu 500 ml	
NaOH/HCl zur pH-Einstellung (pH 8,8);	

M=121,14g/mol

Sammelgelpuffer

19,7 g	Tris-HCl (0,5 mol/l)
H ₂ O zu 250 ml	
NaOH/HCl zur pH-Einstellung (pH 6,8);	

M=157,6g/mol

Ladepuffer

6 x Stock	0,5 ml	H ₂ O
	1,5 ml	Tris-HCl (0,5 mol/l) (pH 6,8)
	2,4 ml	100% Glycerol
	2,4 ml	SDS 10 %
	0,6 ml	Bromphenolblau 0,5 %

Gebrauchslösung

92,5 µl	Ladepuffer 6 x Stock
7,5 µl	β-Mercaptoethanol

Laufpuffer

10 x Stock	30,25 g	Trisbase
	144,25 g	Glycin
	10 g	SDS
	H ₂ O zu 1 l	

Gebrauchslösung

100 ml	Laufpuffer 10 x Stock
900 ml	H ₂ O

Western BlotTransferpuffer

10 x Stock	30,25 g	Trisbase
	144,25 g	Glycin
	H ₂ O zu 1 l	

Gebrauchslösung

100 ml	Transferpuffer 10 x Stock
200 ml	Methanol
700 ml	H ₂ O

TBS Puffer

10 x Stock pH 7,4	24,22 g	Trisbase
	87,66 g	NaCl
	H ₂ O zu 1 l	

Gebrauchslösung

(TBST-Puffer)	100 ml	TBS-Puffer 10 x Stock
	899,5 ml	H ₂ O
	500 µl	Tween 20

Absättigungslösung

(5%)	2,5 g	Milchpulver
	1x TBST-Puffer zu 50 ml	

PonceauS

	0,1 g	PonceauS-Pulver
	H ₂ O zu 95 ml	
	5 ml	Essigsäure

2.5 Kits

Tabelle 8: Kits

Kits	Hersteller
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad GmbH, München, DE
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, DE

2.6 Oligonukleotide

2.6.1 Primer für SYBRGreen PCR

Tabelle 9: Primer (SYBRGreen)

Bezeichnung		Sequenz (5'-3')	Anlagerungstemperatur (°C)
m36B4	fwd	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT (21)	60
	rev	CCGCAGGGGGCAGCAGTGGT (19)	
hrpII	fwd	GCACCACGTCCAATGACAT (19)	60-62
	rev	GTGCGGCTGCTTCCATAA (18)	

2.6.2 Taqman und PrimePCR Assays

Tabelle 10: Taqman und PrimePCR Assays

Bezeichnung	Spezies	Assay ID/Katalog ID	Hersteller
BMP2	Human	qHsaCED0048442	Bio-Rad GmbH, München, DE
BMP2	Maus	4351372	Thermo Scientific, Dreieich, DE
EPDR1	Human	4331182	Thermo Scientific, Dreieich, DE
EPDR1	Maus	4331182	Thermo Scientific, Dreieich, DE
miR-100	Human, Maus	4427975	Thermo Scientific, Dreieich, DE
RNU19	Human	4427975	Thermo Scientific, Dreieich, DE
snoRNA202	Maus	4427975	Thermo Scientific, Dreieich, DE
beta-Actin	Human	4333762F	Thermo Scientific,

beta-Actin	Maus	4352341E	Dreieich, DE Thermo Scientific, Dreieich, DE
-------------------	------	----------	--

2.7 Marker

Tabelle 11: Marker

Marker	Hersteller
Proteinmarker Precision Plus Protein Dual Color	Bio-Rad GmbH, München, DE

2.8 Enzyme

Tabelle 12: Enzyme

Enzym	Hersteller
Accutase	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
DNase	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Trypsin/EDTA	Lonza, Verviers, BE

2.9 Antikörper

2.9.1 Western Blot

Tabelle 13: Primärantikörper für Western Blot

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Actin α-Smooth muscle monoclonal mouse	1 : 5000	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Anti-GAPDH polyclonal rabbit	1 : 5000	EnoGene Biotech, New York, US
Anti-BMP2 polyclonal rabbit	1 : 1000	Cell Signaling Technology, Leiden, NL
Anti-EPDR1 polyclonal rabbit	1 : 1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-α tubulin monoclonal mouse	1 : 5000	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE

Anti-RALA mouse	1 : 5000	BD Biosciences, Franklin Lakes, US
------------------------	----------	------------------------------------

Tabelle 14: Sekundärantikörper für Western Blot

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse IgG/HRP conjugated	1 : 5000	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Anti-rabbit IgG/HRP conjugated	1 : 10000	Thermo Scientific, Dreieich, DE

2.10 Programme

Tabelle 15: Programme

Programm	Hersteller
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., US
Adobe Illustrator CS6 (64Bit)	Adobe Inc., US
Image Lab	Bio-Rad GmbH, München, DE
AxioVision® 4.8	Carl Zeiss Imaging Solutions, Jena, DE
Office 2010	Microsoft Corporation, US
NanoDrop Software	Thermo Fisher Scientific, Schwerte DE
SoftMax Pro7	Molecular Devices (Germany) GmbH, Biberach an der Riß, DE

3 Methoden

Molekularbiologische Standardverfahren wurden, wenn nicht explizit erwähnt, folgenden Standardwerken entnommen:

Current Protocols in Molecular Biology

F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl;

Wiley Interscience, 1989

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition

J. Sambrock, E.F. Frisch, T. Maniatis

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

3.1 Sterilisation von Gebrauchsmitteln und Lösungen

Glaswaren, sofern die Beschaffenheit es zuließ, wurden bei trockener Hitze und 180°C sterilisiert. Empfindlichere Glaswaren, Plastikwaren, Lösungen und Medien wurden bei 121°C und bei einem Druck von 2,2 bar für 30 min autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen oder Medien wurden mittels Zelluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm bzw. 0,45 µm steril filtriert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Humane pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen (hPASCs) wurden in Passage eins von der Firma PromoCell, Heidelberg, DE gekauft. Sie wurden in Zellkulturflaschen mit einer Kulturfläche von 25, 75 und 175 cm² adhärent bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Nährmedium wurde für die glatten Muskelzellen ein spezielles „Smooth Muscle Cell Growth Medium 2“ (VSMC-II-Medium), ebenfalls von der Firma PromoCell, verwendet. Diesem Medium wurde ein Mix aus Supplementen und 5% Fetales Kälberserum (*engl.* FCS) hinzugefügt, bevor es verwendet wurde. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 0,75 x 10⁴ Zellen pro cm² in die Kulturflaschen ausgesät. Nach drei Tagen wurde ein Wechsel des Mediums durchgeführt und bei einer erreichten Konfluenz zwischen 70-90 % wurden die Zellen gesplittet,

beziehungsweise für die Versuche verwendet. Dafür wurden sie mit 10 ml sterilen, 37°C warmen 1xPBS-/- gewaschen. Anschließend wurden die adhärent wachsenden Zellen von der Kulturflasche mit Hilfe des Enzyms Accutase gelöst. Hierfür wurden bei einer 75 cm²-Kulturflasche 2 ml Accutase auf die Zellen gegeben und diese für eine Minute bei 37°C inkubiert. Die Zell-Enzym-Suspension wurde mit frischem, warmem Medium auf 10 ml aufgefüllt und in einem 50 ml Falcon bei 220xg, bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das verbliebene Pellet mit 1 ml Medium resuspendiert. 20 µl dieser Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen Trypanblau (1:10 in PBS) vermischt und die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer ermittelt. Die hPASCs wurden für Versuche lediglich bis Passage acht verwendet, da die Proliferation in diesem Alter nachlässt und sich der Phänotyp zunehmend verändert.

3.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden, wie unter 4.2.1 beschrieben, von der Adhärenz abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Für die Kryokonservierung wurden 6×10^5 Zellen erneut pelletiert und dann in 1 ml Medium resuspendiert. Jeweils 1 ml wurde in ein Kryoröhrchen überführt, um anschließend über 24 Stunden mit Hilfe eines Gefrierbehälters schonend bei -80°C eingefroren zu werden. Langfristig wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank genommen und innerhalb von zwei Minuten in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden die Zellen in 9 ml Medium überführt und diese bei 220xg und 4°C für 5 min zentrifugiert. Danach wurden der Überstand abgegossen, die Zellen in 10 ml frischem, warmem VSMC-II-Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2.3 Transfektion

Die Transfektion ermöglicht das Einbringen von Fremd-RNA in Zellen und deren Erbsubstanz. 60.000 glatte Muskelzellen pro Well wurden dafür in einer 12-Well-Platte und 190.000 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C ruhen gelassen. Am zweiten Tag des Versuchs wurde den Zellen das

Nährmedium entnommen und sie wurden mit einem Hungermedium, bestehend aus EBM (Endothelial Cell Growth Basal Medium), welches 0,4 % FCS besitzt, zwei Stunden gehungert. Anschließend wurde den Zellen eine Transfektionslösung (siehe unten) zugegeben. Die pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen wurden in diesem Fall mit einer ca. 70-80 Nukleotide großen *precursor*-microRNA (premiR) der microRNA-100 oder mit Kontrolloligonukleotiden transfiziert. Des Weiteren wurden Zellen mit anti-microRNA (antimiR) Oligonukleotiden der miR-100 transfiziert. Diese antimiRs stellen synthetisch hergestellte Sequenzen dar, die zur Neutralisation speziell von microRNA-100 in der Zelle in der Lage sind. Die Transfektion wurde über Nacht durchgeführt und die Zellen am folgenden Tag entweder für die RNA- oder die Protein-Isolation geerntet.

Transfektionsansatz pro Well: 490 µl Optimem
5 µl Lipofectamin RNAi-Max
5 µl *precursor* premiR-100/ premiR control
oder
10 µl *precursor* antimiR-100/ antimiR control
Stock-Konzentration jeweils: 5 µM

3.2.4 Isolation von RNA

3.2.4.1 Zellyse/ Gewebehomogenisierung

Für die Isolation aus Zellen in Kultur, wurden diese zweimalig mit 37°C warmen PBS gewaschen. Anschließend wurde, der Menge der Zellen angepasst (100 µl/cm² Grundfläche), QIAzol® Lysis Reagent in die Wells hinzugefügt. Durch ein wiederholtes Aufnehmen und Ablassen mit der Pipette, sowie ein leichtes Kratzen mit der Pipettenspitze, wurde ein Zelllysate hergestellt, welches in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt wurde.

Bei der Isolation aus Gewebeproben wurde dem Gewebe der Größe entsprechend (1 ml/100 mg Gewebe) QIAzol® Lysis Reagent hinzugefügt und mithilfe eines Dispergierers homogenisiert.

Nach 5-minütiger Inkubation wurden 0,2 ml Chloroform/ 1 ml QIAzol® Lysis Reagent hinzugefügt und für 15 Sekunden gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe bei 12.000xg für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Die obere RNA-haltige Phase wurde in ein mit 1 µl Glykogen versehenes 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt

Anschließend wurden pro 1 ml QIAzol® Lysis Reagent 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben und das Mikroreaktionsgefäß mehrmals invertiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Probe bei 12.000xg für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde, unter Schonung des entstandenen Pellets am Boden des Mikroreaktionsgefäßes, abgenommen, das Pellet mit 1 ml 75 %igem Ethanol pro 1 ml QIAzol® Lysis Reagent gewaschen und anschließend bei 7.600xg für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, das Pellet bei RT getrocknet und anschließend in 20 µl *Aqua bidest.* resuspendiert. Die Nukleinsäurekonzentration und die Reinheit der gewonnenen RNA wurden mittels Spektralphotometers (NanoDrop™ 2000/2000C) bestimmt.

Bei Verunreinigungen war es nötig, die RNA-Probe nachträglich nochmals zu reinigen. Hierfür wurde ein Protokoll verwendet, bei welchem man durch das Hinzufügen von Ammoniumacetat (CH₃COO-NH₄) und 100 %igem Ethanol das Ausfällen der RNA erreicht (Grundtechniken der molekularen Genetik. In: Kück U. (eds) Praktikum der Molekulargenetik., 2005).

Die Probe wurde bei -20°C über Nacht gelagert und anschließend bei 20.000xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde durch einen Waschschrift mit 75 %igem Ethanol und erneutem Zentrifugieren (7.600xg für 5 Minuten bei 4°C) gereinigt. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und danach in *Aqua bidest.* resuspendiert.

3.2.4.2 DNase-Behandlung

Die Probe sollte mittels DNase von eventuell vorhandener DNA befreit werden. Dafür wurde sie für 10 Minuten auf 60°C erwärmt und anschließend mit einem Mikroliter DNase (10 U/µl) versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließendes Erwärmen auf 70°C für 15 Minuten beendete die DNase-Behandlung. Die RNA wurde dann bei -80°C gelagert.

3.2.4.3 Reverse Transkription

Für die Durchführung der reversen Transkription wurde das Standardprotokoll des Herstellers verwendet (iScript™ cDNA Synthesis Kit von BIO RAD). Hierfür wurde

eine Gesamtkonzentration der RNA von 900 ng/µl durch Verdünnen mit *Aqua bidest.* hergestellt. Pro 15 µl verdünnter Probe wurden 4 µl iScript Reaction Mix, welcher oligo(dT)- und Hexamer-Primer besitzt, und 1 µl iScript Reverse Transcriptase hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl entstand. Ein Temperaturprogramm über 5 min bei 25°C, 20 min bei 46°C und 1 min bei 95°C, ermöglichte das Umschreiben der RNA in cDNA, welche anschließend bei -80°C gelagert wurde.

3.2.5 Isolation von Proteinen

3.2.5.1 Zellyse/Gewebehomogenisierung

Die Proteinisolation aus adhärent wachsenden Zellen erfolgte, nachdem die Zellen zweimalig mit PBS/- gewaschen wurden. In einer 6-Well-Platte wurden 60 µl/Well RIPA-Puffer (inklusive Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:200) aufgebracht. Die Zellyse erfolgte durch 20-minütiges Schütteln auf Eis, gefolgt von mechanischem Abkratzen des Zellrasens mithilfe eines Plastikschabers. Anschließend wurde das entstandene Lysat mit einer Pipettenspitze aufgeschäumt und der entstandene Schaum in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf überführt. Nicht lösliche Zellbestandteile wurden bei 10.000xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinisolation aus Gewebeteilen erfolgte durch eine mechanische Zerkleinerung mittels eines Dispergiergerätes. Pro 100 µg Gewebe wurde 1 ml RIPA-Puffer (mit Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:200) verwendet. Nach der Homogenisierung wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinproben wurden anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.5.2 Messung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Bradford Dye entsprechend der Herstellerinformationen und beruht auf dem Prinzip, dass der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250 eine Bindung mit den Seitenketten der Proteine eingeht und es hierbei zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm kommt. Entsprechend wurden 1-3 µl der Probe mit 1 ml verdünntem

Bradford Dye (200 µl Bradford Dye + 800 µl *Aqua bidest.*) versetzt, die Absorption in einer Küvette bei 595 nm gemessen und anschließend gegen einen entsprechenden Standard bzw. eine Eichgerade (definierte Menge an BSA, engl. *bovine serum albumin*) abgeglichen.

3.2.5.3 Vorbereitung der Proben für eine Gelelektrophorese

Eine gewünschte, den Taschen im Laufgel angepasste, Konzentration der Proteinprobe wurde errechnet und eine Verdünnung mit RIPA-Puffer hergestellt. Anschließend wurde der Probe ein Ladepuffer (6x Lämmli-Puffer) im Verhältnis 5:1 hinzugegeben. Das darin enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zu einer Negativladung der Proteine, sodass sie in der Gelelektrophorese durch ein elektrisches Feld der Größe nach aufgetrennt werden können. Das Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten denaturiert die Proteine und zerstört Cystein-Cystein-Disulfidbrücken. Die gebrauchsfertigen Stock-Lösungen wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.6 Western Blot Analyse

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10 % Polyacrylamidgel) mit anschließendem Nass-Transfer auf eine Polyvinylidenufluorid-Membran (PVDF-Membran) bei 100 V für 1 h in Transferpuffer. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurden die Proteine auf der Membran durch eine mit Wasser auswaschbare Ponceau S Färbung gefärbt. Anschließendes kurzes Waschen in 1x TBST und Einlegen in 5 % Milchpulver in 1x TBST für 1 h bei RT blockiert noch freie Bindungsstellen der Proteine auf der Membran. Die Milchlösung wurde danach durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 min mit 1x TBST entfernt. Die spezifischen Primärantikörper wurden in 3 % BSA/1x TBST über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln auf der Membran belassen. Erneutes dreimaliges Waschen mit 1x TBST für jeweils 5 min und inkubieren mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, speziesspezifischen Sekundärantikörper für 2 h bei RT in 3 % Milchpulver in 1x TBST folgte. Der Sekundärantikörper ist durch ein Enzym, die Meerrettichperoxidase (engl. *Horse radish peroxidase HRP*) markiert, welche eine später aufgegebene Luminollösung in seine oxidierte Form umwandelt. Diese oxidierte Form emittiert eine Fluoreszenz,

welche durch ein Geldokumentationssystem (ChemiDoc™MP Imaging System, Bio-Rad, DE) quantitativ ermittelt werden kann.

3.2.7 Next-Generation-Sequenzierung der hPASM-C-Zellen

Das *Next-Generation-Sequenzierung* bildet eine neuartige diagnostische Möglichkeit, mit hoher Sensitivität, Genomanalysen durchzuführen (Sanger, Nicklen et al. 1977, van Dijk, Auger et al. 2014). Durch parallele Sequenzierung ist diese Methode besonders kostengünstig und liefert große Datenmengen. Um diese Analyse durchzuführen, wurde ein externes Institut beauftragt. Humane pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen (hPASCs) wurden in Kultur genommen und mit in 4.2.3 beschriebenem Protokoll transfiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und pro Well mit 700 µl Lyse-Puffer (Buffer RLT Plus Lysis buffer) der Firma Qiagen lysiert. Nach der Herstellung des Zelllysates wurde die Probe für die Analyse versandt. Die Ergebnisse dieses *Next-Generation-Sequenzings* wurden von Dr. Achim Lothar (Universitäts-Herzzentrum Freiburg-Bad Krozingen, Klinik für Kardiologie und Angiologie I, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie) mithilfe des *European Galaxy Server* verarbeitet und ausgewertet (siehe Tabelle 16 & Tabelle 17).

3.2.8 PCR – Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*engl.* Polymerase chain reaction – PCR) ist es möglich auch nur kleine Mengen an DNA nach Belieben zu vervielfältigen. Die entstandene DNA kann für Nachweise oder Sequenzierungen genutzt werden. Das Enzym DNA-Polymerase, baut dabei die ebenfalls hinzugegebenen Nukleotide Adenin, Guanin, Cytosin und Thyrosin an einen Primer, welcher als Startmolekül fungiert. Die Auswahl des Primers richtet sich jeweils nach der DNA-Sequenz, welche vervielfältigt werden soll.

Die komplette PCR wird in drei Schritte unterteilt. Nach dem Zugeben der oben aufgeführten Komponenten wird die PCR mit der Denaturierung (*engl.* *Melting*) bei 95°C begonnen. Hierbei werden die Doppelstränge durch Zerstörung der Wasserstoffbrücken getrennt und liegen nun einzelsträngig vor. Anschließend erfolgt die Hybridisierung (*engl.* *Annealing*), bei der eine Primer-spezifische Temperatur

zwischen 55-65°C gewählt wird. Der hinzugegebene Primer bindet an die einzelsträngige DNA und dient als Startmolekül für den darauffolgenden Schritt, die Verlängerung (*engl. Elongation*). Die Verlängerung funktioniert am effizientesten bei 72°C, da die Polymerase bei dieser Temperatur optimal arbeiten kann. Als DNA-Polymerase wird vornehmlich eine thermostabile Variante verwendet, die sogenannte Taq-Polymerase. Diese Taq-Polymerase stammt aus dem in heißen Quellen lebenden thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und übersteht die anfängliche Temperatur von 95°C in der Kettenreaktion unbeschadet. Dieses Enzym baut nun, beginnend am 3'-Ende des Primers, komplementär zum vorhandenen DNA-Strang die Nukleotide an (Saiki, Gelfand et al. 1988).

3.2.8.1 Quantitative Echtzeit-PCR (Q-PCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR (*engl. real-time quantitative PCR*) hat den Vorteil, dass während des Vorgangs in Echtzeit mittels einer Fluoreszenz die Quantifizierung der DNA durchgeführt werden kann (Joppien Saskia 2011). Ausgangsmaterial ist eine doppelsträngige DNA, zu welcher man nicht nur die oben aufgeführten Komponenten (Primer, Nukleotide und DNA-Polymerase) hinzugibt, sondern zusätzlich noch spezielle Taqman®-Sonden oder einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen. Diese Taqman®-Sonden sind bestimmte Oligonukleotide, welche sich in zwei Punkten von einfachen Primern unterscheiden. Zum einen können sie nicht durch die DNA-Polymerase verlängert werden, da sie eine freie Hydroxygruppe besitzen, zum anderen sind an ihre Enden zwei Moleküle gebunden. Am 5'-Ende sitzt ein Reportermolekül, welches bei Energieexposition fluoresziert und am 3'-Ende ein sogenannter *Quencher*, der diese Fluoreszenz bei räumlicher Nähe zum Reportermolekül unterdrückt. Die durch den *Quencher* ausgelöste Unterdrückung erfolgt durch den Vorgang FRET (*engl. Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Die Sonden setzen sich ebenfalls an die einzelsträngige DNA und stehen an bestimmter Stelle der DNA-Polymerase im Weg. Diese besitzt zusätzlich noch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität und kann die Sonde dadurch abbauen, was nun eine Trennung der beiden Reporter- und Quencher-Moleküle zur Folge hat. Eine Trennung bewirkt, dass der Reporter ungestört fluoreszieren kann, was in Echtzeit detektiert wird (Krause 2012).

Die Expression wurde auf die von Referenzgenen normalisiert. Alle Proben wurden als Dupletts gemessen. Die Bestimmung der relativen Expression erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode.

PCR-Ansatz:

<i>2X SsoAdvanced Supermix</i>	10,0 μl
<i>Aqua bidest.</i>	5,0 μl
<i>20X Prime PCR assay</i>	1,0 μl
<i>cDNA-Probe</i>	4,0 μl

PCR-Programm:	2 min	→ 95°C	} 40 Zyklen
	5 s	→ 95°C	
	30 s	→ 60°C	
	5 s/ Schritt	→ 65-95°C	

3.2.8.2 microRNA-PCR

Die „stem-loop“ basierende microRNA-TaqMan PCR wurde zum Nachweis der miR-Expressionslevel verwendet. Die microRNA-PCR besteht aus zwei Teilschritten, zuerst wird die eingegebene RNA mittels einer reversen Transkriptase zu einer cDNA umgeschrieben und im zweiten Schritt dann mithilfe einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Hierfür wurde eine *Real-Time* PCR auf Basis des in 4.2.9.1 beschriebenen Taqman-Prinzips verwendet (Krause 2012).

PCR-Ansatz:

1)	<i>Aqua bidest.</i>	1,39 μl
	<i>Reverse Transcription 10x Buffer</i>	0,50 μl
	<i>100nM dNTP</i>	0,05 μl
	<i>MultiScribe reverse Transcriptase 50U/μl</i>	0,33 μl
	<i>RNAse Inhibitor 20U/μl</i>	0,06 μl
	<i>spezifischer 5x RT Primer</i>	1,00 μl
	<i>RNA-Probe</i>	1,666 μl

PCR-Programm:	30 min	→ 16°C	
	30 min	→ 42°C	
	5 min	→ 85°C	
	∞	→ 4°C	
2)	<i>Aqua bidest.</i>		7,67 μ l
	<i>Taqman 2x Universal PCR Master-Mix</i>		10,0 μ l
	<i>spezifischer 20x RT Primer</i>		1,00 μ l
	<i>Produkt aus 1)</i>		1,33 μ l

PCR-Programm:	10 min	→ 95°C	} 40 Zyklen
	15 s	→ 95°C	
	60 s	→ 60°C	
	∞	→ 4°C	

3.3 Tierversuch

Der Tierversuch wurde nach Genehmigung des Regierungspräsidiums Freiburg und auf Basis der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates „zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere“, durchgeführt. Das Versuchsvorhaben mit dem Aktenzeichen „G-18/119“ beziehungsweise der Kurzbezeichnung „miR-100 und PH“ wurde vom Regierungspräsidium Freiburg genehmigt. Des Weiteren wurden die Empfehlungen der *Federation of Laboratory Animal Science Association (FELASA)* in die Planung einbezogen. Der schematische Aufbau des Versuches ist in Abbildung 2 zu sehen.

3.3.1 Verwendete Versuchstiere

Für den Tierversuch wurden ausschließlich männliche Mäuse (*Mus musculus*) verwendet. Mäuse stellen in Deutschland häufig eingesetzte Versuchstiere dar. Sie ermöglichen, durch die kurzen Reproduktionszyklen, eine Vielzahl an Nachkommen zu erhalten. Die große genetische Übereinstimmung mit dem menschlichen Genom, macht sie zu einem geeigneten Versuchstier für die Grundlagenforschung. Die

Mauslinie Myh11-Cre/BLU.miR100loxP, welche für die Versuche verwendet wurde, befindet sich im Besitz der Arbeitsgruppe um Prof. Grundmann des Universitäts-Herzzentrums Freiburg - Bad Krozingen. Sie werden im Folgenden als „transgene Mäuse“ oder „miR-100 überexprimierende Mäuse“ bezeichnet. Diese Mäuse besitzen die genetische Grundlage, dass sie microRNA-100 in glatten Muskelzellen überexprimieren. Als Kontrolltiere wurden Tiere der BLU.miR-100-Linie verwendet, die zwar ebenfalls das miR-100-Transgen tragen, aber keine miR-100 überexprimieren. Diese werden im Folgenden als Wildtyp bezeichnet. Insgesamt wurden 36 Tiere für den Versuch verwendet, davon 20 miR-100 Tiere und 16 transgene Kontrolltiere. Die Tierhaltung wurde im ZBMZ (Zentrum für Biochemie und molekulare Zellforschung) des CEMT (*Center for Experimental Models and Transgenic Service*), Stephan-Meier-Straße 17, 79104 Freiburg, durchgeführt.

3.3.2 Cre/loxP System und Tamoxifeninduktion

Das Cre/loxP System ermöglicht das spezifische Entfernen von DNA-Sequenzen um eine genetische Modifizierung der Mäuse zu erreichen. Ziel dieser Modifikation ist, dass bestimmte Gensequenzen zu einem beliebigen Zeitpunkt entfernt werden können. Das Entfernen wird ermöglicht, da man die zu entfernende Sequenz mittels einer 34 Basenpaare großen Abfolge flankiert, welche „loxP“ genannt wird. Das Enzym Cre-Rekombinase (*engl. cyclization recombination*) erkennt diese loxP-Sequenzen und schneidet, bei gleicher Ausrichtung dieser, die dazwischenliegende DNA heraus. Die Cre-Rekombinase kann mit der Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors fusioniert werden, welcher erst bei Applikation des Estrogenderivates Tamoxifen aktiviert wird. Somit wird erreicht, dass die Cre-Rekombinase erst nach Verabreichen von Tamoxifen, exprimiert wird. Um eine spezifische Expression der Cre-Rekombinase zu erreichen, wird ein Promotor gewählt, der lediglich in dem gewünschten Gewebe vorkommt. Für die verwendeten Mäuse wurde der Myh11-Promotor, welcher spezifisch in glatten Muskelzellen vorkommt, gewählt. Das herauszuschneidende DNA-Stück ist in diesen Mäusen ein Stopp-Codon, was normalerweise das Ablesen der microRNA-100-Nukleotidsequenz verhindert. Durch Induzieren der Myh11-Cre-Expression mittels Tamoxifen wird das Stopp-Codon entfernt, was letztendlich zu einem vermehrten Aufkommen der miR-100 in glatten Muskelzellen führt.

Die Tamoxifeninduktion wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt. Den Mäusen wurde hierfür 100 µl Tamoxifen in einer Konzentration von 20 mg/ml einmal täglich *intraperitoneal* (i.p.) appliziert. Das Tamoxifen wurde in Maiskeimöl gelöst und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

3.3.3 Hypoxie-Kammer und Monitoring

Die Hypoxie stellt in der Tierversuchskunde ein adäquates Modell für die PAH dar. Ein vaskulärer Umbau, welcher letztlich zu einer PAH führt, wird durch die Hypoxie ausgelöst (Eddahibi, Hanoun et al. 2000, Cruz, Bauer et al. 2012). Die Mäuse, welche unter hypoxischen Bedingungen in Standard-IVC-Käfigen gehalten wurden, verbrachten sechs Wochen in einer Hypoxie-Kammer. Diese Kammer ermöglicht es, eine ständige Sauerstoffkonzentration von 10 % aufrechtzuerhalten. Die Überwachung der Tiere während des Tierversuchs erfolgte engmaschig. In den ersten 15 Tagen wurden die Tiere sowohl täglich auf Gewichtsverlust, als auch die folgenden Luftparameter in der Hypoxie-Kammer gemessen. Neben der Sauerstoffkonzentration, welche bei 10 % liegen sollte, wurde zusätzlich der Ammoniakgehalt (NH₃), Kohlenstoffdioxid (CO₂), die Luftfeuchte und die Raumtemperatur überwacht. Im Anschluss an die ersten zwei Wochen, wurden die Untersuchungen mindestens zwei mal wöchentlich durchgeführt (siehe Tabelle 18). Während der gesamten Überwachung traten keine gravierenden Abweichungen der Konzentrationen auf, was ein Eingreifen zur Folge hätte haben müssen. Ein über 20 prozentiger Verlust an Körpergewicht wurde als Abbruchkriterium definiert.

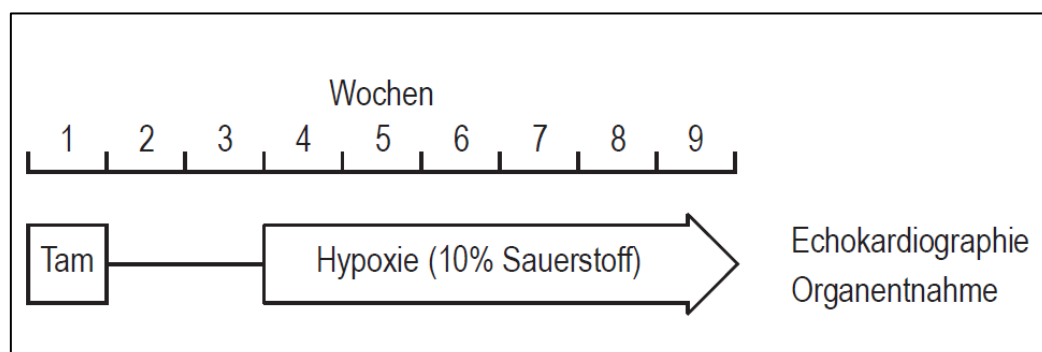


Abbildung 2: Versuchsaufbau über 9 Wochen mit initialer Tamoxifeninduktion (Tam) und sechswöchiger Hypoxieexposition. Anschließend wurden die Echokardiographie und die Organentnahme durchgeführt.

3.3.4 Echokardiographie

Die Echokardiographie der Mäuse wurde durch Dr. Achim Lothar durchgeführt. Sie fand unter Isoflurannarkose (2 % Isofluran mit 0,5 l/min Luft-Sauerstoff) statt. Diese wurde initial in einer Plexiglas-Kammer, nach Eintritt der Narkose über eine Maske verabreicht und konnte somit exakt gesteuert werden. Die Plexiglas-Kammer besitzt einen Zufluss und einen Abfluss, welcher an eine Filtereinheit gekoppelt ist. In diesem Zusammenhang ist gewährleistet, dass der Experimentator keine Narkosegase einatmet. Die zu untersuchende Maus wurde in Rückenlage fixiert und das Fell sternal mittels einer Enthaarungscreme entfernt. Körperwarmes Ultraschallgel wurde für optimale Schallbedingungen benötigt. Durch die nicht-invasive Diagnostik lassen sich viele Strukturen, vor allem des Herzens in physiologischer Lage und in der lebenden Maus darstellen. Besonders Messungen von Gewebedicken und des Strömungsverhaltens des Blutes sind somit sehr gut zu beurteilen. Mithilfe der Narkose wurde eine möglichst kontinuierliche und ähnliche Herzfrequenz bei allen Mäusen von $418,14 \pm 33,66$ Schlägen pro Minute eingestellt. Zu Beginn wurde die systolische Herzfunktion untersucht. Hierfür wurde der Schallkopf in einem 90° Winkel parasternal auf die Maus aufgesetzt. Die bevorzugte Ausrichtung des Schallkopfes ist hier eine Kurzachsenaufnahme, bei der im B-Mode (2-Dimensional) ein Ausschnitt gewählt wird, bei dem das gesamte Herz zu sehen ist. Neben dem linken Ventrikel mit den Papillarmuskeln soll auch ein Anteil des rechten Ventrikels zu sehen sein. Somit kann hier auch das intraventrikuläre Septum gut beurteilt werden. Die Messungen der Wanddicken wurden vorrangig mithilfe des M-Modes (1-Dimensional) des Ultraschallgerätes durchgeführt. Mit diesem können die Dimensionen der einzelnen Herzbestandteile und die Kontraktilität genau gemessen werden. Um die Geschwindigkeitsmessungen des Blutstroms durchzuführen, wurde der *Pulsed-wave Doppler* angewendet. Hiermit wird zum einen die Pulmonale Akzelerationszeit (PAT = *engl. pulmonary acceleration time*), also die Zeit von Beginn des Ausstroms bis zum Erreichen der höchsten Geschwindigkeit, gemessen und zum anderen wird die komplette Ausflusszeit (PET) mittels des *Pulsed-wave Dopplers* bestimmt. Ein Quotient aus diesen beiden Werten bildet eine Alternative zur invasiven Druckmessung in den Pulmonalgefäßen. Ein niedriger PAT/PET-Wert korreliert mit einem höheren Druck im rechten Ventrikel (Thibault, Kurtz et al. 2010). Die diastolische Herzfunktion wird ebenfalls unter Verwendung der parasternalen Kurzachse beurteilt. Hier kommt der Gewebedoppler (*Tissue Doppler imaging*) zum

Einsatz, mit welchem die Geschwindigkeiten der Myokardbewegungen gemessen werden. Um den Blutfluss in der Mitralklappe zu bestimmen, wird der gepulste Doppler (*Pulsed-wave Doppler*) eingesetzt.

Diese Techniken werden standardmäßig zur Beurteilung der intrakardialen Druckverhältnisse und zur Detektion von Veränderungen der Größenverhältnisse von Kammer oder Kammerwand, angewandt. Die transthorakale Echokardiographie, kombiniert mit einem gepulsten Doppler ermöglicht eine nicht-invasive Beurteilung der systolischen und diastolischen Herzfunktion in Mäusen (Respress and Wehrens 2010).

3.3.5 Tötung von Versuchsmäusen

Nach Abschluss der Untersuchung wurden die Mäuse in Narkose mittels zervikaler Dislokation getötet.

3.3.6 Organentnahme

Die Organentnahme der Mäuse erfolgte im Anschluss an die Echokardiographie und die Tötung der Mäuse. Die Sektion wurde bei jeder Maus nach dem identischen Schema durchgeführt. Im Vorfeld wurden pro Versuchstier mehrere Mikroreaktionsgefäße doppelt beschriftet und, soweit sie für histologische Proben verwendet werden sollten, mit 4 % Paraformaldehydlösung (PFA) gefüllt. Die Mäuse wurden in Rückenlage auf dem Arbeitsplatz fixiert und die Brust- und Bauchregion mit einer 70-prozentigen Alkohollösung desinfiziert. Die Haut wurde vom caudalen Brustbeinende bis in die Halsregion mit der Schere entfernt. Anschließendes Eröffnen des Brustkorbes ermöglichte den Zugang zu den Brustorganen. Aus den großen Gefäßen des Herzens wurde zunächst mit einer 1 ml Spritze Blut entnommen. Alle entnommenen Organe wurden im Anschluss gewogen. Als erstes wurde das Herz an der Basis abgetrennt und entnommen. Es wurde entlang des Septums in rechte und linke Herzkammer getrennt, die Vorhöfe entfernt und die einzelnen Herzkammern zu Zweidrittel für die Gewinnung von RNA und Protein und zu einem Drittel für die Histologie separiert. Anschließend wurde die Lunge möglichst ganz entnommen und die einzelnen Lungenlappen (Abbildung 3) voneinander getrennt. Der rechte kraniale und kaudale Lappen wurde für die Histologie in 4 %

PFA bei 4°C gelagert. Die übrigen Lungenlappen wurden für die Protein- und RNA-Gewinnung in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

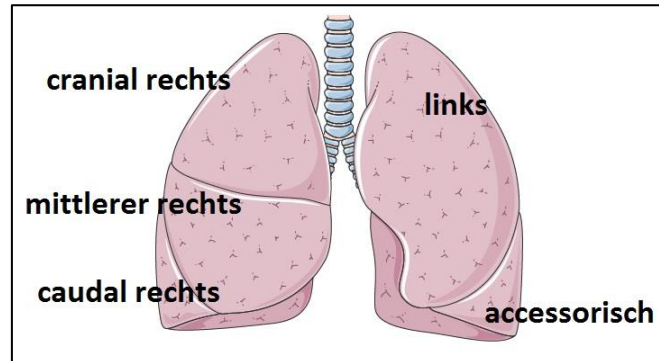


Abbildung 3: Schematische Aufteilung der Lungenlappen der Maus.

Nach Entfernen der Lunge konnte die Aorta, welche neben dem Oesophagus an der Wirbelsäule anliegt, entfernt werden. Nachdem alle Brustorgane entfernt waren, wurde die Bauchhöhle eröffnet und zuerst die Milz entnommen. Dafür wurden die Gefäße am Hilus, milznah abgetrennt. Die Leber wurde nach Möglichkeit komplett entnommen und anhaftendes Bindegewebe, sowie die Gallenblase entfernt. Beide Nieren konnten nach Vorlagern der verbliebenen Organe erreicht und entnommen werden. Als letzte Probe wurde noch ein Stück Muskulatur aus dem *Musculus quadriceps femoris* gewonnen und abschließend die Länge der Tibia gemessen. Proben die für die Gewinnung von RNA und Protein bestimmt sind, wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, Proben für die Histologie wurden direkt in 4 % PFA überführt und bei 4°C im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.4 Histologie

Ziel der Histologie ist es, die Struktur und Zusammensetzung der Gewebe so lebensecht wie möglich zu erhalten und darzustellen. Die nach der echokardiographischen Untersuchung gewonnenen Organe, welche für die Histologie vorgesehen waren, wurden in 1 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C bis zum Entwässern gelagert. Durch das PFA werden die Proteine im Gewebe reversibel vernetzt und die Lebensvorgänge in den Zellen gestoppt. Enzymatische Aktivitäten und Autolyse werden dadurch begrenzt und das Organ wird fixiert. Nach

dem das zu untersuchende Organ entwässert, eingebettet und geschnitten wurde, konnte es gefärbt und mikroskopisch analysiert werden.

3.4.1 Entwässern

Die Organe wurden einzeln in dafür vorgesehenen Einbettkassetten durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt, wodurch sie entwässert wurden. Bei der Entwässerung beginnt man mit einer Alkoholkonzentration von 20 % Isopropanol in *Aqua dest.* und steigert die Konzentration jeweils um 20 %. Die letzten Schritte erfolgen in kleineren Abständen zwischen 90 % und 100 %, womit erreicht wird, dass kontinuierlich das Wasser aus dem Gewebe verdrängt wird. Bis zum Einbetten sollten die Organe kühl und trocken gelagert werden.

3.4.2 Einbetten

Die entwässerten Organe wurden in warmem Paraffin eingebettet, wobei genau auf die Ausrichtung zu achten war. Eine korrekte Ausrichtung ist wichtig, um später bei allen Organen die gleiche Ausrichtung beim Schneiden zu erreichen. Das Paraffin erhärtet bei Raumtemperatur in wenigen Minuten. Das Präparat ist nach Aushärtung ungekühlt lagerfähig.

3.4.3 Schneiden

Die Schnitte (5 µm dick) wurden mit einem Rotationsmikrotom angefertigt. Dazu wurden einzelne Schnitte oder ganze Schnittreihen direkt nach dem Schneiden zum Strecken in 37°C warmes Wasser überführt und nach erfolgter Glättung auf die Objektträger transferiert. Dabei wurden je Organ 100 Schnitte hergestellt und jeweils 8-10 Schnitte auf dem Objektträger platziert. Anschließendes Trocknen über Nacht hatte einen dauerhaften Halt auf den Objektträgern zur Folge.

3.4.4 Färben

Die Zellen und Zellbestandteile sind in derartig dünnen Schnitten nahezu farblos, weshalb es erforderlich ist, dass die Präparate gefärbt werden. Zu Beginn des Färbevorgangs musste das Gewebe von überflüssigem Paraffin befreit und wieder

rehydriert werden, was mit einem Bad in Xylol und anschließender absteigender Alkoholreihe geschah. Bei den Lungen erfolgte die Färbung mittels Elastika-van-Gieson-Färbung. Dafür wurde das Standardprotokoll der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe verwendet. Sie ermöglicht eine Unterscheidung der verschiedenen Zellbestandteile dahingehend, dass die elastischen Fasern schwarzviolett, die Zellkerne schwarzblau/schwarzbraun, kollagene Fasern rot und die Muskulatur und das Zytoplasma gelb gefärbt sind. Zuerst wurden elastischen Fasern mit Resorcin-Fuchsin-Lösung gefärbt und überflüssige Färbelösung mit Leitungswasser abgespült. Anschließende Behandlung mit Eisenhämatoxilinlösung färbte die Zellkerne dunkel und die restlichen Zellbestandteile hellrosa. Mit der van-Gieson-Lösung wurde das kollagene Bindegewebe rot und die Muskulatur gelb gefärbt. Abschließend wurden die nun gefärbten Präparate mittels Permount Mounting Medium der Firma Electron Microscopy Sciences, USA eingedeckt. Die eingedeckten Präparate wurden dann über Nacht bei Raumtemperatur gelagert.

3.4.5 Mikroskopie

Die Mikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axioplan 2 Durchlichtmikroskop. Bei 40-facher Vergrößerung wurden pro Lunge 20 Bilder von kleinen arteriellen Gefäßen mit einer Belichtungszeit von 37,5 Millisekunden (mS) aufgenommen.

3.4.6 Auswertung

Pro Lungenschnitt wurden 20 arterielle Gefäße mit einem Durchmesser von 20-30 μm ausgewertet. Dabei wurde die *Tunica media* unter Verwendung der Mikroskopsoftware „AxioVision“ der Firma Zeiss gemessen. Hierfür wird die *Tunica elastica interna* und auch die *Tunica elastica externa* des Gefäßes mithilfe der Software markiert. Ein Quotient aus beiden Flächeninhalten ergibt den relativen Anteil der *Tunica media*, also des muskulösen Anteils, an der Gesamtfläche des Querschnittes des Gefäßes. Die durchschnittliche relative Dicke der arteriellen Gefäße einer Maus bezieht sich auf den Mittelwert der ausgewerteten 20 Gefäße.

3.5 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad PRISM Version 5 (Graphpad Software, Inc.). Die erhobenen Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Bei Normalverteilung der Daten wurde ein gepaarter T-Test angewandt, um den statistischen Unterschied zu errechnen. Zeigten die Varianzen durch den Bartlett's-Test einen Unterschied, so wurde anstatt des gepaarten T-Tests der Welch's T-Test angewendet, welcher dies berücksichtigt. Ergab der Shapiro-Wilk-Test, dass die Werte nicht normalverteilt waren, so wurde ein nichtparametrischer Mann-Whitney-Test durchgeführt. Alle statistischen Berechnungen wurden mittels der Statistiksoftware „R“ zusätzlich überprüft. Eine einfach statistische Signifikanz wurde erreicht, sobald der p-Wert unter 0,05 lag. Zweifach signifikant waren p-Werte, die unter 0,01 lagen und dreifach signifikant wurden Werte unter 0,001 bezeichnet. Das Signifikanzniveau wurde jeweils mit einer entsprechenden Anzahl an Sternen (*) markiert. Die Graphen wurden mit GraphPad PRISM, Version 5 erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Zellversuche

4.1.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz und miR-100-Modulation in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen

Ziel dieses Versuches war es, zu überprüfen, wie effizient sich humane pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen mittels spezifischer miR-100 *precursor* bzw. miR-100 *antisense* Oligonukleotide transfizieren lassen. Die Transfektionseffizienz wurde mittels „stem-loop“ basierender TaqMan PCR 24 h nach der Transfektion bestimmt. Die Transfektion resultierte hierbei in einer circa 80-fach erhöhten Expression der mit *precursor* für miR-100 (pre miR-100) transfizierten Zellen (Abbildung 4 A). In Zellen, welche mit *antisense* Oligonukleotiden gegen miR-100 (anti miR-100) transfiziert wurden, konnte eine ca. 50-prozentige Reduktion der miR-100 Expression erreicht werden (Abbildung 4 B). In den folgenden Untersuchungen der Zellen, können Veränderungen im mRNA- oder Protein-Level auf die veränderte Expression der miR-100 zurückgeführt werden.

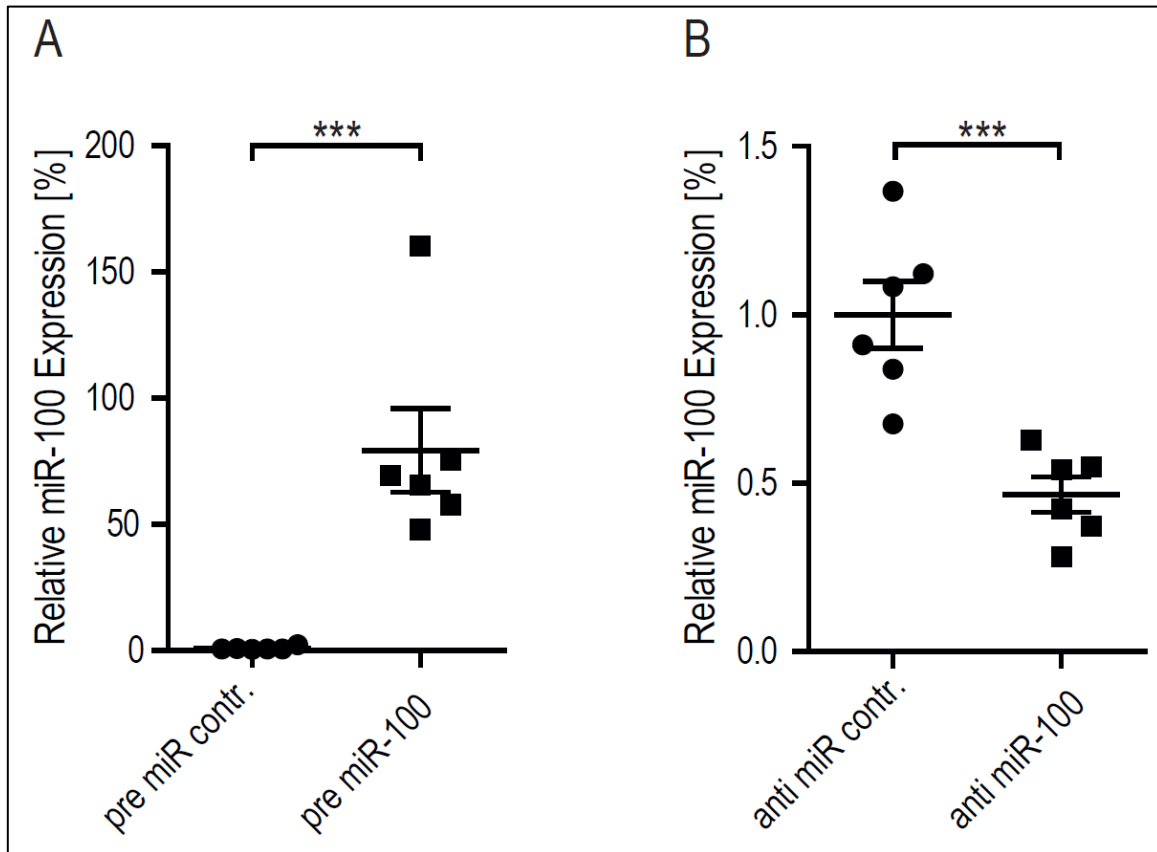


Abbildung 4: Darstellung der relativen miR-100 Expression von humanen pulmonalen Muskelzellen mittels zweistufiger PCR nach Transfektion.

A Mit *precursor* Oligonukleotiden behandelte hPASCs zeigten eine 80-fach erhöhte miR-100 Expression. **B** Die Transfektion von hPASCs mit *antisense* Oligonukleotiden resultierte in einer Reduktion der miR-100-Expression um circa 50 %. n = 6, p = 0,0008

4.1.2 Transkriptomanalyse von transfizierten hPASCs nach miR-100 Modulation

Das Ziel der Transkriptomanalyse (*Next generation sequencing*, NGS) bestand darin, die von miR-100 direkt oder indirekt regulierten Gene zu identifizieren. Hierfür wurden hPASCs nach dem in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Protokoll mit *precursor*-Oligonukleotiden für miR-100 und Kontrollsubstanzen transfiziert. Die miR-100-Überexpression wurde dann, als Kontrolle der Transfektion, vor Durchführung der Transkriptomanalyse mittels "stem-loop" basierender TaqMan PCR bestimmt. Es konnte durch die Transfektion eine deutliche Überexpression von miR-100 in den entsprechenden Zellen, im Vergleich zu den mit Kontrollsubstanzen transfizierten Zellen erreicht werden (Abbildung 5).

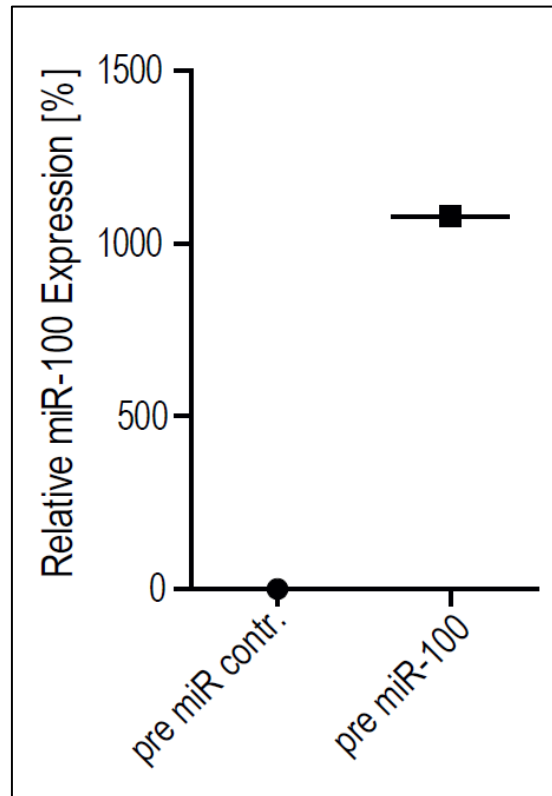


Abbildung 5: Bestimmung der miR-100-Überexpression der transfizierten, für das NGS bestimmten hPASMCs.

hPASMCs wurden für die Isolation von RNA mit *precursor*-Oligonukleotiden transfiziert. Die Überexpression im Vergleich zu Zellen, welche mit Kontrollsubstanzen transfiziert wurden, liegt bei ca. 1000-fach. n = 1.

Anschließend wurde die entsprechende RNA mittels Transkriptomanalyse (NGS) untersucht um potentielle Kandidatengene der miR-100 zu identifizieren. In Tabelle 16 sind die 10 Gene mit der stärksten Herabregulation nach miR-100 Überexpression aufgeführt. Tabelle 17 listet alle 222 durch miR-100 herabregulierten Gene auf. Das am stärksten herabregulierte Gen ist laut der Analyse, das Ependymin-related Protein 1 (EPDR1), welches in einer von Hemnes und Kollegen angefertigten Studie, bei Vasodilatator-responsiven Patienten, eine unterschiedliche Expression aufweist (Hemnes, Trammell et al. 2015). Aufgrund der Tatsache, dass dieses Gen bereits in der Vergangenheit von anderen Arbeitsgruppen mit PH in Verbindung gebracht wurde und es in der angefertigten Transkriptomanalyse das am stärksten regulierte Gen darstellt, wird es in dieser Arbeit weiter analysiert. Des Weiteren wird der BMPR2 aufgrund seiner bekannten Rolle in der Entstehung der PH ebenfalls genauer betrachtet, auch wenn dieser nicht in der Liste der 10 am stärksten regulierten Gene auftaucht.

Tabelle 16: Ergebnisse der Transkriptomanalyse der mit miR-100 *precursor*- und Kontroll-Oligonukleotiden transfizierten hPASCs; aufgeführt sind die 10 am stärksten herabregulierten Gene.

Gensymbol	Name	Relative Änderung der Expressionswerte	q-Wert
EPDR1	Ependymin-related Protein1, Upregulated In Colorectal Cancer Gene 1 Protein, Mammalian Ependymin-Related Protein 1	-1,41083053	8,25E-36
ADAM19	ADAM Metalloproteinase Domain 19, Disintegrin And Metalloproteinase Domain-Containing Protein 19, Metalloprotease And Disintegrin Dendritic Antigen Marker	-1,29105272	2,53E-42
ATP6AP1	ATPase H+ Transporting Accessory Protein 1, ATPase, H+ Transporting, Lysosomal (Vacuolar Proton Pump), Subunit 1, ATPase, H+ Transporting, Lysosomal Accessory Protein 1	-0,79141799	2,20E-10
SMARCD1	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily D, Member 1, 60 KDa BRG-1/Brm-Associated Factor Subunit A	-0,77991366	1,49E-05
KCTD10	Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 10, BTB/POZ Domain-Containing Adapter For CUL3-Mediated RhoA Degradation Protein 3	-0,72378367	8,61E-09
ST6GALNA C4	ST6 N-Acetylgalactosaminide Alpha-2,6-Sialyltransferase 4, Sialyltransferase 7D ((Alpha-N-Acetylneuraminy-2,3-Beta-Galactosyl-1,3)-N-Acetyl Galactosaminide Alpha-2,6-Sialyltransferase)	-0,67760281	0,000788848
IFIT2	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 2, Interferon-Induced 54 KDa Protein	-0,6680399	0,001008937
DIXDC1	DIX Domain Containing 1, Coiled-Coil Protein DIX1	-0,66493892	0,000886775
CDK6	Cyclin Dependent Kinase 6, Serine/Threonine-Protein Kinase PLSTIRE, Cell Division Protein Kinase 6	-0,64643198	6,55E-13
SMARCA5	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 5, SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin A5	-0,62730529	1,72E-07

4.1.3 Die BMPR2-Expression ist nach miR-100 Modulation in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen reguliert

Wie bereits beschrieben, postulieren Yang *et al.* eine direkte Regulation des BMPR2 durch die miR-100 (Yang, Xuebin et al. 2012). Nach Modulation der miR-100 Expression in den humanen pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen wurde die

mRNA-Expression von BMPR2 mittels quantitativer Echtzeit-PCR gemessen. Es zeigte sich eine signifikante Herabregulierung von BMPR2 unter Überexpression der miR-100 (Abbildung 6 A), wohingegen eine Hemmung dieser microRNA in einer 1,8-fachen Heraufregulierung des Rezeptors führte (Abbildung 6 B).

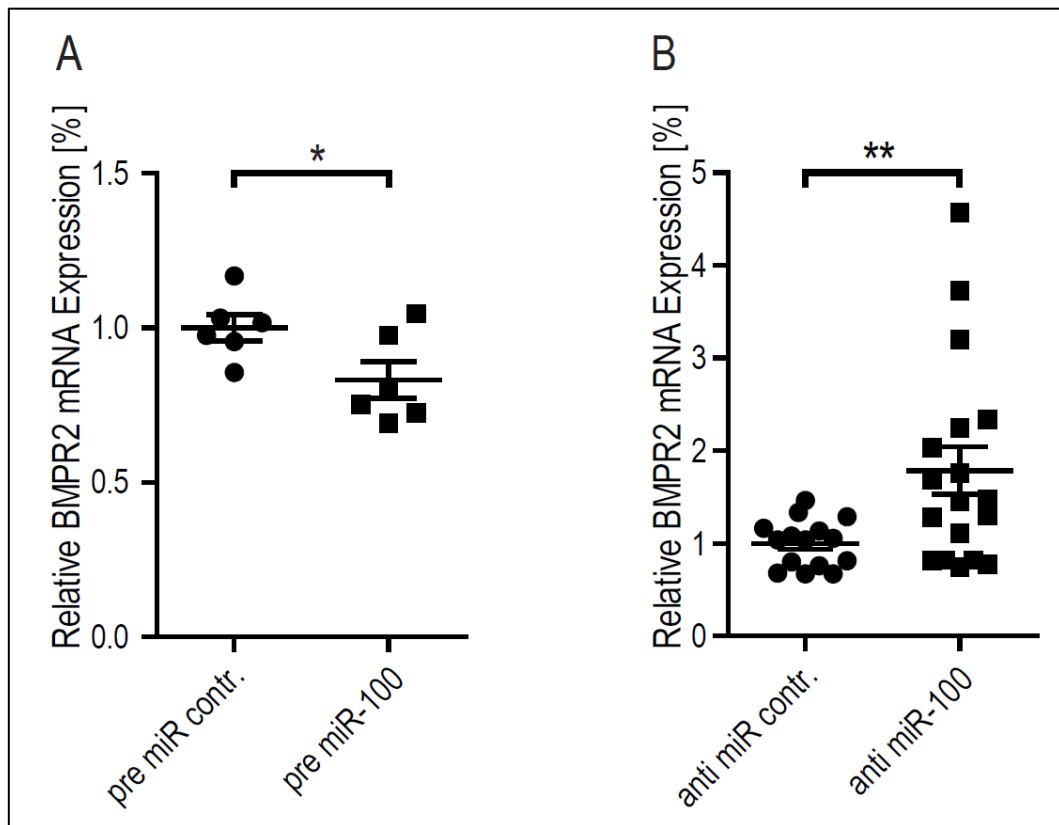


Abbildung 6: BMPR2-Expression in hPASMCs, welche mit precursor- und antisense-Oligonukleotiden für miR-100 transfiziert wurden.

Die relative Expression des BMPR2 auf mRNA-Ebene wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt. **A** Die Transfektion von hPASMCs mit miR-100 *precursor*- Oligonukleotiden führte im Vergleich zu den mit Kontroll-Oligonukleotiden transfizierten Zellen zu einer Herabregulierung des BMPR2 auf mRNA-Ebene. $n = 6$. $p = 0,042$. **B** hPASMCs wurden mit *antisense*- und Kontroll-Oligonukleotiden der miR-100 transfiziert. Diese Transfektion hat zu einer Hochregulation der BMPR2-Expression auf mRNA-Ebene geführt. $n = 15$ vs. 18 . $p = 0,0083$.

4.1.4 Die EPDR1-Expression ist nach miR-100 Modulation in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen reguliert

In Voruntersuchungen (Transkriptionsanalyse (Tabelle 16)) wurde der EPDR1, als das am potentiell stärksten herabregulierte Gen durch miR-100 ermittelt. Ziel der Untersuchung der transfizierten hPASMCs war es, diese Regulation erneut zu zeigen.

Die spezifische Analyse der EPDR1 Expression mittels Q-PCR in transfizierten hPASCs zeigte, dass nach Transfektion mit *precursor*-Oligonukleotiden der miR-100 (pre miR-100) eine signifikante Herabregulierung stattfindet (Abbildung 7 A). Dementgegen führt eine Transfektion mit *antisense*-Oligonukleotiden (anti miR-100) zu einer Hochregulation des EPDR1 verglichen mit Zellen, welche mit Kontrollsubstanzen (pre miR/ anti miR contr.) transfiziert wurden (Abbildung 7 B).

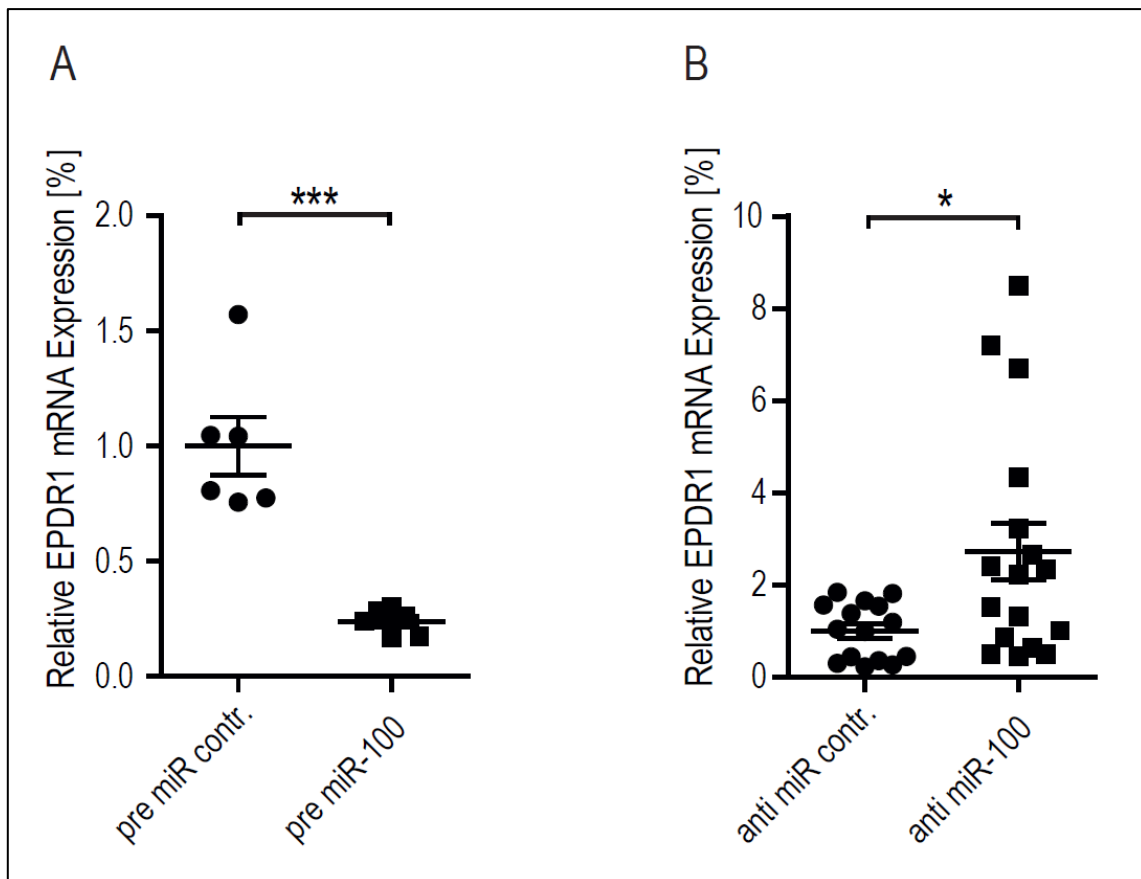


Abbildung 7: EPDR1-Expression auf mRNA-Ebene in transfizierten hPASCs

Die relative Expression des EPDR1 wurde in hPASCs mithilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR untersucht. **A** Die Zellen wurden mit *precursor*- und Kontroll-Oligonukleotiden der miR-100 transfiziert. Es ist eine signifikante Herabregulierung des EPDR1 zu sehen. n = 6. p = 0,0001. **B** Demgegenüber wurden Zellen mit *antisense*- und Kontroll-Oligonukleotiden für miR-100 transfiziert. Diese Zellen weisen eine signifikante Heraufregulation des EPDR1-Level auf. n = 15 vs. 18. p = 0,0151.

4.2 Tierversuch

4.2.1 Körpergewicht der Versuchstiere vor und nach der Tamoxifeninjektion

Die Mäuse wurden vor der ersten Tamoxifeninjektion gewogen (Abbildung 8 A) und anschließend jeden Tag 100 µl i.p. Tamoxifen injiziert. Die Wildtyp-Mäuse, welche nach Abschluss der Tamoxifengabe in der Hypoxie gehalten wurden, haben im Durchschnitt zu Beginn der Injektionen 32,3 g gewogen und nahmen während der fünf Tage im Durchschnitt 0,3 g ab. Die transgenen Mäuse hingegen starteten im Durchschnitt mit 33,5 g und nahmen während der fünf Tage 0,75 g zu. Wie bereits bei den Wildtyp-Mäusen, die für die Normoxie bestimmt waren, nahmen die Mäuse der Wildtyp-Mäuse für die Hypoxie während der Injektionsperiode leicht ab (0,24 g) und begannen die sechswöchige Hypoxieexposition mit einem Gewicht von durchschnittlich 28,86 g. Die transgenen Mäuse, welche in die Hypoxie-Kammer gelangten, nahmen jedoch in den fünf Tagen mit durchschnittlich 1,21 g am stärksten zu und erreichten zu Beginn der Hypoxie ein Gewicht von durchschnittlich 30,81 g.

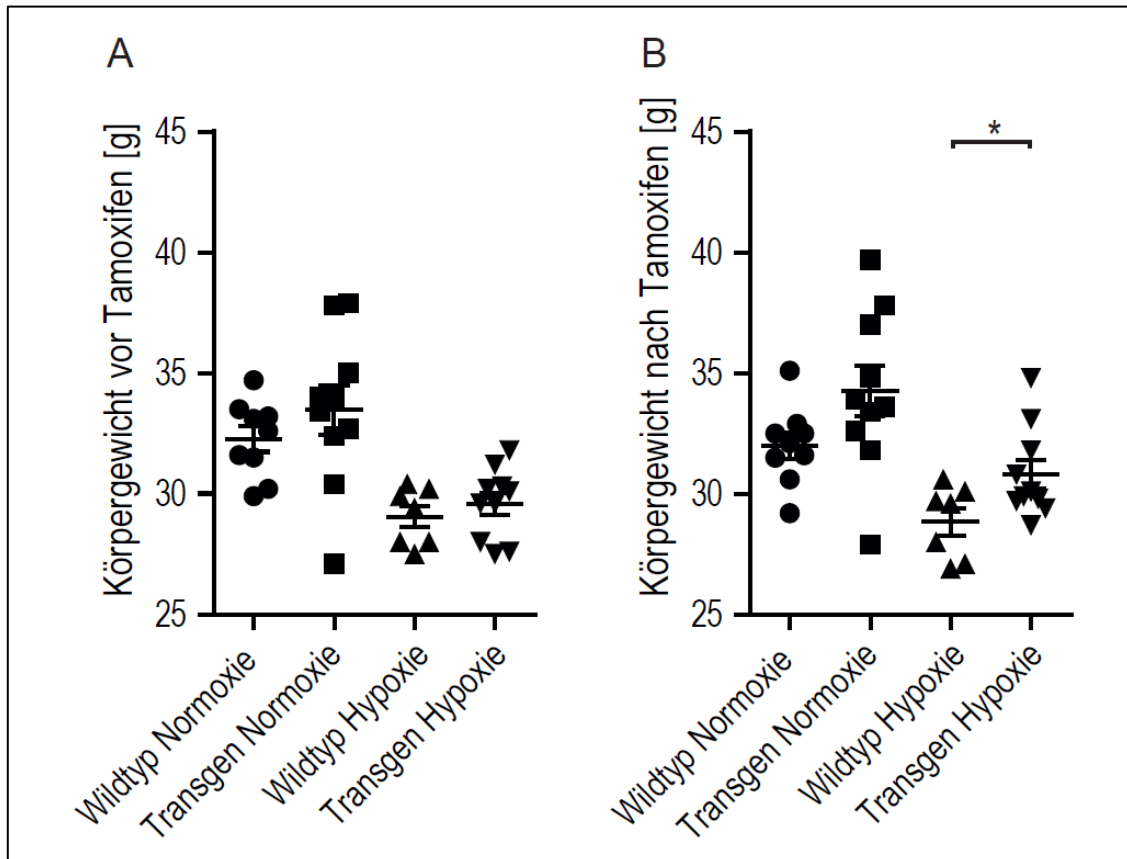


Abbildung 8: Körpergewichte der Versuchstiere vor und nach der fünftägigen Tamoxifeninjektion

A Die Mäuse wurden vor der Tamoxifeninjektion gewogen. Hierbei zeigt sich jeweils unter den für die Normoxie und Hypoxie bestimmten Gruppen ein nicht signifikant geringeres Gewicht bei den Wildtyp-Mäusen. $n \geq 7$. **B** Nach Abschluss der fünftägigen Tamoxifeninjektion wurden die Mäuse erneut gewogen und anschließend in die Hypoxie-Kammer gesetzt. Die Wildtyp-Mäuse sind jeweils leichter als die dazugehörigen transgenen Mäuse (Normoxie-Normoxie; Hypoxie-Hypoxie). Zwischen den beiden Gruppen in der Hypoxie ist ein signifikanter Unterschied im Gewicht sichtbar. $n \geq 7$. $p = 0,0383$.

4.2.2 Körper-Parameter der Versuchstiere nach dem Versuch

Die Mäuse nahmen in den ersten zwei Tagen nach Start der Hypoxie-Exposition bis zu 20 % Körpergewicht ab, welches sich in der folgenden Zeit wieder normalisierte. Die Wildtyp-Mäuse sind, im Vergleich zu den transgenen Mäusen, insgesamt mit einem geringeren Körpergewicht in den Versuch gestartet. Die beiden Mauslinien zeigten nach 6-wöchiger Hypoxieexposition im Vergleich zu den Versuchsgruppen in Normoxie ein verringertes Körpergewicht, was jedoch nicht statistisch zu erfassen war. Lediglich zwischen den beiden Mauslinien, welche unter Hypoxie gehalten wurde, ist ein signifikanter Unterschied der Gewichte zu sehen (Abbildung 9 A). So wogen die normoxisch gehaltenen Wildtyp-Mäuse am Ende des Versuchs im Durchschnitt 32,84 g, die unter hypoxischen Bedingungen gehaltenen Mäusen

wogen im Durchschnitt 31,18 g, was einen Verlust von durchschnittlich 1,66 g darstellt. Die normoxisch gehaltenen Transgen-Mäuse wogen zu Beginn im Durchschnitt 34,46 g, verloren unter Hypoxieexposition 1,19 g und wiesen am Ende durchschnittlich nur 33,27 g auf.

Die Herzgewichte (Abbildung 9 B) der einzelnen Gruppen liegen zwischen 157,09 mg und 169,55 mg und weisen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf. Um das Herzgewicht zu normieren, wurde ein Quotient aus Herzgewicht und Tibialänge erstellt (Herzgewicht/Tibialänge) (Abbildung 9 C). Er gibt das relative Herzgewicht in Bezug auf Tibialänge an. Hierbei wird kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen sichtbar. Normiert man das Herzgewicht auf die Tibialänge, so wirken sich stress- oder haltungsbedingte Gewichtsabweichungen nicht auf die Berechnung aus. Bezieht man das Gewicht des linken Ventrikels und des Septums auf die Körpermasse der Mäuse (Abbildung 9 D), so sieht man eine deutliche Differenz zwischen den Wildtyp-Mäusen in Normoxie und den übrigen Versuchsgruppen. Demgegenüber zeigt das Verhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel + Septum (Abbildung 9 E), dass unter hypoxischen Bedingungen die rechte Herzhälfte deutlich an Gewicht zugenommen hat. Die jeweilige Hypoxie-Gruppe ist im Gewicht des rechten Ventrikels signifikant erhöht, bezogen auf die Kontrollgruppe.

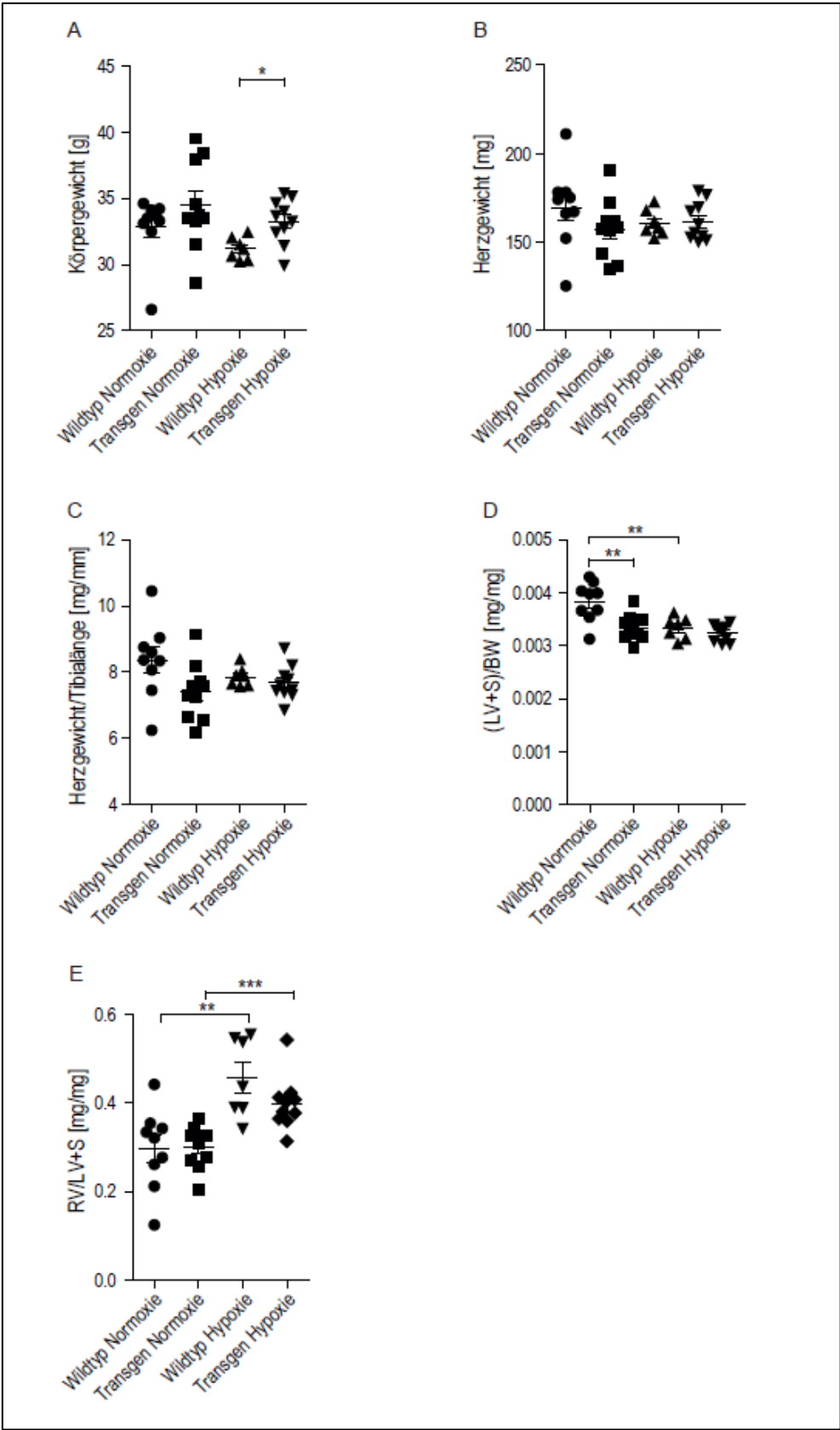


Abbildung 9: körperliche Parameter der Versuchsmäuse nach der Exposition mit Normoxie oder Hypoxie

A Das Körpergewicht wurde am Ende des sechswöchigen Versuches bestimmt. $n \geq 7$. $p = 0,0185$. **B** Das Herzgewicht der Mäuse wurde während der Organentnahme gewogen, weshalb die großen Gefäße und das Blut in den Kammern entfernt wurden. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ersichtlich. $n \geq 7$. **C** Der Quotient aus Herzgewicht und der Tibialänge stellt das Herzgewicht ebenfalls in Relation dar. Hierbei können keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. $n \geq 7$. **D** Das Gewicht des linken Ventrikels + Septum (LV+S), wurde auf das Körpergewicht normiert. Hierbei zeigt sich ein signifikant größerer Quotient bei den Wildtyp-Mäusen in Normoxie im Vergleich zu den transgenen Mäusen in Normoxie und den Wildtyp-Mäusen in Hypoxie. $n \geq 7$. $p = 0,0026$ & $p = 0,0063$. **E** In diesem Graphen wird das Gewicht des rechten Ventrikels (RV) auf das Gewicht des linken Ventrikels und des Septums (LV+S) bezogen. Die Versuchstiere, welche in Normoxie gehalten wurden, zeigen zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe in der Hypoxie eine signifikante Veränderung. Die Quotienten der hypoxisch gehaltenen Tiere sind deutlich größer, als die der normoxisch gehaltenen Tiere. $n \geq 7$. $p = 0,0033$ & $p = 0,0008$.

4.2.3 Echokardiographie der Versuchstiere

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden von Dr. Achim Lothar/ Universitäts-Herzzentrum Freiburg-Bad Krozingen, Klinik für Kardiologie und Angiologie I, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, durchgeführt. Das Ziel der Untersuchungen stellt die Beurteilung der Parameter des Herzens dar. Der große Vorteil liegt darin, dass die Untersuchungen am lebenden Tier durchgeführt werden können.

4.2.3.1 Echokardiographisch unveränderte LV-Ejektionsfraktionen und Abweichungen in den RVIDd/LVIDd-Quotienten der Versuchstiere

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion gibt die Fähigkeit des Herzens an, Blut aus der linken Herzkammer in den Körperkreislauf zu pumpen. Bei der Beurteilung des RVIDd/LVIDd-Quotienten wird die Größe des rechten Ventrikels, bezogen auf den linken Ventrikel, gemessen.

Die linksventrikulären Ejektionsfraktionen (Abbildung 10 A) aller vier untersuchten Gruppen weisen einen Wert von 54,38% ($\pm 4,41$) auf. Es ist keine signifikante Veränderung innerhalb der vier Gruppen zu sehen. Bei dem Quotienten aus rechtem und linkem Ventrikel-Innendurchmesser (Abbildung 10 B), weisen beide Gruppen der Hypoxie einen im Verhältnis zu den Normoxie-Gruppen, deutlich vergrößerten Quotienten auf.

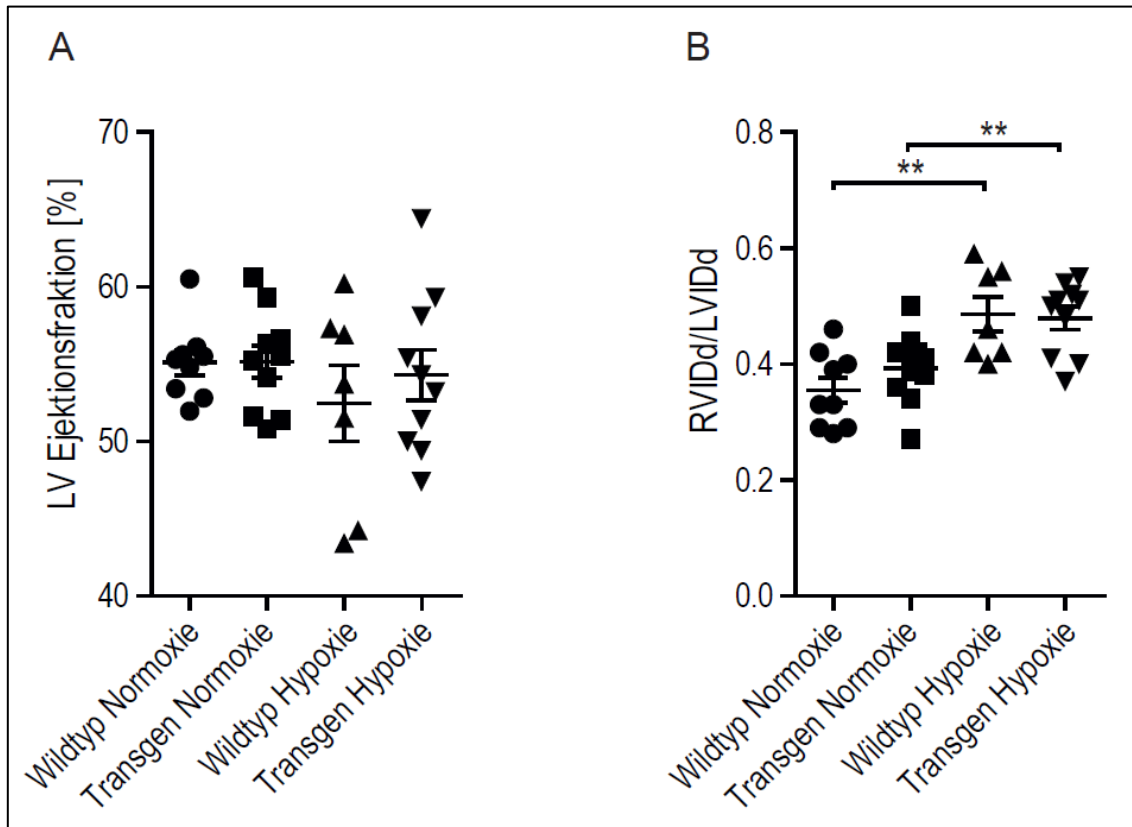


Abbildung 10: Echokardiographische Untersuchungen der LV-Ejektionsfraktion und des RVIDd/LVIDd-Quotienten der Mäuse

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Achim Lothar, Universitäts-Herzzentrum Freiburg-Bad Krozingen, Klinik für Kardiologie und Angiologie I, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie.

A Die linksventrikulären (LV) Ejektionsfraktionen der vier Versuchsgruppen weisen keinen signifikanten Unterschied untereinander auf. $n \geq 7$. **B** Die Innendurchmesser der Herzkammern wurden über die Kurzachse gemessen. Ein Quotient aus rechtem Ventrikel-Innendurchmesser (RVIDd) und linkem Ventrikel-Innendurchmesser (LVIDd) gibt Aufschluss über den Grad der Dilatation des rechten Ventrikels. Zwischen den Wildtyp-Mäusen in Normoxie und den Wildtyp-Mäusen in Hypoxie ist eine signifikante Veränderung zu sehen. Ebenfalls ist eine Veränderung zwischen den transgenen Mäusen in Normoxie und Hypoxie ersichtlich. $n \geq 7$. $p = 0,0026$ & $p = 0,0065$.

4.2.3.2 Beurteilung der TAPSE

Die TAPSE (engl. Tricuspid annular plane systolic excursion) wird während des 4-Kammerblickes mittels M-Mode gemessen, wobei man die Achse des Schalls in den lateralen Rand des Trikuspidalklappenringes (Trikuspidalannulus) legt. Sie zeigt die Beweglichkeit des Trikuspidalannulus an. Bei Funktionsverlust des rechten Ventrikels ist dieser Parameter verringert. Zwischen den Versuchsgruppen in Hypoxie und den dazugehörigen Kontrolltieren, welche in Normoxie gehalten wurde, ist jeweils ein signifikanter Unterschied in der TAPSE ersichtlich (Abbildung 11, Graph). Die unter hypoxischen Verhältnissen gehaltenen Tiere weisen einen deutlich verringerten Messwert auf. Die jeweils unter gleichen Bedingungen gehaltenen Tiergruppen

zeigen hingegen keine signifikanten Unterschiede. Ebenfalls werden beispielhafte sonographische Bilder gezeigt (Abbildung 11, rechte Seite), in denen eine deutliche Verringerung der TAPSE unter Hypoxieexposition, im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe zu sehen ist.

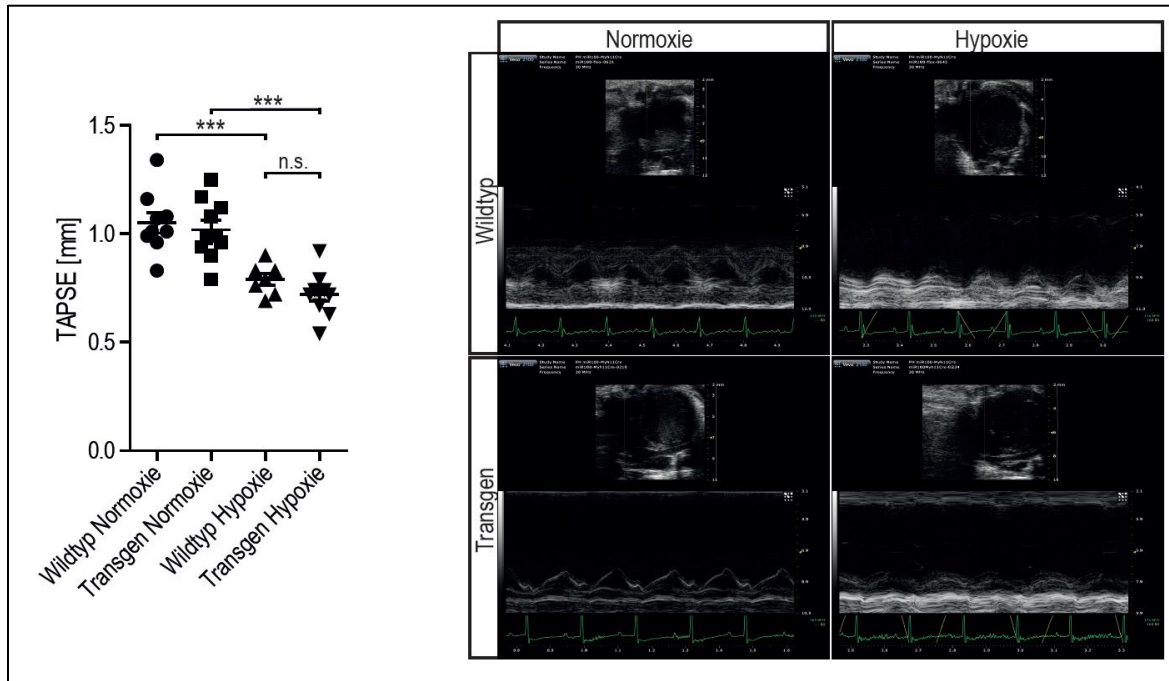


Abbildung 11: Echokardiographische Untersuchung der TAPSE bei den Versuchsmäusen

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Achim Lothar, Universitäts-Herzzentrum Freiburg-Bad Krozingen, Klinik für Kardiologie und Angiologie I, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie.

In beiden Tiergruppen (Wildtyp und Transgen), die unter hypoxischen Verhältnissen gehalten wurden, verringern sich die TAPSE-Werte signifikant zur jeweiligen Kontrollgruppe in Normoxie. Die Werte zwischen Wildtyp- und transgenen Mäusen in Hypoxie unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Gezeigt sind repräsentative sonographische Messungen der Versuchstiere unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen. $n \geq 7$. $p = 0,0006$ & $p < 0,0001$.

4.2.3.3 Beurteilung des PAT/PET-Quotienten

In dieser Messung wurde sowohl die pulmonale Akzelerationszeit (PAT, engl. pulmonary acceleration time) als auch die pulmonale Ejektionszeit (PET, engl. pulmonary ejection time) gemessen. Die PAT gibt dabei die Zeitspanne des Ausflusses in die pulmonalen Gefäße zwischen Beginn und höchster erreichter Geschwindigkeit an. Die PET dagegen gibt die gesamte Ausflusszeit an. Gemessen werden beide in der parasternalen Kurzachse mit Hilfe des Farbdopplers. Ein Quotient aus diesen beiden erhobenen Werten lässt auf die Druckverhältnisse in der rechten Herzkammer schließen. Ein erhöhter rechtsventrikulärer Druck führt zu einem erniedrigten PAT/PET-Quotienten. Die Tiergruppen, welche in Hypoxie

gehalten wurden, weisen im Vergleich zu den Kontrollgruppen in Normoxie einen signifikant verringerten Quotienten auf. Die transgenen Mäuse in Hypoxie haben zusätzlich einen signifikant niedrigeren Wert, als die Wildtyp-Mäusen in Hypoxie (siehe Abbildung 12, Graph). Auf der rechten Seite der Abbildung 12 sind representative sonographische Aufnahmen der Versuchsmäuse abgebildet. Zu sehen sind die Dopplerkurven der Pulmonalarterien, anhand derer die pulmonale Akzelerationszeit und die pulmonale Ejektionszeit gemessen werden können.

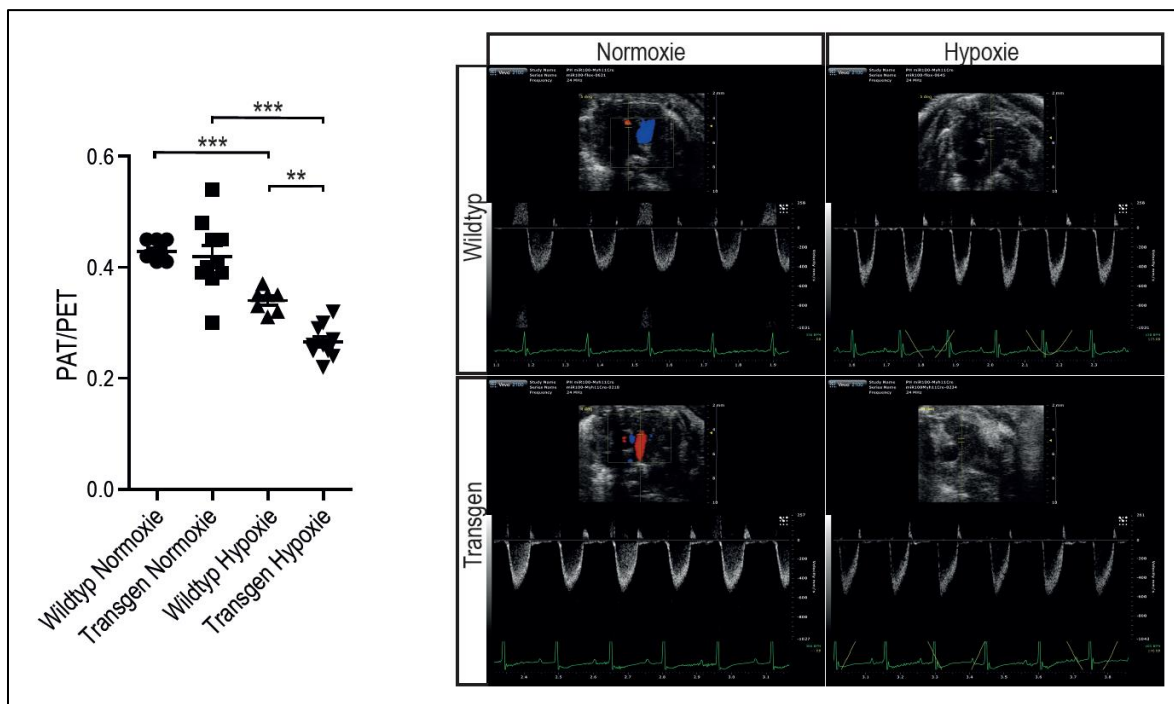


Abbildung 12: Echokardiographische Untersuchung des PAT/PET-Quotienten der Versuchsmäuse

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Achim Lothar, Universitäts-Herzzentrum Freiburg-Bad Krozingen, Klinik für Kardiologie und Angiologie I, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie.

Beide Versuchsgruppen, die sich in normoxischen Verhältnissen befanden, zeigen einen ähnlichen und nicht signifikant veränderten PAT/PET-Quotienten. Dahingegen zeigen die beiden Gruppen in Hypoxie, jeweils auf ihre Kontrollgruppe in Normoxie eine deutliche Veränderung. Der Quotient wird bei beiden signifikant geringer. Zwischen Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen in der Hypoxie ist ebenfalls ein signifikanter Unterschied zu beobachten. So weisen die transgenen Mäuse in Hypoxie den geringsten Quotienten aller vier Gruppen auf. Gezeigt sind representative sonographische Messungen der Versuchstiere unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen. $n \geq 7$. $p < 0,0001$.

4.2.4 Histologische Untersuchung der Lungengefäße

Die histologische Auswertung der Lungengefäße hatte das Ziel, die Veränderungen in den Lungengefäßen der einzelnen Versuchsgruppen, welche durch die Hypoxie ausgelöst wurden, zu bestimmen. Die histologisch angefertigten Schnitte, welche mit

einer Elastica-van-Gieson Färbung angefärbt wurden, zeigen eine deutliche Verdickung der *Tunica media* unter Hypoxieexposition. Sowohl die Wildtyp-Mäuse (Abbildung 13 B,E), als auch die transgenen Mäuse (Abbildung 13 D,E) präsentieren eine signifikante Proliferation ($p < 0,0001$) der glatten Muskelzellen durch Hypoxieexposition. Zwischen den beiden Gruppen, welche sich in der Hypoxiekammer (Wildtyp und Transgen) befanden ist ebenfalls eine signifikante Veränderung zu sehen, sodass die transgenen Mäuse eine deutlich verdickte *Tunica media* im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen aufweisen ($p = 0,0004$). Die glatten Muskelzellen befinden sich zwischen beiden dunkelviolet angefärbten elastischen Membranen der Gefäßwand und werden gelb-rötlich angefärbt.

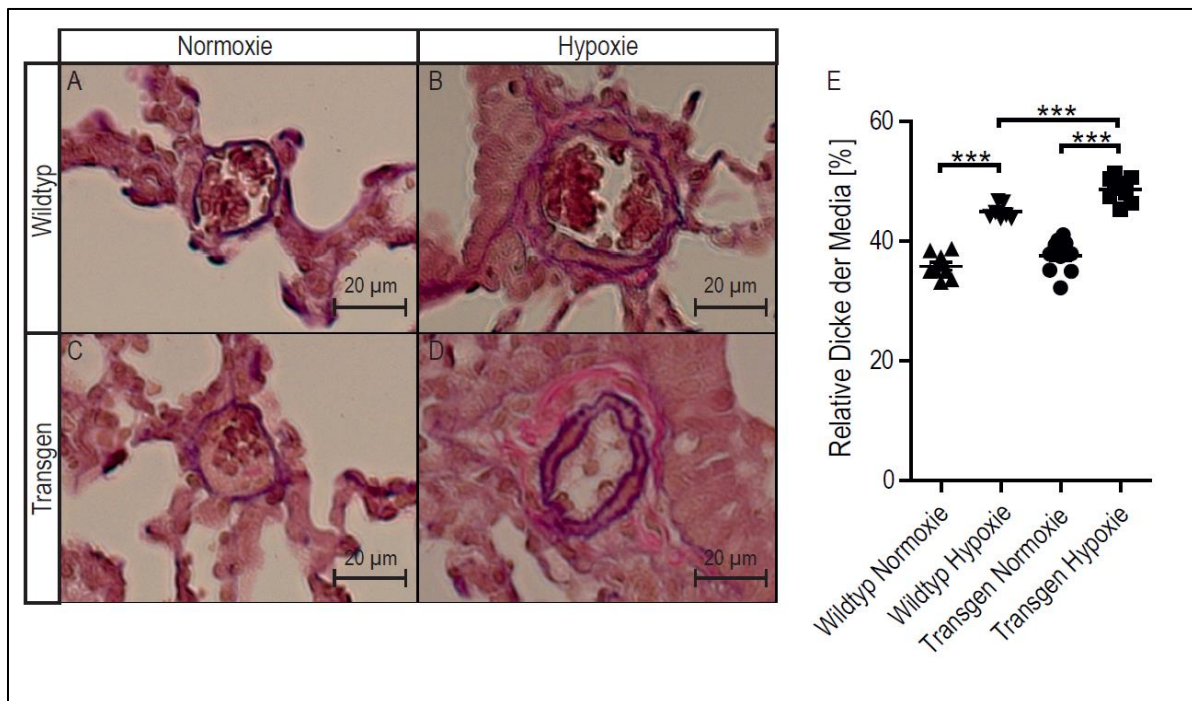


Abbildung 13: Elastica-van-Gieson Färbung der arteriellen Lungengefäße.

Die histologisch angefertigten Schnitte wurden mit einer Elastica-van-Gieson Färbung angefärbt und pro Lunge wurden 20 kleine Arterien auf die Dicke der *Tunica media* untersucht. **A-D** Gezeigt sind beispielhafte Bilder der kleinen Arterien in den Lungen der einzelnen Versuchstiere **E Darstellung der histologischen Auswertung aus A-D**. Zwischen den Wildtyp-Mäusen in Normoxie und den Wildtyp-Mäusen in Hypoxie ist ein signifikanter Unterschied dahingehend zu sehen, dass die Mäuse in der Hypoxie deutlich verdickte *Tunica mediae* besitzen. Auch die transgenen Mäuse in Hypoxie haben eine deutlich verdickte *Tunica media* im Vergleich zu den transgenen Mäusen in der Normoxie. Diese transgenen Mäuse in der Hypoxie haben zusätzlich eine verdickte *Tunica media* im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, die ebenfalls in der Hypoxie gehalten wurden.. $n \geq 7$. $p < 0,0001$ & $p = 0,0004$.

4.2.5 Keine Veränderung der miR-100-Expression in den Lungen der Versuchstiere

Nach Abschluss des Tierversuches wurden den Tieren diverse Organe entnommen. Da die Lungen mit einer Vielzahl von Gefäßen, welche zu weiten Teilen aus glatten Muskelzellen bestehen, durchzogen sind, wurden diese lysiert. Ziel war es, die mittels Tamoxifen induzierte Überexpression der miR-100 in den glatten Muskelzellen darzustellen. Anhand der miR-100 Expression in den Lungen der Mäuse, kann überprüft werden, ob das Cre/loxP-System, funktioniert hat. Weder zwischen den Tiergruppen in Normoxie (Abbildung 14 A), noch zwischen den Gruppen in Hypoxie (Abbildung 14 B) konnte ein signifikanter Unterschied in der miR-100 Expression detektiert werden.

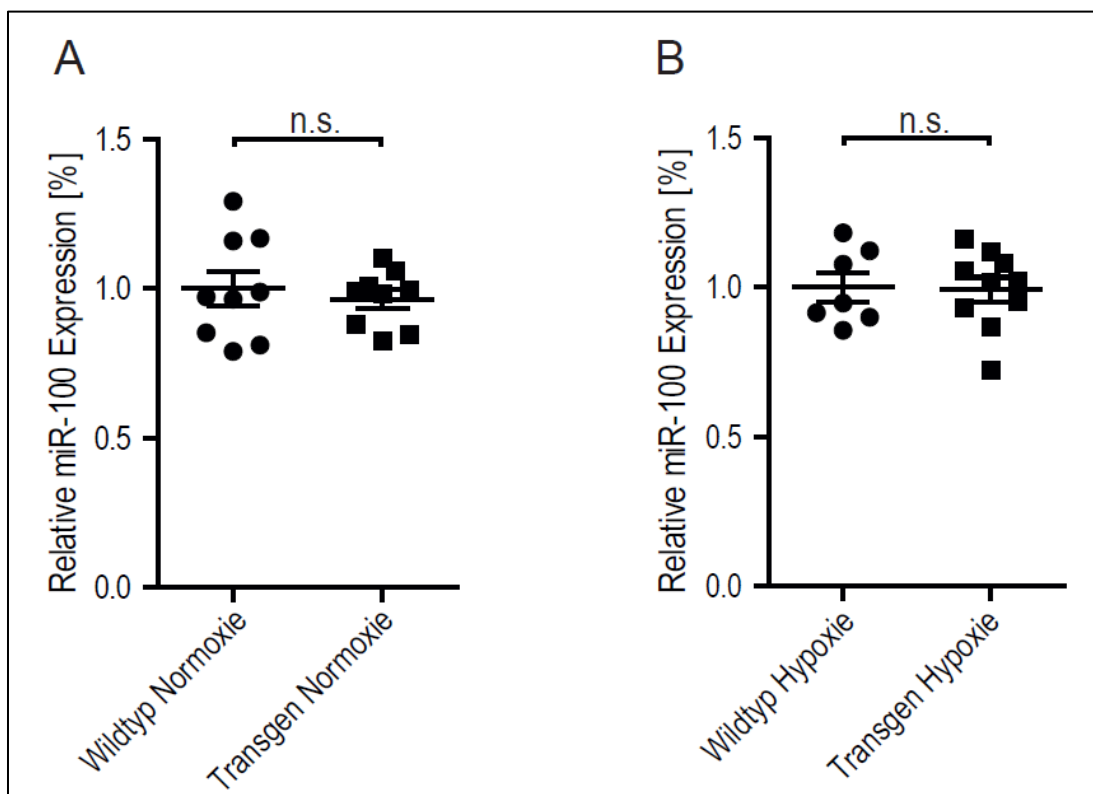


Abbildung 14: miR-100 Expression in den Lungen der Versuchstiere

Die relative miR-100 Expression in Lungenlysaten der Versuchstiere wurde mittels einer quantitativen Echtzeit-PCR ermittelt. Die Proben stammen aus Versuchstieren, die sowohl unter normoxischen, als auch unter hypoxischen Verhältnissen gehalten wurden. **A** Zwischen den beiden Tiergruppen in der Normoxie sind keine unterschiedlichen Expressionslevel der miR-100 zu sehen. $n = 9$. **B** Bei den beiden Versuchsgruppen in der Hypoxie sind ebenfalls keine Unterschiede in der Expression der miR-100 ersichtlich. $n = 7$ vs. 9 .

4.2.6 Keine Veränderung der BMPR2-Expression in den Lungen der Versuchstiere

Da die miR-100 durch das Cre/loxP-System in den glatten Muskelzellen überexprimiert sein sollte, wurde in den RNA-Proben aus den Lungenlysaten, die BMPR2-Expression gemessen. Hintergrund dieser Untersuchung war es, dass die miR-100 als Regulator des BMPR2 einen Einfluss auf dessen Expression hat. Bei den Gruppen, die unter Normoxie gehalten wurden (Abbildung 15 A) ist kein signifikanter Unterschied in der relativen BMPR2-Expression zu sehen. Die unter hypoxischen Verhältnissen gehaltenen Tiere (Wildtyp & Transgen) (Abbildung 15 B) zeigen ebenfalls keinen Unterschied in ihrem BMPR2-Expressionslevel.

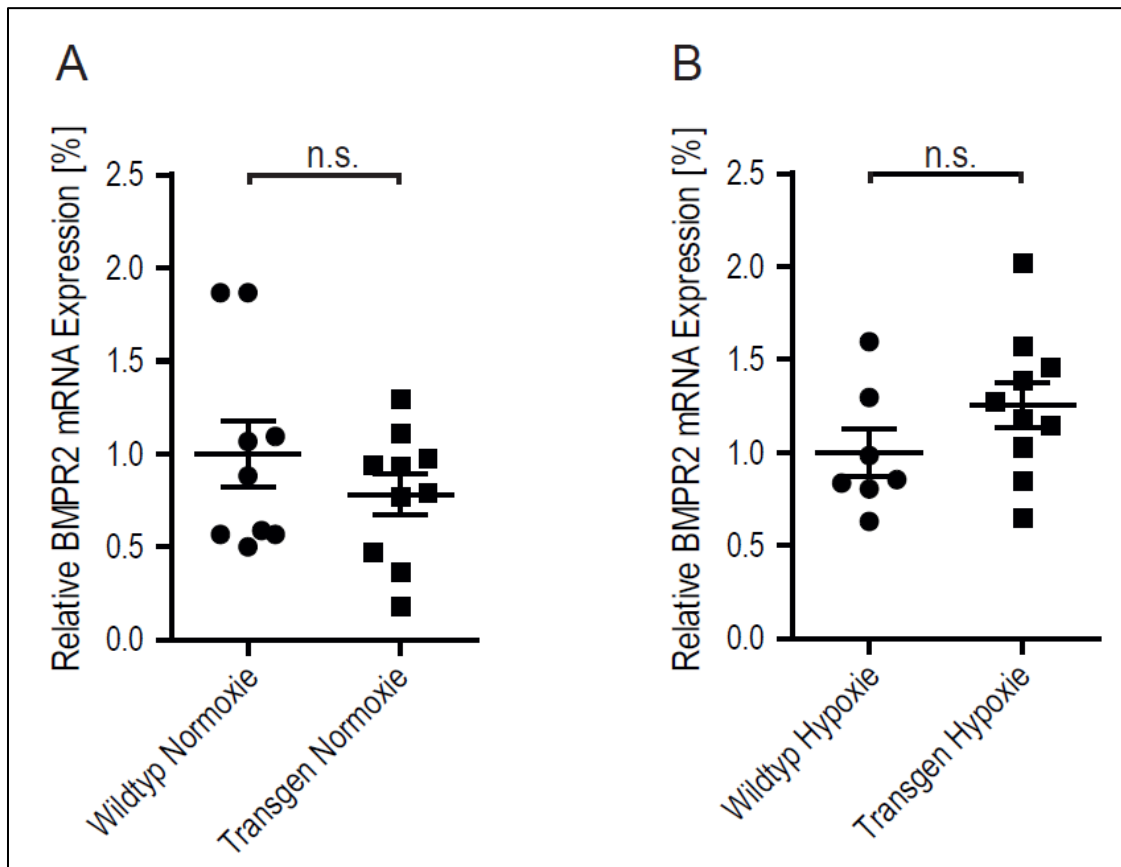


Abbildung 15: BMPR2-Expression in Lungen der Versuchstiere auf mRNA-Ebene

Die BMPR2-Expression wurde in RNA-Proben, die aus Lungenlysaten gewonnen wurden, untersucht. **A** Unter normoxischen Verhältnissen lässt sich kein signifikanter Unterschied der BMPR2-Expression auf mRNA-Ebene zwischen Wildtyp-Mäusen und miR-100 überexprimierenden Mäusen (Transgen) darstellen. n = 9 vs. 10. **B** In der Hypoxie zeigen die transgenen Mäuse eine etwas höhere BMPR2-Expression auf mRNA-Ebene, die jedoch statistisch nicht signifikant dargestellt werden kann. n = 7 vs. 10.

Neben der Analyse der BMPR2-Expressionen auf mRNA-Ebene, wurde aus den Lungen ebenfalls eine Proteinprobe generiert. Diese wurden mittels Western Blot Analyse auf die Expression des BMPR2 hin untersucht (Abbildung 16). Als

Ladekontrollen, wurden die Proteinexpressionen von RalA verwendet, auf welche die Expressionen des BMPR2 standardisiert wurden. Bei den unter Normoxie gehaltenen Versuchsgruppen ist kein signifikanter Unterschied zu sehen (Abbildung 16 A,B). Auch bei den Versuchsgruppen der Hypoxie ist kein signifikanter Unterschied in der relativen BMPR2-Expression ersichtlich (Abbildung 16 C,D)

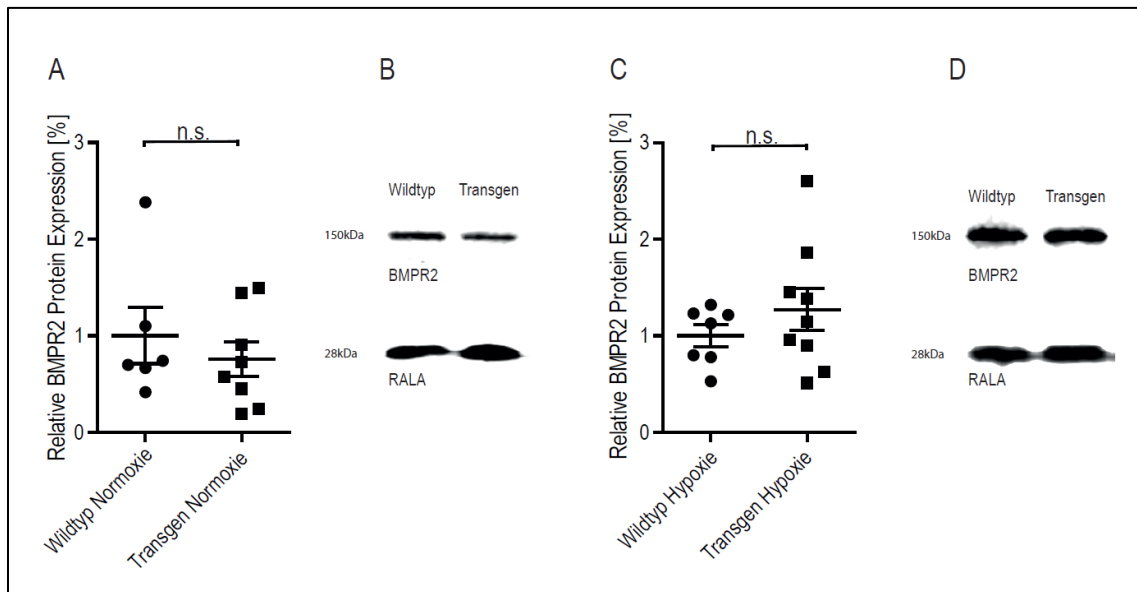


Abbildung 16: BMPR2-Expression in Lungen der Versuchstiere auf Protein-Ebene

Die Analyse der Proteinproben der Lungen wurde mittels eines Western Blots durchgeführt. Hierfür wurden Primärantikörper der Firma Cell Signaling (BMPR2) und der Firma BD Biosciences (RalA) verwendet. **A** Die BMPR2-Expression zwischen den Wildtyp- und den transgenen Mäusen in der Normoxie unterscheiden sich nicht signifikant. $n = 6$ vs. 8 . **B** Beispielhafte Proteinbanden beider Tiergruppen in Normoxie, sowohl für den BMPR2, als auch für RalA. **C** Die unter hypoxischen Verhältnissen gehaltenen Tiere (Wildtyp & Transgen) weisen keine unterschiedliche Expression des BMPR2 auf Proteinebene auf. $n = 7$ vs. 9 . **D** Beispielhafte Proteinbanden beider Tiergruppen in Hypoxie, sowohl für den BMPR2, als auch für RalA.

4.2.7 EPDR1-Expression in Lungen der Versuchstiere

Zusätzlich zur Analyse des BMPR2 in den Lungenproben, erfolgte auch die Untersuchung der Expression des potentiellen miR-100 Ziels EPDR1.

Hierbei zeigte sich unter normoxischen Bedingungen auf mRNA-Ebene eine Herabregulation der EPDR1 Expression in den Lungen der transgenen Tiere verglichen mit den Wildtyp Mäusen (Abbildung 17 A). Unter Hypoxiebedingungen konnte im Gegensatz dazu eine Heraufregulation des EPDR1 in den transgenen Versuchstieren beobachtet werden (Abbildung 17 B).

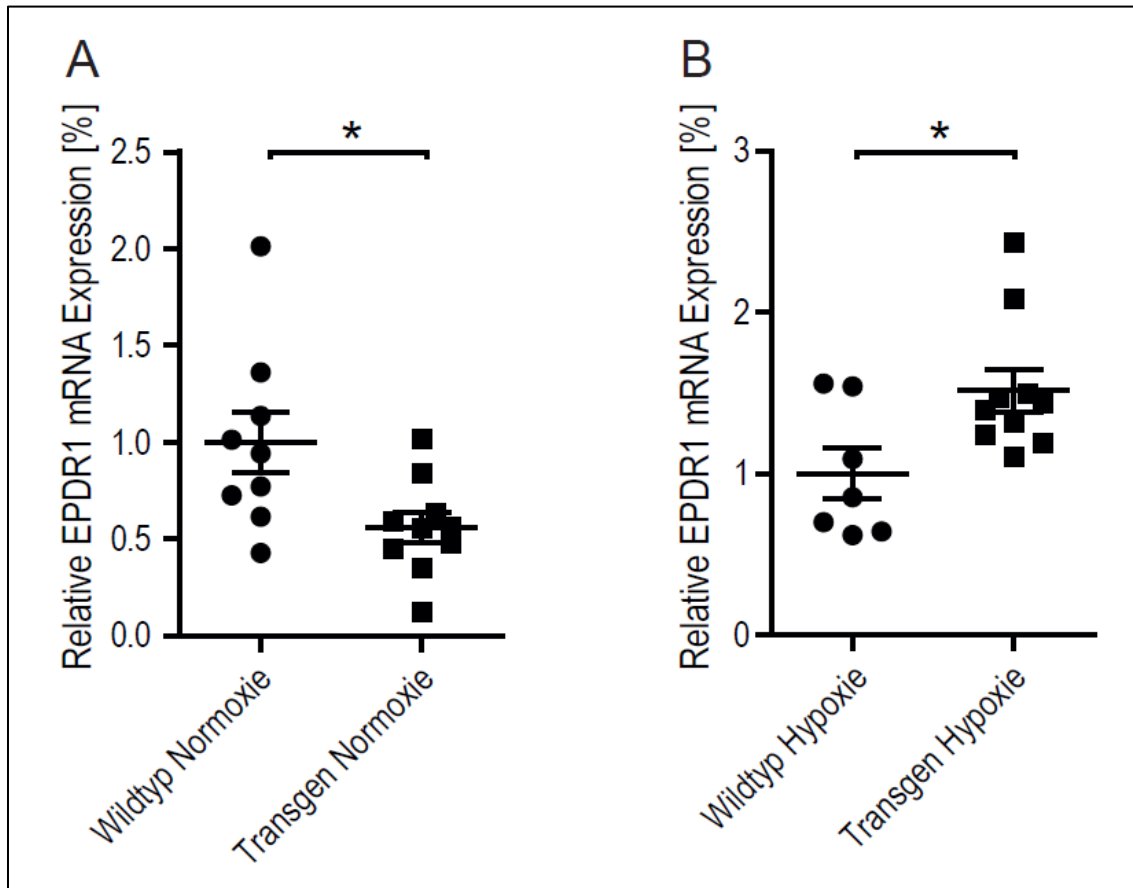


Abbildung 17: EDPR1-Expression in Lungen der Versuchstiere auf mRNA-Ebene

Die EPDR1-Expression wurde in RNA-Proben, die aus Lungenlysaten hergestellt wurde, untersucht. Hierfür wurde eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. **A** Die in der Normoxie gehaltenen Tiergruppen zeigen eine signifikant unterschiedliche EPDR1-Expression. Die transgenen Mäuse weisen deutlich geringere Expressionslevel auf. $n = 9$ vs. 10 . $p = 0,0188$. **B** Unter hypoxischen Verhältnissen gehaltene Tiere zeigen ebenfalls eine signifikant unterschiedliche Expression des EPDR1. Jedoch ist die Expression der transgenen Versuchsmäuse in der Hypoxie deutlich höher, als die der Wildtyp-Mäuse. $n = 7$ vs. 10 . $p = 0,0236$.

Neben der Untersuchung der EPDR1-Expression auf mRNA-Ebene, wurde anschließend zusätzlich ein Western Blot mit Proteinproben aus dem Lungenlysate durchgeführt.

Als Ladekontrolle wurde ebenfalls wie bereits in Abbildung 16 in beiden Westernblots das Protein Ra1A verwendet, was keinerlei strukturelle Veränderung durch hypoxische Verhältnisse aufweist. Beide Versuchstiergruppen, die unter Normoxie für 6 Wochen gehalten wurden, zeigen eine relativ ähnliche Expression des EPDR1 (Abbildung 18 A,B). Es ist kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen vorhanden. Mäuse, die in Hypoxie gehalten wurden, weisen ebenfalls keine signifikante Veränderung in der Proteinexpression des EPDR1 auf (Abbildung 18 C,D). Es handelt sich hierbei um die gleichen Lungenlysate, wie sie bereits in 5.2.6 für die Expression des BMPR2 verwendet wurden.

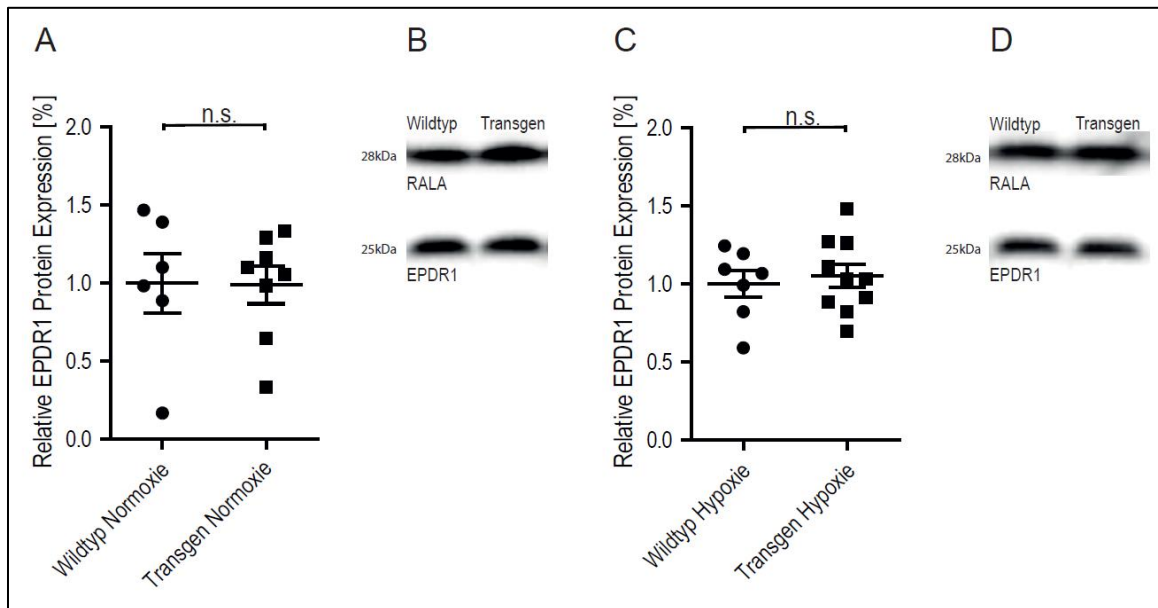


Abbildung 18: EPDR1-Expression in Lungen der Versuchstiere auf Protein-Ebene

Die Analyse der Proteinproben wurde mithilfe eines Western Blots durchgeführt. Hierfür wurden Primärantikörper der Firma Abcam (EPDR1) und der Firma BD Biosciences (RalA) verwendet. **A** Die Protein-Expression von EPDR1 in den beiden Tiergruppen (Wildtyp und Transgen) in der Normoxie, zeigt keinen signifikanten Unterschied. n = 6 vs. 8. **B** Beispielhafte Proteinbanden beider Tiergruppen in Normoxie, sowohl für EPDR1, als auch für RalA. **C** Die Protein-Expressionen des EPDR1 bei Wildtyp-Mäusen, verglichen mit transgenen Mäusen in der Hypoxie, zeigen keinen signifikanten Unterschied. n = 7 vs. 9. **D** Beispielhafte Proteinbanden beider Tiergruppen in Hypoxie, sowohl für EPDR1, als auch für RalA.

4.2.8 Detektierbar erhöhte miR-100-Expression in den Aorten der transgenen Versuchstiere

Neben den in 5.2.5 untersuchten Lysaten aus der Lunge, wurden ebenfalls Proben aus Aorten der Versuchstiere hergestellt. In den isolierten Aorten befindet sich im Vergleich zum totalen Lungengewebe eine hohe Anzahl an glatten Muskelzellen, sodass die Überexpression der miR-100 durch das tamoxifeninduzierte Cre/loxP-System in diesen überprüft werden kann.

Bei der Analyse der miR-100-Expression in Aorten ist eine circa 1,5-fache Überexpression, in den transgenen Mäusen, bezogen auf die Wildtyp-Mäuse unter Normoxie ersichtlich (Abbildung 19 A). Bei den Versuchstieren, welche für sechs Wochen in der Hypoxie gehalten wurden, ist die Expression der miR-100 in den transgenen Mäusen knapp zweifach so hoch, wie in der Kontrollgruppe (Abbildung 19 B).

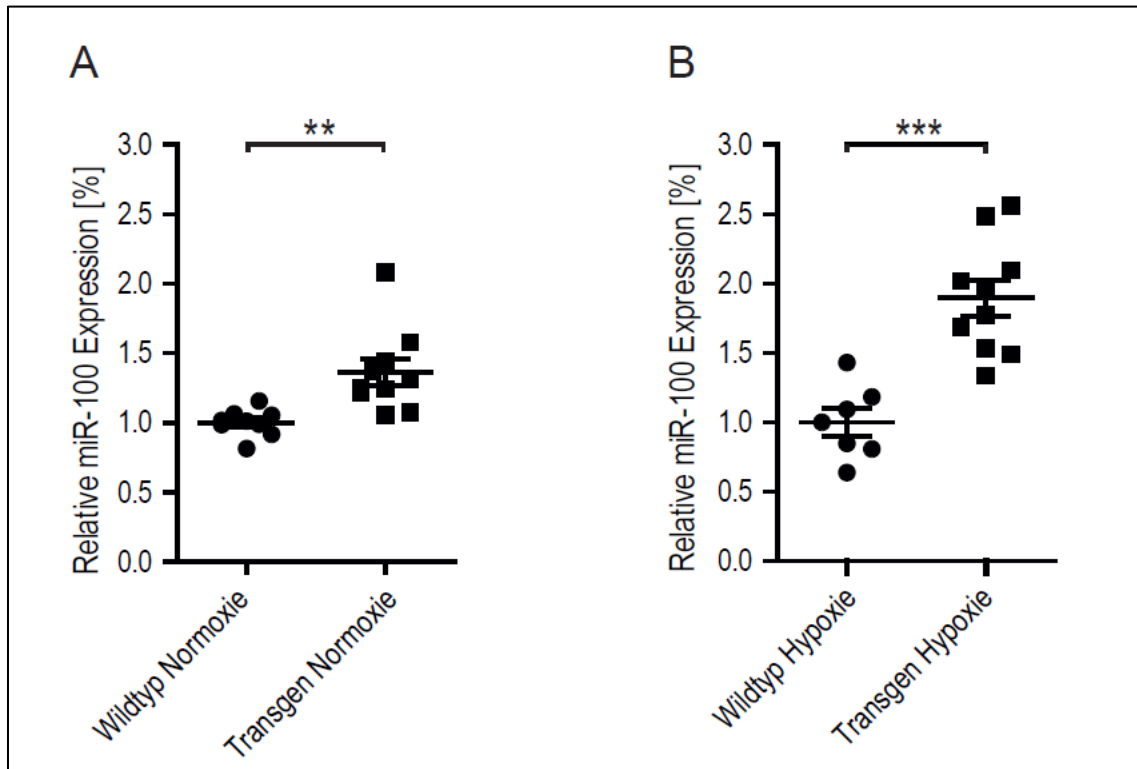


Abbildung 19: miR-100 Expression in den Aorten der Versuchstiere

Die Aorten wurden nach Abschluss der echokardiographischen Untersuchung der Mäuse entnommen und zur Gewinnung einer RNA-Probe eingefroren. Die danach hergestellte RNA-Probe wurde mittels einer quantitativen Echtzeit-PCR auf die Expression der miR-100 untersucht. **A** Die Aortenproben der Mäuse, die unter Normoxie gehalten wurden, zeigten bei den transgenen Mäusen ein erhöhtes Expressionslevel der miR-100, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. n = 9 vs. 10. p = 0,0029. **B** In den Proben der transgenen Mäusen, die für sechs Wochen unter hypoxischen Luftverhältnissen gehalten wurden, ist eine deutlich signifikant höhere Expression der miR-100 im Vergleich zu den gleich gehaltenen Wildtyp-Mäusen zu sehen. n = 7 vs. 10. p = 0,0001.

4.2.9 Erhöhte BMPR2-Expression in den Aorten der transgenen Versuchstiere unter hypoxischen Bedingungen

In den Proben der Aorten wurde anschließend die Genexpression des BMPR2 als potentiell Ziel der miR-100 untersucht.

In Abbildung 20 A wurden beide Versuchstiergruppen, welche unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, miteinander verglichen. Dabei handelt es sich um Wildtier-Mäuse und transgene Mäuse, die durch eine Tamoxifeninduktion eine miR-100-Überexpression in den glatten Muskelzellen erhalten haben (siehe 5.2.8). Die transgenen Mäuse zeigen keine veränderte Expression des BMPR2 auf mRNA-Ebene, im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei der Untersuchung der BMPR2-Expression in den Versuchsgruppen, welche für sechs Wochen in der Hypoxie gehalten wurden, ist eine deutlich stärkere Expression bei den miR-100

überexprimierenden Mäusen zu sehen (Abbildung 20 B). Diese höhere Expression auf mRNA-Ebene ist statistisch signifikant dargestellt.

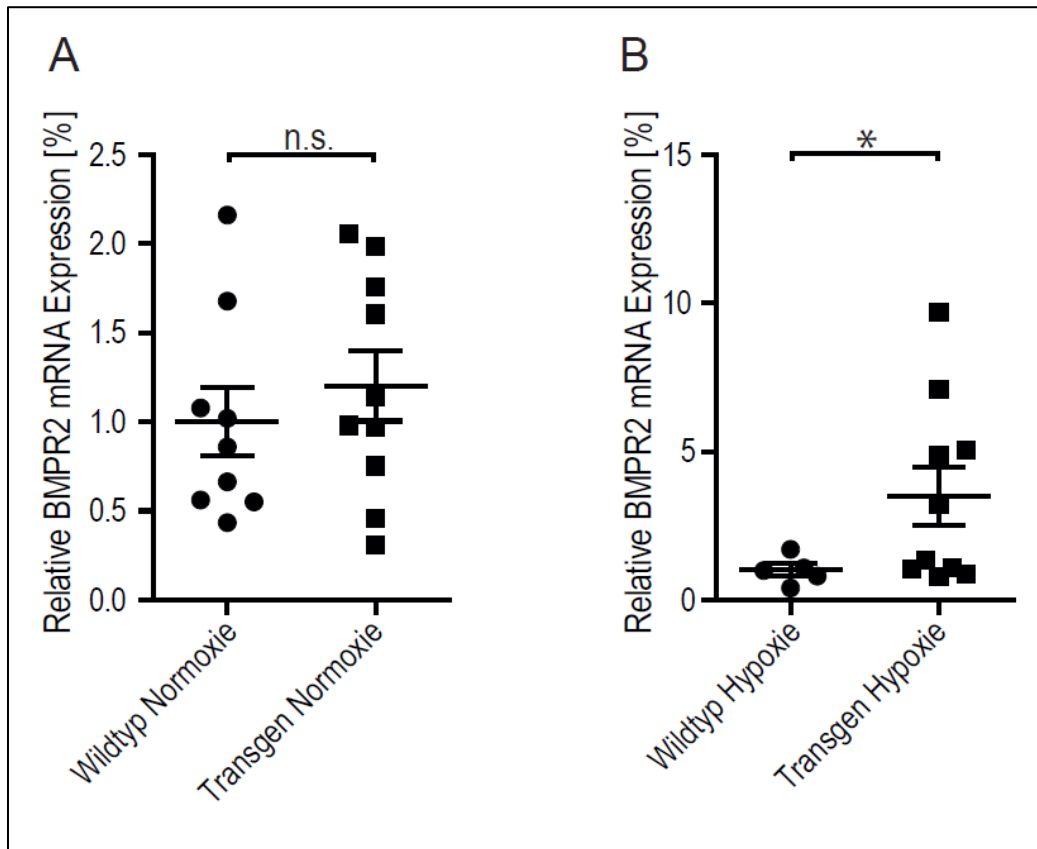


Abbildung 20: BMPR2-Expression in Aorten der Versuchstiere auf mRNA-Ebene

Die Analyse der BMPR2-Expressionen erfolgte mittels einer quantitativen Echtzeit-PCR. Verwendet wurden Lysate aus Aorten der Versuchstiere, die unter normoxischen und hypoxischen Luftverhältnissen gehalten wurden. **A** Zwischen den Wildtyp- und transgenen Mäusen in der Normoxie ist kein signifikanter Unterschied zu sehen. $n = 9$ vs. 10 . **B** Die in der Hypoxie gehaltenen Versuchstiere weisen zwischen beiden Gruppen einen signifikant erhöhten Unterschied der BMPR2 Expression in den Transgenen auf. $n = 5$ vs. 10 . $p = 0,0337$.

4.2.10 Erhöhte EPDR1-Expression in den Aorten der transgenen Versuchstiere unter Hypoxie

Neben der in 5.2.9 untersuchten BMPR2-Expression in Proben der Aorten, wurde ebenfalls die mRNA Expression von EPDR1 als weiteres mögliches Zielgen der miR-100 in diesen untersucht.

Beide Versuchsgruppen zeigten in der Normoxie eine ähnliche Expression des EPDR1 (Abbildung 21 A).. Zwischen den Tiergruppen, welche unter Hypoxie gehalten wurden (Abbildung 21 B), war nach sechs Wochen ein deutlicher Unterschied in der EPDR1-Expression ersichtlich. So zeigten die miR-100

überexprimierenden Tiere eine circa doppelt so hohe Expression auf mRNA-Ebene, im Vergleich zu Kontrolltieren, welche keine Modulation der miR-100 Expression in glatten Muskelzellen erfahren hatten.

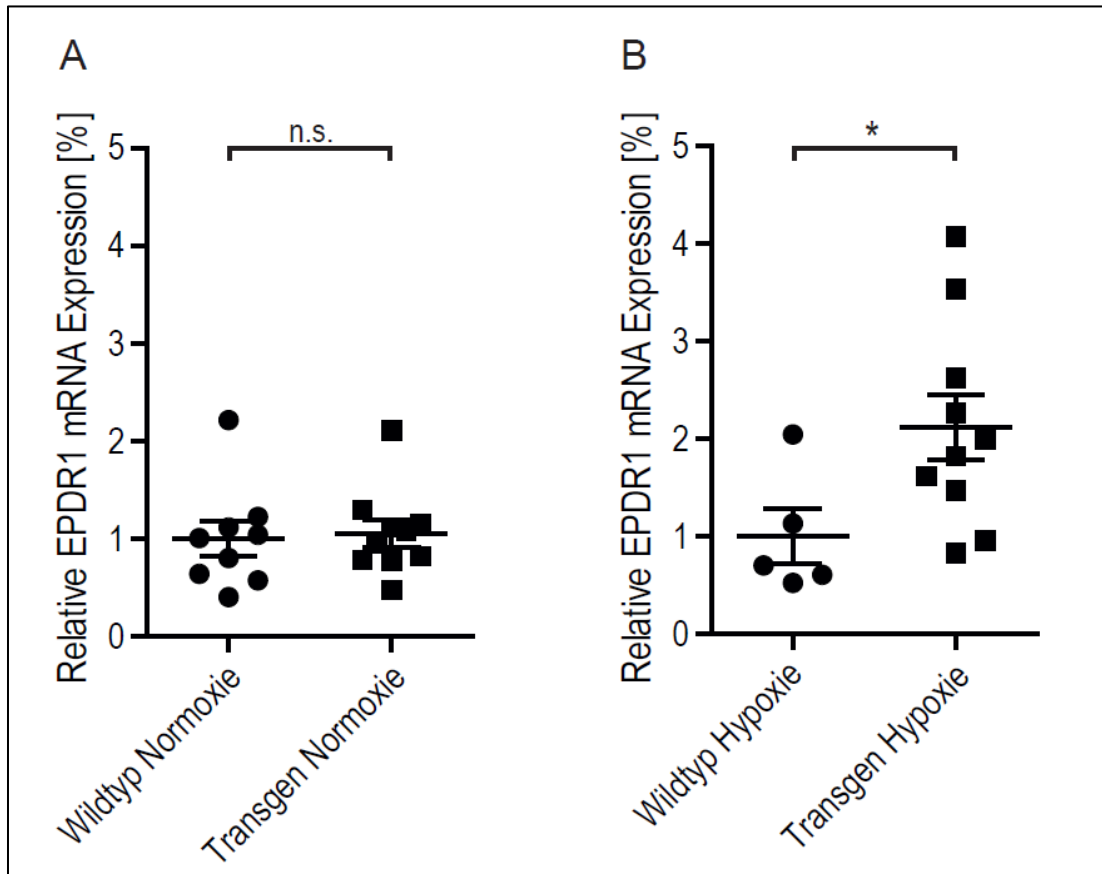


Abbildung 21: EPDR1-Expression in Aorten der Versuchstiere auf mRNA-Ebene

Die Expressionslevel wurden mittels einer quantitativen Echtzeit-PCR gemessen. Hierfür wurden cDNA-Proben der isolierten Aorten verwendet. **A** Zwischen Wildtyp- und transgenen Mäusen, die in Normoxie gehalten wurden, war kein Unterschied in der Stärke der Expression des EPDR1 ersichtlich. $n = 9$ vs. 10 . **B** Transgene Mäuse, die unter hypoxischen Luftverhältnissen gehalten wurden, zeigten eine deutlich höhere Expression des EPDR1, verglichen mit Wildtyp-Mäusen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. $n = 5$ vs. 10 . $p = 0,04$.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Diese Doktorarbeit besteht aus einem *in vitro* Teil und einem dazugehörigen *in vivo* Tierversuch, welcher zur Beurteilung der Rolle der miR-100 in der Entstehung der PAH unerlässlich ist. Der erste Teil der Arbeit, welcher sich ausschließlich auf humane Spenderzellen bezieht, wurde als Vorversuch für den darauf folgenden Tierversuch angesehen. Hier wurde versucht, zugrundeliegende Mechanismen in hPASCs, zu erforschen. Die erhobenen Informationen wurden in dem sich anschließenden Tierversuch und vor allem in die molekularbiologischen Analysen der gewonnenen Gewebe einbezogen. Die Planung des Tierversuches unterlag dabei dem 3R-Prinzip (*Replacement, Refinement, Reduction*) von Russell und Burch (Russell and Burch 1959). Dabei folgt dieses 3R-Prinzip dem Gedanken, dass durch eine genaue Planung, Tierversuche möglichst vermieden werden. Falls dies nicht möglich ist, sollte die Zahl der Tiere gering gehalten und das Leiden der Tiere auf ein unerlässliches Maß beschränkt werden. Teil dieses *Replacement* stellt unter anderem der Zellversuch *in vitro* dar. Das Leiden wurde durch regelmäßige und engmaschige Kontrolle der Tiere beobachtet und durch klar definierte Abbruchkriterien behördlich begrenzt. Keine der Versuchsmäuse musste aufgrund der Abbruchkriterien frühzeitig dem Versuch entnommen werden.

5.1.1 Tiermodell

Die Hypoxieexposition bei Versuchsmäusen wurde bereits häufig als adäquate Methode beschrieben, um Verhältnisse einer pulmonal-arteriellen Hypertonie zu simulieren bzw. auszulösen. In diesem Zusammenhang sind in verschiedenen Arbeiten extrem erhöhte rechtsventrikuläre Drücke, RV-Hypertrophie, erhöhte Muskularisierung der distalen pulmonalen Gefäße und Wanddicke der muskularisierten Arterien, erwähnt (Jeffery and Wanstall 2001, Savale, Tu et al. 2009, Ikeda, Hale et al. 2019). Um zu untersuchen, welchen Einfluss die miR-100 auf die Entstehung der PAH ausübt, war es wichtig diesen sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie zu untersuchen. Hierfür wurden jeweils eine transgene Mausgruppe (Myh11-Cre/BLU.miR100loxP), welche miR-100 speziell in glatten Muskelzellen überexprimiert, als auch eine Kontroll-Versuchsgruppe (BLU.miR100,

Wildtyp) unter Normoxie als auch unter Hypoxie gehalten. In der Normoxie wurde der Einfluss der miR-100 auf den Organismus und die Expression einzelner Gene und der entsprechenden Proteine beobachtet. Unter hypoxischen Verhältnissen (10 % O₂), kam nun zu der regulatorisch wirkenden Komponente der miR-100 zusätzlich noch der Einfluss der Hypoxie hinzu. Da die Beeinflussung der Hypoxie besonders in den glatten Muskelzellen Auswirkung findet, wurde eine Mauslinie gewählt, die dort die miR-100 überexprimiert (Dingemans and Wagenvoort 1978). So konnte die basale Regulation unter normoxischen Verhältnissen mit denen der Regulation unter hypoxischen Verhältnissen verglichen werden.

5.1.2 *In vitro*-Versuche

Bei den verwendeten pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (hPASMCs) handelt es sich um Zellen aus einem humanen Spender. Es sind primäre Zellen, die nicht in ihrem Zellwachstum unbegrenzt lebensfähig sind. Diese Spenderzellen wurden von der Firma PromoCell in Passage 1 bezogen und in niedriger Passage in mehreren Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Dadurch wurde sichergestellt, dass für alle Versuche, dieselben Zellen zur Verfügung standen. Mit steigender Passagezahl, stieg nach eigener Erkenntnis bei den hPASMCs auch die Verdopplungszeit und es entstanden phänotypische Unregelmäßigkeiten der Zellen. Diese Merkmale führten dazu, dass in dieser Doktorarbeit lediglich Zellen bis Passage acht für die Versuche verwendet wurden. Für die Kultivierung wurden für alle Experimente, gleichbleibende Bedingungen (Protokoll, Materialien, Geräte) benutzt. Aufgrund der Literaturrecherche und der eigenen Vorversuche, wurden der BMPR2 und das EPDR1 als besonders interessant für diese Arbeit eingestuft. Sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* wurde ein besonderes Augenmerk auf diese beiden möglicherweise PAH auslösenden Gene gelegt (Yang, Xuebin et al. 2012, Hemnes, Trammell et al. 2015).

5.1.3 Cre/loxP-System

Das Cre/loxP-System ermöglicht, wie bereits in 4.3.2 beschrieben, eine spezifische Überexpression in glatten Muskelzellen zu erreichen. Da glatte Muskelzellen einen großen Anteil in arteriellen Gefäßen einnehmen und bei der Entstehung der PAH eine entscheidende Rolle spielen, wurden diese als Zielzellen für die Überexpression ausgewählt (Brozovich, Nicholson et al. 2016). Der große Vorteil des induzierbaren

Systems mittels Tamoxifen ist, dass man den Startzeitpunkt der gewünschten Expressionssteigerung selbst wählen kann. Bis zur fünftägigen Tamoxifen-Injektion der Mäuse, sind diese in ihrem Expressionsmuster völlig normal und ähneln bis dahin in ihrem Phänotyp den verwendeten Wildtyp-Mäusen (Kim, Kim et al. 2018). Diese Möglichkeit, erst zu Beginn der Hypoxieexposition mit einer miR-100-Überexpression zu beginnen, ermöglicht es, einen genauen Zusammenhang zwischen miR-100 Überexpression und Hypoxieexposition zu bilden. Ein Nachteil der fünftägigen i.p.-Injektionen, könnte in der Stressbelastung der Tiere durch die Injektion selbst liegen, wobei alle Gruppen gleich behandelt wurden. Um also einen möglichen stressbedingten Nachteil der transgenen Tiere auszugleichen, wurde sowohl den Mäusen der Myh11-Cre/BLU.miR100loxP Linie, als auch den Mäusen der BLU.miR100 Linie (Wildtyp) das Tamoxifen appliziert. Da den Mäusen der BLU.miR100 Linie aber durch das fehlende Einkreuzen einer geeigneten Cre-Linie die entsprechende Cre-Rekombinase fehlt, kommt es hier trotz Tamoxifeninjektion nicht zu einer verstärkten miR-100 Expression.

5.1.4 Hypoxie-Kammer

Die Hypoxie-Kammer stellt wie bereits beschrieben, in der Tierversuchskunde eine Methode dar, mit welcher eine PAH induziert werden kann (Eddahibi, Hanoun et al. 2000, Cruz, Bauer et al. 2012). Es wird unter kontrollierten und für alle Tiere gleichen Bedingungen die Entwicklung einer PAH ausgelöst. Ein Nachteil der Hypoxie-Kammer kann bei schlechter Ventilation der Käfige, eine Stauung von entstehenden Gasen (NH₃, CO₂ etc.) darstellen. Die Käfige wurden deshalb regelmäßig kontrolliert und verschmutztes Einstreu gewechselt. Ebenfalls musste das Gewicht der Tiere, besonders in den ersten Tagen der Exposition, genau kontrolliert werden. Durch den Stress des verringerten Sauerstoffgehaltes auf 10 %, nehmen die Mäuse in den ersten zwei Tagen deutlich an Gewicht ab. Strikte Abbruchkriterien müssen hier definiert sein, um ein über das Unerlässliche hinausgehendes Leiden der Mäuse zu verhindern. Die Hypoxie-Kammer kann in dieser Doktorarbeit als sehr gut anwendbare Methode zum Entwickeln einer pulmonal-arteriellen Hypertonie angesehen werden, auch wenn die Kontrollen der Tiere einen großen Zeitaufwand mit sich brachten.

5.1.5 Gewebeentnahme

Die Entnahme der Gewebe für weitere Untersuchungen wurde bei den Mäusen nach Beendigung der echokardiographischen Untersuchung durchgeführt. Sie folgte einem standardisierten Protokoll und sollte durch das ständig gleiche Vorgehen eine Vergleichbarkeit der Proben erzeugen.

Bei der in 4.3.6 beschriebenen Entnahme der Lungenlappen lässt sich im Nachhinein ein Fehler erkennen, der jedoch erst bei Durchführung der Analysen der Gewebe aufgefallen ist. Für die analytischen Versuche wurde aus den Gesamtgewebe der Lungenlappen ein Lysat hergestellt, aus dem zum einen RNA und zum anderen Protein isoliert wurde. Da die Lungenlappen aber neben den glatten Muskelzellen aus vielen verschiedenen Zellen bestehen, die in der Anzahl den glatten vaskulären Muskelzellen überlegen sind, war in den entstandenen Proben lediglich ein geringer Anteil an glatten Muskelzellen im Gesamtlysat vorhanden. Die miR-100 wurde jedoch spezifisch durch das beschriebene Cre/loxP-System in den glatten Muskelzellen der transgenen Mäuse überexprimiert. Die Vielzahl von anderen Zelltypen und vorallem das Verhältnis der in den Lungen vorhandenen Zellen in Bezug auf die glatten Muskelzellen, erschwerten die Analyse deutlich. Somit war es nicht möglich, eine gesteigerte miR-100 Expression in den Gesamtlungenlysaten der transgenen Tiere und damit ein Funktionieren des gewählten Systems zu zeigen. Eine Bestätigung der spezifischen Überexpression von miR-100 in den glatten Muskelzellen konnte allerdings mittels Analyse isolierter Aorten erbracht werden (Abbildung 19). Die Aorta besteht wie eine Lungenarterie ebenfalls zu einem großen Anteil aus glatten Muskelzellen (Mizuno, Nishinaka et al. 2003), was den Nachweis der spezifischen miR-100 Überexpression ermöglichte. Im Nachhinein wäre eine Isolation von Lungenarterien eine zu präferierende Methode gewesen, um RNA- und Protein-Proben zu gewinnen. Das um die Gefäße liegende Lungengewebe hat die Unterschiede in den einzelnen Gruppen in den nicht mehr messbaren Hintergrund verdrängt. In Abbildung 14 ist kein Unterschied des miR-100-Levels zu sehen. Die Proben aus Abbildung 14 und Abbildung 19 resultieren aus den identischen Mäusen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Überexpression gleichermaßen in den glatten Gefäßmuskelzellen in den Lungen stattgefunden hat, jedoch lediglich nur nicht detektiert werden konnte.

5.1.6 qRT-PCR und „stem-loop“ basierende TaqMan-PCR

Das zweistufige System der qRT-PCR findet in der Genetikforschung eine häufige Anwendung und ist als Standardmethode zu betrachten. Es handelt sich um ein System, mit dem man einen hohen Probendurchsatz erreichen kann, das sehr sensitiv und spezifisch, sowie kostensparend und reproduzierbar ist (Bollmann, Casper et al. 2012). Die Expression des untersuchten Genes, wird bei dieser Methode jedoch lediglich als relativ angegeben. Hierfür wird die gemessene Expression auf ein immer gleich exprimiertes, ubiquitär vorkommendes Gen bezogen. Ein solches Gen wird deshalb auch als „*housekeeping-Gen*“ bezeichnet. In dieser Arbeit wurde für den Nachweis der miR-100 Level die Expression von *snoRNA202* verwendet, welches als Referenz in Lungenproben von Mäusen empfohlen wird (Bouhaddioui, Provost et al. 2014). Ein Abgleich der Expressionslevel von BMPR2 und EPDR1 erfolgte mittels beta-Actin. Das gewählte Referenzgen muss, bei unterschiedlichen Bedingungen, eine gleiche Expression gewährleisten. Wie jedoch die Hypoxie Einfluss auf die Expression nimmt, ist nicht abschließend geklärt. Es gibt Annahmen, dass eine Reihe von Referenzgenen von der Hypoxie beeinflusst wird (Moein, Javanmard et al. 2017).

5.1.7 Western Blot

Für den Nachweis bestimmter Proteine wurde die Western Blot-Analyse verwendet. Die 1981 von Burnette entwickelte Methode, findet besonders in der Forschung hohen Anklang (Burnette 1981). Sie ist in diesem Labor als Standardmethode etabliert und ermöglicht das Identifizieren, Quantifizieren und die Größenbestimmung spezifischer Proteine (Jensen 2012). Wie auch schon bei der Probenentnahme beschrieben, war es für die Analyse der Gewebe nicht förderlich, dass ein Gewebelysat aus den gesamten Lungenlappen hergestellt wurde. Es befand sich neben den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien noch eine Vielzahl an anderen Gewebekomponenten in den Lysaten. Somit war eine Bestimmung der Expression von potentiellen miR-100 Kandidaten auf Proteinebene leider nicht möglich bzw. konnte kein Unterschied detektiert werden. Eine ausschließliche Isolation und Lyse von Lungengefäßen, sollte in Zukunft angestrebt werden. Das als Ladekontrolle verwendete RalA zeigt im Gegensatz zu zuvor getesteten Ladekontrollen, wie GAPDH und alfa-Tubulin, keine Regulation durch Hypoxie. Es zeigt unter hypoxischen Verhältnissen keine strukturelle Veränderung. Ladekontrollen werden

häufig ausgewählt, da sie eine große Struktur aufweisen und durch äußere Einflüsse nur gering verändert und beeinflusst werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Mutationen des BMPR2 sind schon seit einiger Zeit als Auslöser für die genetische Variante der PAH bekannt (Morrell 2006, Evans, Girerd et al. 2016). Ebenfalls wurde von Yang *et al.* 2012 eine Regulation dieses BMPR2 in mesenchymalen Stammzellen durch die miR-100 beschrieben (Yang, Xuebin et al. 2012). Neben dem BMPR2 wurde das EPDR1, durch eigene Voruntersuchungen, als ein mögliches direktes Ziel der miR-100 definiert. Aufgrund der Veröffentlichung von Hemnes *et al.* in welcher das EPDR1 ebenfalls in Zusammenhang mit der PAH gebracht wurde, war das Ziel dieser Doktorarbeit, eine potentielle Verknüpfung der Komponenten miR-100, BMPR2, EPDR1 und pulmonal-arterieller Hypertonie zu erreichen (Hemnes, Trammell et al. 2015).

Für diese Zielsetzung wurden *in vitro* Versuche mit humanen Spenderzellen (hPASCs), welche eine gezielt veränderte miR-100-Expression aufweisen, verwendet. So wurden die zugrundeliegenden Mechanismen auf molekularbiologischer Ebene analysiert. Ein Tierversuch, bei dem die verwendeten Mäuse aufgrund einer sechswöchigen Hypoxieexposition eine PAH entwickelten, komplettierte diese Arbeit. Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um transgene Mäuse mit einer miR-100 Überexpression in den glatten Muskelzellen, sowie transgene Kontrolltiere ohne diese genetische Überexpression. Die Tiere wurden abschließend klinisch untersucht, sowie deren Gewebe molekularbiologisch analysiert. Die Beteiligung der miR-100 an der Entstehung der PAH wurde bis heute noch nicht untersucht, weshalb diese Doktorarbeit einen Anteil an der Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen beitragen sollte.

5.2.1 Einfluss der miR-100 auf die PAH

Sowohl die miR-100-Überexpression in Mäusen, als auch die in transfizierten Zellen (hPASCs) konnte mittels PCR nachgewiesen werden. *In vitro* konnte eine Überexpression der miR-100 um das 80-fache im Vergleich zu den Kontrollzellen, erreicht werden (siehe Abbildung 4). Diese starke Überexpression konnte in den Versuchstieren *in vivo* nicht erreicht werden. Hier wurde die miR-100 in Lysaten der Aorten, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, lediglich 1,5-bis 2,0-fach so hoch, exprimiert (siehe Abbildung 19). Ein Grund hierfür ist sicherlich, dass in den Zelllysaten neben

den glatten Muskelzellen, auch weitere Zellarten enthalten waren, welche von der Modulation nicht beeinflusst wurden. In Proben, die aus den totalen Lungenlappen der Mäuse gewonnen wurden, konnte eine miR-100-Überexpression nicht dargestellt werden, da hier vermutlich das umliegende Gewebe die relative Überexpression verschleierte (Abbildung 14).

Durch den Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die miR-100 durchaus eine beeinflussende Komponente bei der Entstehung der PAH darstellt. Die miR-100 überexprimierenden Mäuse wiesen nach sechswöchiger Hypoxieexposition einen ausgeprägteren Phänotyp, als Wildtyp-Mäuse auf. Diese Tatsache spricht dafür, dass die miR-100 über die Regulation bisher nicht definierter Zielgene und dessen Signalwege wirksam an der Entstehung einer PAH beteiligt sein könnte. Als Endstadium der pulmonal-arteriellen Hypertonie wird das Rechtsherzversagen angesehen, was bei den Versuchstieren unter Hypoxie zwar noch nicht in voller Gänze ausgeprägt war, jedoch schon deutliche Anzeichen für eine Schädigung der rechten Herzhälfte vorlagen (Hoepfer and Granton 2011). Die Tiere präsentierten sich mit einem erhöhten Gewicht der rechten Herzhälften, geringeren PAT/PET-Quotienten, erhöhten Innendurchmessern der rechten Herzkammern in Diastole und einer geringeren TAPSE im Vergleich zu Tieren unter normoxischen Bedingungen (siehe Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12).

Eine stärkere Erkrankung der Versuchstiere ist durch den bei transgenen Mäusen unter Hypoxie nochmals erniedrigten PAT/PET-Quotienten (siehe Abbildung 12), welcher auf eine erhöhte Drucksituation hinweist, anzunehmen (Thibault, Kurtz et al. 2010). Zusätzlich dazu deutet die verringerte TAPSE der Mäuse unter Hypoxie (Abbildung 11 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) auf eine verringerte Funktionsfähigkeit des rechten Ventrikels hin (Tousignant, Kim et al. 2012). Ebenso ist in der histologischen Auswertung der Pulmonalarterien eine deutliche Wandverdickung der kleinen Arterien in den Lungen zu sehen (siehe Abbildung 13). Für die Auswertung wurde die Elastica-van-Gieson-Färbung verwendet, die neben den glatten Muskelzellen, auch die elastischen Membranen anfärbt. Dadurch ist eine genaue Abgrenzung der *Tunica media*, welche die glatten Muskelzellen beinhaltet, möglich. Unter hypoxischen Bedingungen weisen beide Vergleichsgruppen eine deutliche Verdickung der *Tunica media* auf und bestätigen somit, dass die Hypoxie in der Versuchstierkunde eine auslösende Komponente für

die Entstehung einer PAH ist (Cogo, Napolitano et al. 2003). Die miR-100 modulierten Mäuse zeigen unter Normoxie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikant stärkere Verdickung der *Tunica media* auf. Dies lässt auf eine deutlich erhöhte Proliferation der miR-100 überexprimierenden glatten Muskelzellen schließen. Der Einfluss der miR-100 auf die Erkrankung konnte somit *in vitro* deutlich belegt werden.

5.2.2 BMPR2 und EPDR1 in der Entstehung der PAH

Die Mutationen des BMPR2 spielen in der Entstehung der hereditären Form der PAH eine große Rolle (Morrell 2006). Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen war es nun zu untersuchen, ob miR-100 über die Regulation des BMPR2 indirekt an der Entstehung der PAH beteiligt ist. Hierzu wurde die BMPR2-Expression *in vitro* in transfizierten hPASCs untersucht. So zeigte sich eine signifikante Herabregulation der BMPR2-Expression bei mit *precursor-* (pre miR ctrl./ pre miR-100) transfizierten Zellen und im Gegenzug eine Erhöhung der BMPR2 Expression bei mit *antisense-* Oligonukleotiden (anti miR ctrl./ anti miR-100) transfizierten Zellen (siehe Abbildung 6) und legt damit nahe, dass die miR-100 an der Entstehung der PAH beteiligt sein könnte. Diese Erkenntnis wurde in den *in vivo*-Versuch mit einbezogen und der Fokus bei der späteren Analyse auf das Expressionsmuster des BMPR2 gelegt, auch wenn dieser bei den regulierten Genen der Transkriptomanalyse nicht aufgeführt war (Tabelle 16 & Tabelle 17). Zusätzlich zu den bereits bekannten Zielgenen der miR-100 sollten auch die Erkenntnisse aus der bereits erwähnten Transkriptomanalyse in die spätere Aufarbeitung der *in-vivo* Versuche einfließen. Hier rückte besonders ein Gen in den Fokus der Analysen, der EPDR1, da dieser aus der Transkriptomanalyse als am stärksten durch miR-100 reguliert, hervorgeht (Tabelle 16). Des Weiteren wird EPDR1 in Studien mit an PAH erkrankten Patienten als Diagnostikum für das Ansprechen von Vasodilatoren eingesetzt, da sich die Expressionen des EPDR1 in den dortigen Versuchsgruppen deutlich unterscheiden (Hemnes, Trammell et al. 2015).

Analysen der Lysate aus Gesamtlungengewebe aus den Versuchstieren haben ergeben, dass zwar eine Tendenz bei der Regulation des BMPR2 zu sehen ist, jedoch keine signifikante Aussage darüber getroffen werden konnte ob dieser durch miR-100 reguliert ist. So ist unter normoxischen Verhältnissen eine geringe Herabregulation des BMPR2 auf mRNA-Ebene zu erahnen, bei der jedoch keine

statistische Signifikanz festzustellen war. Unter der Hypoxieexposition hingegen ist eine, wenn auch nicht signifikant höhere BMPR2-Expression bei den miR-100-überexprimierenden Mäusen ersichtlich (siehe Abbildung 15). Diese Ergebnisse sind allerdings recht überraschend und entsprechen genau dem Gegenteil des zu Erwartenden. Die durchgeführte Untersuchung der Proteinexpression mit Hilfe des Western Blots in diesen Proben ergab jedoch ein ähnliches Bild, wie auf mRNA-Ebene (siehe Abbildung 16). Bei diesen Beobachtungen ist jedoch zu beachten dass es sich hier, wie bereits erwähnt, um Analysen des gesamten Lungengewebes handelt und nicht um isolierte glatte Muskelzellen in welchen die miR-100 Überexpression erfolgte. So konnte auch in den Gesamtlungenlysaten der transgenen Mäuse keine Überexpression von miR-100 detektiert werden und es ist somit anzunehmen, dass das umliegende Gewebe die erzielten Resultate maskiert. In der Tat, betrachtet man die Ergebnisse die mit den isolierten Aorten gewonnen wurden, ist eine signifikante Überexpression der miR-100 in den transgenen Tieren unter normoxischen Bedingungen detektierbar (Abbildung 19 A). Diese gesteigerte Expression in den Transgenen ist unter hypoxischen Bedingungen sogar noch einmal deutlich erhöht (Abbildung 19 B) und impliziert eine Beteiligung der miR-100 im Entstehungsprozess der PAH. Betrachtet man nun die Ergebnisse der BMPR2 Analyse der isolierten Aorten, so ist allerdings auch hier keine eindeutige Schlussfolgerung möglich, da selbst unter normoxischen Bedingungen in den transgenen Mäusen eine eher tendenziell erhöhte Expression des BMPR2 zu beobachten ist (Abbildung 20 A), die unter Hypoxie sogar noch gesteigert wird (Abbildung 20 B). Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem BMPR2 nicht wie in der Darstellung von Yang et al. angeführt, um ein direktes Ziel der miR-100 handelt oder aber die Regulation auf einem eher schwachen Niveau stattfindet (Yang, Xuebin et al. 2012). Denkbar wäre aber auch, dass andere deutlich stärkere Effekte im umliegenden Gewebe, induziert durch die Hypoxie, die Auswirkungen der durch die miR-100 Überexpression ausgelösten Veränderungen maskiert. Eine mögliche Begründung für diesen Effekt stellt der zelluläre Stress, induziert durch die Hypoxie, dar. Dieser beeinflusst nicht nur die glatten Muskelzellen der Gefäße, sondern wirkt sich auch auf den gesamten Organismus aus. Ein Lösungsansatz für einen wiederholten Versuch wäre sicherlich, die Probenentnahme abgewandelt durchzuführen und anstatt eines Lungenlysates, lediglich Lungenarterien zu

isolieren, um Artefakte durch das umliegende Gewebe und dessen verschleiende Wirkung auszuschließen.

Bei der Untersuchung des EPDR1 in hPASCs wird eine Regulation der miR-100 ersichtlich (Abbildung 7). Bei Transfektion der Zellen mit miR-100 Vorläufer-Oligonukleotiden wurde die EPDR1-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich signifikant herabreguliert (Abbildung 7 A). Die Transfektion mit *antisense*-Oligonukleotiden führt, im Vergleich mit Kontrollzellen, zu einer höheren Expression (Abbildung 7 B). Die Regulation wurde somit, wie die des BMPR2, auf zellulärer Ebene bestätigt.

Eine Analyse dieser Regulation in den Gesamtlungenlysaten der Versuchstiere hingegen, ergab auch hier wieder ein unklares Bild (Abbildung 17). Bei Untersuchung der Lungenlysate, spiegelt das Bild der Regulation zwischen den normoxisch gehaltenen Tieren, das Bild im *in vitro*-Versuch wider. Die miR-100 Überexpression in den transgenen Mäusen reguliert die mRNA-Expressionslevel des EPDR1 signifikant herunter (Abbildung 17 A). Dahingegen ist unter Hypoxieexposition ein umgekehrtes Bild erkennbar, die transgenen Mäuse haben ein signifikant höheres EPDR1 Expressionslevel (Abbildung 17 B). Auch hier scheinen Effekte, ausgelöst durch die Hypoxie, deutliche stärkere Auswirkungen auf die Expression von EPDR1 auszuüben, als es die postulierte regulierende Wirkung der miR-100 vermag.

Bei Betrachtung der Protein-Expressionslevel dieser Proben zeigte sich, vermutlich ebenfalls durch die Gewinnung des Lysates aus der gesamten Lunge, keinerlei signifikante Veränderung (siehe Abbildung 18). Auch hier kann mit den verwendeten Methoden keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob miR-100 regulatorische Eigenschaften auf die EPDR1-Expression in der Entstehung der PAH besitzt oder ob das umliegende Gewebe stärkeren Einfluss ausübt. Bei Betrachtung des mRNA-Levels von EPDR1 in den Aortenlysaten, ist keinerlei Regulation in der Normoxie erkennbar (Abbildung 21), was sich jedoch wissenschaftlich schwer erklären lässt, da bereits in den Lungenlysaten eine Regulation ersichtlich war und nun in den Aorten eine noch deutlichere Regulation erwartet wurde. Dahingegen ist unter Hypoxie eine, wie schon in den Lungen ersichtliche, Heraufregulation des EPDR1-Levels zu erkennen. Auch hier lässt sich vermuten, dass der geringere Sauerstoffgehalt in der Luft zu weiteren regulatorischen Mechanismen in den

gesamten Gefäßen und Geweben der Lunge geführt hat und sich diese regulatorischen Eigenschaften deutlich stärker als die Effekte durch die miR-100 Überexpression in den transgenen Mäusen präsentieren. Die in Abbildung 13 gezeigten verdickten pulmonalen Gefäße der Versuchstiere, könnten darauf schließen lassen, dass der Körper eine Gegenregulation auf proliferative Prozesse in Gang setzt und somit teilweise erwartete Regulationen deutlich geringer ausfallen.

5.2.3 Beeinflussung des Tiermodels der PAH durch miR-100

Betrachtet man die Körperparameter (Abbildung 9), der im Tierversuch verwendeten Mäuse, so erkennt man, dass die miR-100 überexprimierenden Tiere ein höheres Körpergewicht aufwiesen. Dieser Unterschied ist in der Hypoxie signifikant. Jedoch wird in Abbildung 8 auch aufgeführt, dass die transgenen Mäuse bereits mit einem höheren Körpergewicht in den Versuch gestartet waren. Bei Betrachtung des Herzgewichtes der einzelnen Gruppen (Abbildung 9 B), wird deutlich, dass kein signifikanter Unterschied der Herzgewichte vorhanden war (157,09 – 169,55 mg). Normiert man das Herzgewicht der Tiere auf die Länge der Tibia, so sieht man zwar noch Tendenzen, jedoch keine signifikanten Unterschiede in den entstandenen Werten (Abbildung 9 C). Die Normierung des Herzgewichtes auf die Tibialänge, stellt sich als äußerst aussagekräftig dar, da eine kurzfristige Gewichts- oder -abnahme keine Verfälschung nach sich zieht (Yin, Spurgeon et al. 1982). Studien haben gezeigt, dass das Herzgewicht bei linksventrikulärer Proliferation deutlich zunimmt (Roos, Jordan et al. 2007). Das Herzgewicht hat sich im Verlauf dieses Versuches jedoch nicht gravierend verändert, was gegen eine starke linksseitige Hypertrophie spricht und zu dem Bild der Rechtsherzdilatation und -hypertrophie passt. Betrachtet man den Anteil des linken Ventrikels inklusive Septums am Körpergewicht (Abbildung 9 D), zeigte sich dieser bei miR-100 überexprimierenden Mäusen unter normoxischen Bedingungen verringert, verglichen mit den entsprechenden Kontrollmäusen. Durch sechswöchige Hypoxieexposition zeigten miR-100 überexprimierende Mäuse jedoch keine Veränderung. Hier lässt sich vermuten, dass die Wildtyp-Normoxie Gruppe bereits mit einem erhöhten Herzgewicht in den Versuch gestartet war bzw. ein erhöhtes linksventrikuläres Gewicht aufwiesen (Abbildung 9, B). Zusammen mit der unveränderten linksventrikulären Ejektionsfraktion und dem nicht signifikant veränderten linksventrikulären

enddiastolischen Durchmesser (LVIDd), deutet dies darauf hin, dass der linke Ventrikel durch die Hypoxie nicht beeinflusst wurde.

Bei der Betrachtung der Werte der rechten Herzhälfte, sieht man bei beiden Tiergruppen in der Hypoxie eine deutliche Gewichtszunahme (Abbildung 9, E). Eine Gewichtszunahme der rechten Herzhälfte aufgrund von Hypertrophie und Proliferation, ausgelöst durch Hypoxie wurde bei Versuchsmäusen bereits mehrfach beschrieben (Yu, Shimoda et al. 1999, Cruz, Bauer et al. 2012). Dahingehend lässt sich sagen, dass das Tiermodell der PAH, durch die Hypoxieexposition, erfolgreich funktioniert hat. So lässt sich abschließend zur Betrachtung der Gewichte der einzelnen Herzbestandteile formulieren, dass die Hypoxie, wie erwartet, einen deutlichen Einfluss auf die entstandenen Veränderungen der rechten Herzhälfte ausgeübt hat. Der signifikant schwerer gewordene rechte Ventrikel, lässt sich mit den pathologischen Vorgängen der pulmonal-arteriellen Hypertonie erklären. Der rechte Ventrikel muss durch die stärker werdenden Druckverhältniss im Lungenkreislauf und den erhöhten Widerstand deutlich mehr Kraft aufbringen, was zu einer strukturellen Umwandlung des rechten Ventrikels durch Hypertrophie und anschließender Dilatation führt (Naeije and Manes 2014).

Abschließend lässt sich sagen, dass eine Wirkung der miR-100 auf die Entstehung der pulmonalen Hypertonie durch diese Arbeit gezeigt werden konnte. Die Mäuse, welche erhöhte miR-100-Level in ihren glatten Muskelzellen aufwiesen, zeigten einen deutlich ausgeprägteren Phänotyp als Tiere ohne diese Modulation. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte der Einfluss der miR-100 auf die proliferativen Vorgänge der glatten Muskelzellen gezeigt werden. Dem gegenüber konnte der anfänglich vermutete Zusammenhang der miR-100 und des BMPR2, lediglich *in vitro*, nachgewiesen werden. Dort wird eine klare Regulation des BMPR2, welcher unter anderem für proliferative Vorgänge im Körper regulatorisch wirkt, deutlich. Der *in vivo*-Versuch konnte jedoch die Ergebnisse der Zellkultur-Versuche nicht bestätigen. Die auf Zellebene gezeigte Regulation des EPDR1, konnte im Tierversuch ebenfalls nicht nachvollzogen werden. Möglicherweise sind *in vivo* deutlich komplexere Regulationen vorzufinden, die eine direkte Beteiligung der miR-100 an der Beeinflussung der Expressionslevel erschwert. Daher bedarf es weiterer Forschung, um die pathophysiologische Komplexität der miR-100 und der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen besser zu verstehen.

6 Zusammenfassung

Die Rolle der microRNA-100 in der pulmonalen Hypertonie

In der zugrundeliegenden Arbeit wurde die Rolle der miR-100 auf die Entstehung der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) hin untersucht. In Zellkultur-Versuchen konnte eine Regulation des BMPR2 und des EPDR1 dargestellt werden. Im darauffolgenden Tierversuch, wurden als Folge einer sechswöchigen Hypoxieexposition (10% Sauerstoff), sowohl bei transgenen Mäusen, als auch bei Wildtyp-Mäusen veränderte Verhältnisse in den rechten Ventrikeln beobachtet. Beide Gruppen zeigen erhöhte RV/LV+S- und RVIDd/LVIDd-Quotienten, sowie einen geringeren PAT/PET-Quotienten und eine geringere TAPSE, im Vergleich zu den Kontrolltieren in der Normoxie. Diese Ergebnisse deuten auf eine Schädigung des rechten Ventrikels mit Druckzunahme im selbigen hin. Zusätzlich zeigen die Tiere mit miR-100-Überexpression in der Hypoxie einen stärker ausgeprägten Phänotyp, als die Kontrolltiere. Sonographisch konnte dies mit einem signifikant verringerten PAT/PET-Quotienten belegt werden. Der verringerte Quotient spiegelt einen erhöhten Druck im rechten Ventrikel dar. Auch histologisch lässt sich bei dieser Versuchsgruppe eine deutlich stärker verdickte *Tunica media* in den kleinen Arterien der Lunge nachweisen. *In vivo* lässt sich eine miR-100-Überexpression, welche durch ein tamoxifeninduziertes Cre/loxP-System spezifisch in glatten Muskelzellen ausgelöst wurde, nachweisen. Jedoch stellen sich die *in vitro* gefundenen Regulationen des BMPR2 und des EPDR1 in einigen Fällen im Tierversuch unterschiedlich dar. In diesem Zusammenhang konnte die Regulation unter normoxischen Bedingungen teilweise sogar statistisch signifikant bestätigt werden, in der Hypoxie hingegen verschob sich das Expressionslevel teils deutlich. Die Ursache für diese Verschiebung der Expression konnte nicht abschließend dargestellt werden. Die mit der miR-100 zusammenhängenden Regulationsmechanismen könnten einen Angriffspunkt für die Behandlung der PAH darstellen. Hierfür bedarf es jedoch noch weiterer Forschung, um die zugrundeliegenden Signalwege und die molekularen Pathomechanismen besser darzustellen und zu verstehen. Die Regulation von BMPR2 und EPDR1 durch miR-100 könnte in der Behandlung der PAH einen interessanten Anhaltspunkt darstellen.

7 Summary

The role of the microRNA-100 in the pulmonary hypertension

This study examined the role of the miR-100 in the development of pulmonary arterial hypertension (PAH). In *in vitro* cell culture experiments, a regulation of BMPR2 and EPDR1 by miR-100 could be verified. To test the *in vivo* influence of miR-100, we used our tamoxifen inducible Myh11-Cre/miR-100 transgenic mouse line to specifically overexpress miR-100 in smooth muscle cells. The *in vitro* analysis was followed by *in vivo* experiments, including six weeks hypoxia (10% oxygen) of wildtype as well as transgenic miR-100 overexpressing mice to induce the development of PAH. Both, wildtype and transgenic animals showed an increased RV/LV+S and RVIDd/LVIDd ratio, a decreased PAT/PET ratio and a smaller TAPSE when kept under hypoxia. These results indicate damage to the right ventricle and verified the functionality of our PAH mouse model. Furthermore, we could observe an even more decreased PAT/PET ratio in miR-100 transgenic animals compared to control mice, which indicates an increased pressure in the right ventricle and a more severe PAH progression. This observation was supported by histological analysis, where a much more thickened *tunica media* of the small arteries in the lung of hypoxia exposed transgenic mice could be found. However, the regulation of the BMPR2 and EPDR1 expression by miR-100 that was observed *in vitro* could not be confirmed *in vivo*. Here, neither in the whole lung lysate nor in isolated aortic tissue, no decreased expression of BMPR2 and EPDR1 was detectable in miR-100 overexpressing animals. Furthermore, miR-100 mice react with an increased expression of BMPR2 and EPDR1 when kept under hypoxia. This implicates that either both, BMPR2 and EPDR1 are not direct targets of miR-100 or there are other effects triggered by hypoxia that overcome the presumably minor impact of miR-100. Further research needs to be conducted for better understanding of the underlying mechanisms in the development of PAH, that are possibly regulated by miR-100.

Literaturverzeichnis

- Aessopos, A., and D. Farmakis. 2005. 'Pulmonary hypertension in beta-thalassemia', *Ann N Y Acad Sci*, 1054: 342-9.
- Almodovar, S., P. Y. Hsue, J. Morelli, L. Huang, S. C. Flores, and H. I. V. Study Lung. 2011. 'Pathogenesis of HIV-associated pulmonary hypertension: potential role of HIV-1 Nef', *Proc Am Thorac Soc*, 8: 308-12.
- Ambros, Victor, and Gary Ruvkun. 2018. 'Recent Molecular Genetic Explorations of *Caenorhabditis elegans* MicroRNAs', *Genetics*, 209: 651-73.
- Apostolopoulos, Jim, Rosemary L. Sparrow, Janet L. McLeod, Fiona M. Collier, Phil K. Darcy, Howard R. Slater, Con Ngu, Claudia C. Gregorio-King, and Mark A. Kirkland. 2001. 'Identification and Characterization of a Novel Family of Mammalian Ependymin-Related Proteins (MERPs) in Hematopoietic, Nonhematopoietic, and Malignant Tissues', *DNA and Cell Biology*, 20: 625-35.
- Avouac, J., P. Airo, C. Meune, L. Beretta, P. Dieude, P. Caramaschi, K. Tiev, S. Cappelli, E. Diot, A. Vacca, J. L. Cracowski, J. Sibilia, A. Kahan, M. Matucci-Cerinic, and Y. Allanore. 2010. 'Prevalence of pulmonary hypertension in systemic sclerosis in European Caucasians and metaanalysis of 5 studies', *J Rheumatol*, 37: 2290-8.
- Bach, Jonathan F., Elizabeth A. Rozanski, John MacGregor, Jean M. Betkowski, and John E. Rush. 2006. 'Retrospective Evaluation of Sildenafil Citrate as a Therapy for Pulmonary Hypertension in Dogs', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20: 1132-35.
- Badesch, D. B., G. E. Raskob, C. G. Elliott, A. M. Krichman, H. W. Farber, A. E. Frost, R. J. Barst, R. L. Benza, T. G. Liou, M. Turner, S. Giles, K. Feldkircher, D. P. Miller, and M. D. McGoon. 2010. 'Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry', *Chest*, 137: 376-87.
- Bagga, S., J. Bracht, S. Hunter, K. Massirer, J. Holtz, R. Eachus, and A. E. Pasquinelli. 2005. 'Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation', *Cell*, 122: 553-63.
- Bagnato, G., and S. Harari. 2015. 'Cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases', *Eur Respir Rev*, 24: 102-14.
- Baldauf, Katrin. 2019 'Pulmonale Hypertension beim Hund: Ursachen, Therapie und Prognose', *kleintier konkret*.
- Barst, R. J., L. J. Rubin, W. A. Long, M. D. McGoon, S. Rich, D. B. Badesch, B. M. Groves, V. F. Tapson, R. C. Bourge, B. H. Brundage, S. K. Koerner, D. Langleben, C. A. Keller, S. Murali, B. F. Uretsky, L. M. Clayton, M. M. Jobsis, S. D. Blackburn, D. Shortino, and J. W. Crow. 1996. 'A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension', *N Engl J Med*, 334: 296-301.
- Bartel, D. P. 2004. 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function', *Cell*, 116: 281-97.
- Bhaskaran, M., and M. Mohan. 2014. 'MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease', *Veterinary Pathology*, 51: 759-74.
- Boerrigter, B. G., H. J. Bogaard, P. Trip, H. Groepenhoff, H. Rietema, S. Holverda, A. Boonstra, P. E. Postmus, N. Westerhof, and A. Vonk-Noordegraaf. 2012. 'Ventilatory and cardiocirculatory exercise profiles in COPD: the role of pulmonary hypertension', *Chest*, 142: 1166-74.

- Bollmann, Franziska, Ingrid Casper, Jenny Henke, and Andrea Pautz. 2012. 'qRT-PCR: a method and its difficulties', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385: 949-51.
- Bonderman, D., P. Wexberg, A. M. Martischnig, H. Heinzl, M. B. Lang, R. Sadushi, N. Skoro-Sajer, and I. M. Lang. 2011. 'A noninvasive algorithm to exclude pre-capillary pulmonary hypertension', *Eur Respir J*, 37: 1096-103.
- Borgarelli, M., J. Abbott, L. Braz-Ruivo, D. Chiavegato, S. Crosara, K. Lamb, I. Ljungvall, M. Poggi, R. A. Santilli, and J. Haggstrom. 2015. 'Prevalence and prognostic importance of pulmonary hypertension in dogs with myxomatous mitral valve disease', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29: 569-74.
- Borgarelli, Michele, Eric Zini, Gino D'Agnolo, Alberto Tarducci, Roberto A. Santilli, David Chiavegato, Massimo Tursi, Marco Prunotto, and Jens Häggström. 2004. 'Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds', *Journal of Veterinary Cardiology*, 6: 27-34.
- Bouhaddioui, Wafae, Pierre R. Provost, and Yves Tremblay. 2014. 'Identification of most stable endogenous control genes for microRNA quantification in the developing mouse lung', *PLoS One*, 9: e111855-e55.
- Brown, A.J., E. Davison, and M.M. Sleeper. 2010. 'Clinical Efficacy of Sildenafil in Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension in Dogs', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 850-54.
- Brozovich, F. V., C. J. Nicholson, C. V. Degen, Yuan Z. Gao, M. Aggarwal, and K. G. Morgan. 2016. 'Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders', *Pharmacological reviews*, 68: 476-532.
- Burnette, W. N. 1981. "'Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A', *Anal Biochem*, 112: 195-203.
- Calin, G. A., and C. M. Croce. 2006. 'MicroRNA signatures in human cancers', *Nat Rev Cancer*, 6: 857-66.
- Chemla, D., E. M. Lau, Y. Papelier, P. Attal, and P. Herve. 2015. 'Pulmonary vascular resistance and compliance relationship in pulmonary hypertension', *Eur Respir J*, 46: 1178-89.
- Chen, S. J., Y. F. Chen, Q. C. Meng, J. Durand, V. S. Dicarlo, and S. Oparil. 1995. 'Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats', *J Appl Physiol (1985)*, 79: 2122-31.
- Chendrimada, Thimmaiah P., Richard I. Gregory, Easwari Kumaraswamy, Jessica Norman, Neil Cooch, Kazuko Nishikura, and Ramin Shiekhattar. 2005. 'TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing', *Nature*, 436: 740-44.
- Chester, Adrian H., and Magdi H. Yacoub. 2014. 'The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension', *Global cardiology science & practice*, 2014: 62-78.
- Chin, Kelly M., Nick H.S. Kim, and Lewis J. Rubin. 2005. 'The right ventricle in pulmonary hypertension', *Coronary Artery Disease*, 16: 13-18.
- Cogo, A., G. Napolitano, M. C. Michoud, D. R. Barbon, M. Ward, and J. G. Martin. 2003. 'Effects of hypoxia on rat airway smooth muscle cell proliferation', *J Appl Physiol (1985)*, 94: 1403-9.
- Condliffe, R., and L. S. Howard. 2015. 'Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension', *F1000Prime Rep*, 7: 06.

- Condon, D. F., N. P. Nickel, R. Anderson, S. Mirza, and V. A. de Jesus Perez. 2019. 'The 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension: what's old is new', *F1000Res*, 8.
- Correale, Michele, Armando Ferraretti, Ilenia Monaco, Davide Grazioli, Matteo Di Biase, and Natale Daniele Brunetti. 2018. 'Endothelin-receptor antagonists in the management of pulmonary arterial hypertension: where do we stand?', *Vascular health and risk management*, 14: 253-64.
- Cruz, J. Agustin, Eileen M. Bauer, Andres I. Rodriguez, Archana Gangopadhyay, Nabil S. Zeineh, Yinna Wang, Sruti Shiva, Hunter C. Champion, and Philip M. Bauer. 2012. 'Chronic hypoxia induces right heart failure in caveolin-1^{-/-} mice', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 302: H2518-H27.
- Currie, P. J., J. B. Seward, K. L. Chan, D. A. Fyfe, D. J. Hagler, D. D. Mair, G. S. Reeder, R. A. Nishimura, and A. J. Tajik. 1985. 'Continuous wave Doppler determination of right ventricular pressure: a simultaneous Doppler-catheterization study in 127 patients', *J Am Coll Cardiol*, 6: 750-6.
- Davenport, Anthony P., Kelly A. Hyndman, Neeraj Dhaun, Christopher Southan, Donald E. Kohan, Jennifer S. Pollock, David M. Pollock, David J. Webb, and Janet J. Maguire. 2016. 'Endothelin', *Pharmacological reviews*, 68: 357-418.
- Desole S, Kähler CM. 2008. 'Alveoläre Hypoventilation und pulmonale Hypertonie', *Journal of Cardiology*.
- Dias, Carlos A., Renato S. Assad, Luiz F. Caneo, Maria Cristina D. Abduch, Vera D. Aiello, Altamiro R. Dias, Miguel Barbero Marcial, and Sérgio A. Oliveira. 2002. 'Reversible pulmonary trunk banding. II. An experimental model for rapid pulmonary ventricular hypertrophy', *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 124: 999-1006.
- Ding, Lei, and Min Han. 2007. 'GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing', *Trends in Cell Biology*, 17: 411-16.
- Dingemans, K. P., and C. A. Wagenvoort. 1978. 'Pulmonary arteries and veins in experimental hypoxia. An ultrastructural study', *The American journal of pathology*, 93: 353-68.
- Eddahibi, S., V. Fabre, C. Boni, M. P. Martres, B. Raffestin, M. Hamon, and S. Adnot. 1999. 'Induction of Serotonin Transporter by Hypoxia in Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cells', *Circulation Research*.
- Eddahibi, S., Adnot, S. 2001. 'Anorexigen-induced pulmonary hypertension and the serotonin (5-HT) hypothesis: lessons for the future in pathogenesis', *Respir Res* 3, 9.
- Eddahibi, S., N. Hanoun, L. Lanfumey, K. P. Lesch, B. Raffestin, M. Hamon, and S. Adnot. 2000. 'Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene', *The Journal of Clinical Investigation*, 105: 1555-62.
- Evans, Jonathan D. W., Barbara Girerd, David Montani, Xiao-Jian Wang, Nazzareno Galiè, Eric D. Austin, Greg Elliott, Koichiro Asano, Ekkehard Grünig, Yi Yan, Zhi-Cheng Jing, Alessandra Manes, Massimiliano Palazzini, Lisa A. Wheeler, Ikue Nakayama, Toru Satoh, Christina Eichstaedt, Katrin Hinderhofer, Matthias Wolf, Erika B. Rosenzweig, Wendy K. Chung, Florent Soubrier, Gérald Simonneau, Olivier Sitbon, Stefan Gräf, Stephen Kaptoge, Emanuele Di Angelantonio, Marc Humbert, and Nicholas W. Morrell. 2016. 'BMP2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis', *The Lancet Respiratory Medicine*, 4: 129-37.

- Farber, H. W., D. P. Miller, A. D. Poms, D. B. Badesch, A. E. Frost, E. Muros-Le Rouzic, A. J. Romero, W. W. Benton, C. G. Elliott, M. D. McGoon, and R. L. Benza. 2015. 'Five-Year outcomes of patients enrolled in the REVEAL Registry', *Chest*, 148: 1043-54.
- Farber, Harrison W., and Joseph Loscalzo. 2004. 'Pulmonary Arterial Hypertension', *New England Journal of Medicine*, 351: 1655-65.
- Fedullo, P., K. M. Kerr, N. H. Kim, and W. R. Auger. 2011. 'Chronic thromboembolic pulmonary hypertension', *Am J Respir Crit Care Med*, 183: 1605-13.
- Firth, A. L., J. Mandel, and J. X. J. Yuan. 2010. 'Idiopathic pulmonary arterial hypertension', *Disease Models & Mechanisms*, 3: 268-73.
- Fuster, V, P M Steele, W D Edwards, B J Gersh, M D McGoon, and R L Frye. 1984. 'Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis', *Circulation*, 70: 580-87.
- Galie, N., D. Badesch, R. Oudiz, G. Simonneau, M. D. McGoon, A. M. Keogh, A. E. Frost, D. Zwicke, R. Naeije, S. Shapiro, H. Olschewski, and L. J. Rubin. 2005. 'Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension', *J Am Coll Cardiol*, 46: 529-35.
- Galie, N., B. H. Brundage, H. A. Ghofrani, R. J. Oudiz, G. Simonneau, Z. Safdar, S. Shapiro, R. J. White, M. Chan, A. Beardsworth, L. Frumkin, and R. J. Barst. 2009. 'Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension', *Circulation*, 119: 2894-903.
- Galie, N., H. A. Ghofrani, A. Torbicki, R. J. Barst, L. J. Rubin, D. Badesch, T. Fleming, T. Parpia, G. Burgess, A. Branzi, F. Grimminger, M. Kurzyna, and G. Simonneau. 2005. 'Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension', *N Engl J Med*, 353: 2148-57.
- Galie, N., M. M. Hoeper, M. Humbert, A. Torbicki, J. L. Vachiery, J. A. Barbera, M. Beghetti, P. Corris, S. Gaine, J. S. Gibbs, M. A. Gomez-Sanchez, G. Jondeau, W. Klepetko, C. Opitz, A. Peacock, L. Rubin, M. Zellweger, and G. Simonneau. 2009. 'Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension', *Eur Respir J*, 34: 1219-63.
- Galie, N., M. Humbert, J. L. Vachiery, S. Gibbs, I. Lang, A. Torbicki, G. Simonneau, A. Peacock, A. Vonk Noordegraaf, M. Beghetti, A. Ghofrani, M. A. Gomez Sanchez, G. Hansmann, W. Klepetko, P. Lancellotti, M. Matucci, T. McDonagh, L. A. Pierard, P. T. Trindade, M. Zompatori, M. Hoeper, and E. S. C. Scientific Document Group. 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: 67-119.
- Galie, N., A. Manes, and A. Branzi. 2003. 'Prostanoids for pulmonary arterial hypertension', *Am J Respir Med*, 2: 123-37.
- Galie, N., G. Ussia, P. Passarelli, R. Parlangeli, A. Branzi, and B. Magnani. 1995. 'Role of pharmacologic tests in the treatment of primary pulmonary hypertension', *Am J Cardiol*, 75: 55a-62a.
- Galiè, Nazzareno, Paul A. Corris, Adaani Frost, Reda E. Girgis, John Granton, Zhi Cheng Jing, Walter Klepetko, Michael D. McGoon, Vallerie V. McLaughlin, Ioana R. Preston, Lewis J. Rubin, Julio Sandoval, Werner Seeger, and Anne

- Keogh. 2013. 'Updated Treatment Algorithm of Pulmonary Arterial Hypertension', *Journal of the American College of Cardiology*, 62: D60-D72.
- Galiè, Nazzareno, Marc Humbert, Jean-Luc Vachiery, Simon Gibbs, Irene Lang, Adam Torbicki, Gérald Simonneau, Andrew Peacock, Anton Vonk Noordegraaf, Maurice Beghetti, Ardeschir Ghofrani, Miguel Angel Gomez Sanchez, Georg Hansmann, Walter Klepetko, Patrizio Lancellotti, Marco Matucci, Theresa McDonagh, Luc A. Pierard, Pedro T. Trindade, Maurizio Zompatori, and Marius Hoeper. 2015. '2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension', *European Respiratory Journal*, 46: 903.
- Galiè, Nazzareno, Massimiliano Palazzini, and Alessandra Manes. 2010. 'Pulmonary arterial hypertension: from the kingdom of the near-dead to multiple clinical trial meta-analyses', *European Heart Journal*, 31: 2080-86.
- Garcia-Rivas, G., C. Jerjes-Sanchez, D. Rodriguez, J. Garcia-Pelaez, and V. Trevino. 2017. 'A systematic review of genetic mutations in pulmonary arterial hypertension', *BMC Med Genet*, 18: 82.
- Graf, S., M. Haimel, M. Bleda, C. Hadinnapola, L. Southgate, W. Li, J. Hodgson, B. Liu, R. M. Salmon, M. Southwood, R. D. Machado, J. M. Martin, C. M. Treacy, K. Yates, L. C. Daugherty, O. Shamardina, D. Whitehorn, S. Holden, M. Aldred, H. J. Bogaard, C. Church, G. Coghlan, R. Condliffe, P. A. Corris, C. Danesino, M. Eyries, H. Gall, S. Ghio, H. A. Ghofrani, J. S. R. Gibbs, B. Girerd, A. C. Houweling, L. Howard, M. Humbert, D. G. Kiely, G. Kovacs, R. V. MacKenzie Ross, S. Moledina, D. Montani, M. Newnham, A. Olschewski, H. Olschewski, A. J. Peacock, J. Pepke-Zaba, I. Prokopenko, C. J. Rhodes, L. Scelsi, W. Seeger, F. Soubrier, D. F. Stein, J. Suntharalingam, E. M. Swietlik, M. R. Toshner, D. A. van Heel, A. Vonk Noordegraaf, Q. Waisfisz, J. Wharton, S. J. Wort, W. H. Ouwehand, N. Soranzo, A. Lawrie, P. D. Upton, M. R. Wilkins, R. C. Trembath, and N. W. Morrell. 2018. 'Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension', *Nat Commun*, 9: 1416.
- Gregorio-King, Claudia C., Janet L. McLeod, Fiona McL Collier, Gregory R. Collier, Karyn A. Bolton, Gavin J. Van Der Meer, Jim Apostolopoulos, and Mark A. Kirkland. 2002. 'MERP1: a mammalian ependymin-related protein gene differentially expressed in hematopoietic cells', *Gene*, 286: 249-57.
- Guazzi, M., and B. A. Borlaug. 2012. 'Pulmonary hypertension due to left heart disease', *Circulation*, 126: 975-90.
- Guazzi, Marco, and Ross Arena. 2010. 'Pulmonary hypertension with left-sided heart disease', *Nature Reviews Cardiology*, 7: 648-59.
- Ha, M., and V. N. Kim. 2014. 'Regulation of microRNA biogenesis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 509-24.
- Halpern, S. D., and D. B. Taichman. 2009. 'Misclassification of pulmonary hypertension due to reliance on pulmonary capillary wedge pressure rather than left ventricular end-diastolic pressure', *Chest*, 136: 37-43.
- Handa T, Nagai S, Miki S, et al. 2006. 'Incidence of Pulmonary Hypertension and Its Clinical Relevance in Patients With Sarcoidosis', *Chest*.
- Heldin, Carl-Henrik, Kohei Miyazono, and Peter ten Dijke. 1997. 'TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins', *Nature*, 390: 465-71.
- Hellenkamp, Kristian, Bernhard Unsöld, Sitali Mushemi-Blake, Ajay M. Shah, Tim Friede, Gerd Hasenfuß, and Tim Seidler. 2018. 'Echocardiographic Estimation of Mean Pulmonary Artery Pressure: A Comparison of Different Approaches to

- Assign the Likelihood of Pulmonary Hypertension', *Journal of the American Society of Echocardiography*, 31: 89-98.
- Hemnes, A. R., A. W. Trammell, S. L. Archer, S. Rich, C. Yu, H. Nian, N. Penner, M. Funke, L. Wheeler, I. M. Robbins, E. D. Austin, J. H. Newman, and J. West. 2015. 'Peripheral blood signature of vasodilator-responsive pulmonary arterial hypertension', *Circulation*, 131: 401-9; discussion 09.
- Herve, P., M. Humbert, O. Sitbon, F. Parent, H. Nunes, C. Legal, G. Garcia, and G. Simonneau. 2001. 'Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis', *Clin Chest Med*, 22: 451-8.
- Hoeper, M. M., H. A. Ghofrani, E. Grunig, H. Klose, H. Olschewski, and S. Rosenkranz. 2017. 'Pulmonary Hypertension', *Dtsch Arztebl Int*, 114: 73-84.
- Hoeper, M. M., and J. Granton. 2011. 'Intensive care unit management of patients with severe pulmonary hypertension and right heart failure', *Am J Respir Crit Care Med*, 184: 1114-24.
- Hoeper, M. M., D. Huscher, H. A. Ghofrani, M. Delcroix, O. Distler, C. Schweiger, E. Grunig, G. Staehler, S. Rosenkranz, M. Halank, M. Held, C. Grohe, T. J. Lange, J. Behr, H. Klose, H. Wilkens, A. Filusch, M. Germann, R. Ewert, H. J. Seyfarth, K. M. Olsson, C. F. Opitz, S. P. Gaine, C. D. Vizza, A. Vonk-Noordegraaf, H. Kaemmerer, J. S. Gibbs, and D. Pittrow. 2013. 'Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: results from the COMPERA registry', *Int J Cardiol*, 168: 871-80.
- Hoeper, M. M., D. Huscher, and D. Pittrow. 2016. 'Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany', *Int J Cardiol*, 203: 612-3.
- Hoeper, M. M., M. W. Pletz, H. Golpon, and T. Welte. 2007. 'Prognostic value of blood gas analyses in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension', *European Respiratory Journal*, 29: 944.
- Hoeper, M. M., M. Sosada, and H. Fabel. 1998. 'Plasma coagulation profiles in patients with severe primary pulmonary hypertension', *Eur Respir J*, 12: 1446-9.
- Hossmann, V., H. Auel, W. Rucker, and K. Schror. 1984. 'Prolonged infusion of prostacyclin in patients with advanced stages of peripheral vascular disease: a placebo-controlled cross-over study', *Klin Wochenschr*, 62: 1108-14.
- Huber, K., R. Beckmann, H. Frank, M. Kneussl, J. Mlczoch, and B. R. Binder. 1994. 'Fibrinogen, t-PA, and PAI-1 plasma levels in patients with pulmonary hypertension', *Am J Respir Crit Care Med*, 150: 929-33.
- Humbert, M., O. Sitbon, A. Chaouat, M. Bertocchi, G. Habib, V. Gressin, A. Yaici, E. Weitzenblum, J. F. Cordier, F. Chabot, C. Dromer, C. Pison, M. Reynaud-Gaubert, A. Haloun, M. Laurent, E. Hachulla, V. Cottin, B. Degano, X. Jais, D. Montani, R. Souza, and G. Simonneau. 2010. 'Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era', *Circulation*, 122: 156-63.
- Humbert, M., O. Sitbon, A. Chaouat, M. Bertocchi, G. Habib, V. Gressin, A. Yaici, E. Weitzenblum, J. F. Cordier, F. Chabot, C. Dromer, C. Pison, M. Reynaud-Gaubert, A. Haloun, M. Laurent, E. Hachulla, and G. Simonneau. 2006. 'Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry', *Am J Respir Crit Care Med*, 173: 1023-30.
- Huntzinger, E., and E. Izaurralde. 2011. 'Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay', *Nat Rev Genet*, 12: 99-110.
- Ikeda, Kahori T., Philip T. Hale, Michael W. Pauciulo, Nupur Dasgupta, Patricia A. Pastura, Timothy D. Le Cras, Manoj K. Pandey, and William C. Nichols. 2019.

- 'Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension in Different Mouse Strains: Relation to Transcriptome', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 60: 106-16.
- Jais, X., V. loos, C. Jardim, O. Sitbon, F. Parent, A. Hamid, E. Fadel, P. Dartevelle, G. Simonneau, and M. Humbert. 2005. 'Splenectomy and chronic thromboembolic pulmonary hypertension', *Thorax*, 60: 1031-4.
- Jarrett, H., and C. Barnett. 2017. 'HIV-associated pulmonary hypertension', *Curr Opin HIV AIDS*, 12: 566-71.
- Jeffery, Trina K., and Janet C. Wanstall. 2001. 'Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension', *Pharmacology & Therapeutics*, 92: 1-20.
- Jensen, Ellen C. 2012. 'The Basics of Western Blotting', *The Anatomical Record*, 295: 369-71.
- Jing, Z. C., Z. X. Yu, J. Y. Shen, B. X. Wu, K. F. Xu, X. Y. Zhu, L. Pan, Z. L. Zhang, X. Q. Liu, Y. S. Zhang, X. Jiang, and N. Galie. 2011. 'Vardenafil in pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled study', *Am J Respir Crit Care Med*, 183: 1723-9.
- Johnson, L., J. Boon, and E. C. Orton. 1999. 'Clinical characteristics of 53 dogs with Doppler-derived evidence of pulmonary hypertension: 1992-1996', *J Vet Intern Med*, 13: 440-7.
- Jones, D. A., C. W. Benjamin, and D. A. Linseman. 1995. 'Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades', *Mol Pharmacol*, 48: 890-6.
- Joppien Saskia, Maier Sarah Lena, Wendling Danielle Sabina. 2011. *Experimentelle Doktorarbeit* (Elsevier GmbH, München).
- Kalantari, Sara, and Mardi Gomberg-Maitland. 2016. 'Group 5 Pulmonary Hypertension: The Orphan's Orphan Disease', *Cardiology clinics*, 34: 443-49.
- Kalchiem-Dekel, O., J. R. Galvin, A. P. Burke, S. P. Atamas, and N. W. Todd. 2018. 'Interstitial Lung Disease and Pulmonary Fibrosis: A Practical Approach for General Medicine Physicians with Focus on the Medical History', *J Clin Med*, 7.
- Kawabata, Masahiro, Takeshi Imamura, and Kohei Miyazono. 1998. 'Signal transduction by bone morphogenetic proteins', *Cytokine Growth Factor Rev*, 9: 49-61.
- Kellihan, H. B., and R. L. Stepien. 2012. 'Pulmonary hypertension in canine degenerative mitral valve disease', *J Vet Cardiol*, 14: 149-64.
- Kim, Hyeonhui, Minki Kim, Sun-Kyoung Im, and Sungsoon Fang. 2018. 'Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes', *Laboratory animal research*, 34: 147-59.
- Kim, M. J., S. Y. Park, H. R. Chang, E. Y. Jung, A. Munkhjargal, J. S. Lim, M. S. Lee, and Y. Kim. 2017. 'Clinical significance linked to functional defects in bone morphogenetic protein type 2 receptor, BMPR2', *BMB Rep*, 50: 308-17.
- Koch, Klaus. 1998. 'Neue Studien veröffentlicht: Appetitzügler und Herzschäden', *Dtsch Arztebl International*, 95: 2496-.
- Koscianska, Edyta, Julia Starega-Roslan, and Wlodzimierz J. Krzyzosiak. 2011. 'The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors', *PLoS One*, 6: e28548-e48.

- Kovacs, G., A. Berghold, S. Scheidl, and H. Olschewski. 2009. 'Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review', *Eur Respir J*, 34: 888-94.
- Krause, G., Scherer, G., Müller, M. and Weiß, T. 2012. 'Grundlagen der Polymerasekettenreaktion (PCR) [Biomonitoring Methods in German language, 2004].' in, *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*.
- Kukulski, T., L. Hubbert, M. Arnold, B. Wranne, L. Hatle, and G. R. Sutherland. 2000. 'Normal regional right ventricular function and its change with age: a Doppler myocardial imaging study', *J Am Soc Echocardiogr*, 13: 194-204.
- Lan, N. S. H., B. D. Massam, S. S. Kulkarni, and C. C. Lang. 2018. 'Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment', *Diseases*, 6.
- Lau, E. M., Y. Tamura, M. D. McGoon, and O. Sitbon. 2015. 'The 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: a practical chronicle of progress', *Eur Respir J*, 46: 879-82.
- Lau, Edmund M. T., Eleni Giannoulatou, David S. Celermajer, and Marc Humbert. 2017. 'Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension', *Nature Reviews Cardiology*, 14: 603-14.
- Lau, Nelson C., Lee P. Lim, Earl G. Weinstein, and David P. Bartel. 2001. 'An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*', *Science*, 294: 858-62.
- Le Pavec, J., G. Lorillon, X. Jais, C. Tcherakian, S. Feuillet, P. Dorfmueller, G. Simonneau, M. Humbert, and A. Tazi. 2012. 'Pulmonary Langerhans cell histiocytosis-associated pulmonary hypertension: clinical characteristics and impact of pulmonary arterial hypertension therapies', *Chest*, 142: 1150-57.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*', *Cell*, 75: 843-54.
- Lee, W. T., Y. Ling, K. K. Sheares, J. Pepke-Zaba, A. J. Peacock, and M. K. Johnson. 2012. 'Predicting survival in pulmonary arterial hypertension in the UK', *Eur Respir J*, 40: 604-11.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, and V. N. Kim. 2003. 'The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing', *Nature*, 425: 415-9.
- Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim, and V. N. Kim. 2002. 'MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization', *Embo j*, 21: 4663-70.
- Ley, S., J. Ley-Zaporozhan, M. B. Pitton, J. Schneider, G. M. Wirth, E. Mayer, C. Duber, and K. F. Kreitner. 2012. 'Diagnostic performance of state-of-the-art imaging techniques for morphological assessment of vascular abnormalities in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH)', *Eur Radiol*, 22: 607-16.
- Ling, Y., M. K. Johnson, D. G. Kiely, R. Condliffe, C. A. Elliot, J. S. Gibbs, L. S. Howard, J. Pepke-Zaba, K. K. Sheares, P. A. Corris, A. J. Fisher, J. L. Lordan, S. Gaine, J. G. Coghlan, S. J. Wort, M. A. Gatzoulis, and A. J. Peacock. 2012. 'Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland', *Am J Respir Crit Care Med*, 186: 790-6.
- Lu, Jian, and Andrew G. Clark. 2012. 'Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression', *Genome research*, 22: 1243-54.
- Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, and U. Kutay. 2004. 'Nuclear export of microRNA precursors', *Science*, 303: 95-8.

- Machado, R. D., M. A. Aldred, V. James, R. E. Harrison, B. Patel, E. C. Schwalbe, E. Gruenig, B. Janssen, R. Koehler, W. Seeger, O. Eickelberg, H. Olschewski, C. G. Elliott, E. Glissmeyer, J. Carlquist, M. Kim, A. Torbicki, A. Fijalkowska, G. Szewczyk, J. Parma, M. J. Abramowicz, N. Galie, H. Morisaki, S. Kyotani, N. Nakanishi, T. Morisaki, M. Humbert, G. Simonneau, O. Sitbon, F. Soubrier, F. Coulet, N. W. Morrell, and R. C. Trembath. 2006. 'Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension', *Hum Mutat*, 27: 121-32.
- Machado, Rajiv D., Oliver Eickelberg, C. Gregory Elliott, Mark W. Geraci, Masayuki Hanaoka, James E. Loyd, John H. Newman, John A. Phillips, Florent Soubrier, Richard C. Trembath, and Wendy K. Chung. 2009. 'Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension', *Journal of the American College of Cardiology*, 54: S32-S42.
- Macias, M. J., P. Martin-Malpartida, and J. Massague. 2015. 'Structural determinants of Smad function in TGF-beta signaling', *Trends Biochem Sci*, 40: 296-308.
- MacNee, W. 1994. 'Pathophysiology of cor pulmonale in chronic obstructive pulmonary disease. Part One', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 150: 833-52.
- Maeder, M. T., O. D. Schoch, R. Kleiner, L. Joerg, D. Weilenmann, and Hypertension Swiss Society For Pulmonary. 2017. 'Pulmonary hypertension associated with left-sided heart disease', *Swiss Med Wkly*, 147: w14395.
- Martin-Duran, Rafael, Mariano Larman, Antonio Trugeda, Jose A. Vazquez De Prada, Javier Ruano, Alfonso Torres, Alvaro Figueroa, Antonio Pajaron, and Francisco Nistal. 1986. 'Comparison of Doppler-determined elevated pulmonary arterial pressure with pressure measured at cardiac catheterization', *The American Journal of Cardiology*, 57: 859-63.
- Martinez, C., A. Bernard, R. Dulgheru, P. Incarnato, C. Oury, and P. Lancellotti. 2016. 'Pulmonary Hypertension in Aortic Stenosis and Mitral Regurgitation: Rest and Exercise Echocardiography Significance', *Prog Cardiovasc Dis*, 59: 59-70.
- Massague, J. 2012. 'TGFbeta signalling in context', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 616-30.
- Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton. 2005. 'Smad transcription factors', *Genes Dev*, 19: 2783-810.
- Massagué, Joan, Stacy W. Blain, and Roger S. Lo. 2000. 'TGFβ Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders', *Cell*, 103: 295-309.
- McDougall, Carmel, Michael J. Hammond, Simon C. Dailey, Ildiko M. L. Somorjai, Scott F. Cummins, and Bernard M. Degnan. 2018. 'The evolution of ependymin-related proteins', *BMC evolutionary biology*, 18: 182-82.
- McGee, Michael, Nicholas Whitehead, Jennifer Martin, and Nicholas Collins. 2018. 'Drug-associated pulmonary arterial hypertension', *Clinical Toxicology*, 56: 801-09.
- McKeever RG, Hamilton RJ. 2020 Jan. 'Calcium Channel Blockers.'
- McLaughlin, V. V., S. J. Shah, R. Souza, and M. Humbert. 2015. 'Management of pulmonary arterial hypertension', *J Am Coll Cardiol*, 65: 1976-97.
- Medrek, Sarah K., Amir Sharafkhaneh, Andrew M. Spiegelman, Arnav Kak, and Lavannya M. Pandit. 2017. 'Admission for COPD Exacerbation Is Associated with the Clinical Diagnosis of Pulmonary Hypertension: Results from a Retrospective Longitudinal Study of a Veteran Population', *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 14: 484-89.

- Meister, Gunter, and Thomas Tuschl. 2004. 'Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA', *Nature*, 431: 343-49.
- Mitchell, Jane A., Blerina Ahmetaj-Shala, Nicholas S. Kirkby, William R. Wright, Louise S. Mackenzie, Daniel M. Reed, and Nura Mohamed. 2014. 'Role of prostacyclin in pulmonary hypertension', *Global cardiology science & practice*, 2014: 382-93.
- Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura. 2005. 'BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk', *Cytokine Growth Factor Rev*, 16: 251-63.
- Mizuno, T., T. Nishinaka, H. Ohnishi, E. Tatsumi, T. Tsukiya, M. Oshikawa, K. Shioya, Y. Takewa, A. Homma, H. Takano, S. Kitamura, and Y. Taenaka. 2003. 'The roles of vascular smooth muscle cells in the aortic wall thinness under prolonged continuous flow left heart bypass', *Artif Organs*, 27: 882-6.
- Moceri, Pamela, Delphine Baudouy, Olivier Chiche, Pierre Cerboni, Priscille Bouvier, Claire Chaussade, and Emile Ferrari. 2014. 'Imaging in pulmonary hypertension: Focus on the role of echocardiography', *Archives of Cardiovascular Diseases*, 107: 261-71.
- Moein, Shiva, Shaghayegh Haghjooy Javanmard, Maryam Abedi, Mohammad Hosein Izadpanahi, and Yousof Gheisari. 2017. 'Identification of Appropriate Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Long-term Hypoxia-treated Kidney Cells', *Advanced biomedical research*, 6: 15-15.
- Moncada, S., and J. R. Vane. 1979. 'The role of prostacyclin in vascular tissue', *Fed Proc*, 38: 66-71.
- Montani, D., S. Gunther, P. Dorfmuller, F. Perros, B. Girerd, G. Garcia, X. Jais, L. Savale, E. Artaud-Macari, L. C. Price, M. Humbert, G. Simonneau, and O. Sitbon. 2013. 'Pulmonary arterial hypertension', *Orphanet J Rare Dis*, 8: 97.
- Morrell, N. W., D. B. Bloch, P. ten Dijke, M. J. Goumans, A. Hata, J. Smith, P. B. Yu, and K. D. Bloch. 2016. 'Targeting BMP signalling in cardiovascular disease and anaemia', *Nat Rev Cardiol*, 13: 106-20.
- Morrell, Nicholas W. 2006. 'Pulmonary Hypertension Due to BMPR2 Mutation', *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3: 680-86.
- Morrell NW, Aldred MA, Chung WK, et al. 2018. 'Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension', *Eur Respir J*.
- Moser KM, Auger WR, Fedullo PF. 1990. 'Chronic major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension', *Circulation*.
- Mundy, Gregory R., Babatunde Oyajobi, Gloria Gutierrez, Julie Sterling, Susan Padalecki, Florent Elefteriou, and Ming Zhao. 2008. 'CHAPTER 18 - Cytokines and Bone Remodeling.' in Robert Marcus, David Feldman, Dorothy A. Nelson and Clifford J. Rosen (eds.), *Osteoporosis (Third Edition)* (Academic Press: San Diego).
- Naeije, Robert, and Alessandra Manes. 2014. 'The right ventricle in pulmonary arterial hypertension', *European Respiratory Review*, 23: 476-87.
- Nathan, S. D., J. A. Barbera, S. P. Gaine, S. Harari, F. J. Martinez, H. Olschewski, K. M. Olsson, A. J. Peacock, J. Pepke-Zaba, S. Provencher, N. Weissmann, and W. Seeger. 2019. 'Pulmonary hypertension in chronic lung disease and hypoxia', *Eur Respir J*, 53.
- Negewo, N. A., P. G. Gibson, and V. M. McDonald. 2015. 'COPD and its comorbidities: Impact, measurement and mechanisms', *Respirology*, 20: 1160-71.

- Nimmrich, I., S. Erdmann, U. Melchers, S. Chtarbova, U. Finke, S. Hentsch, I. Hoffmann, M. Oertel, W. Hoffmann, and O. Muller. 2001. 'The novel endymin related gene UCC1 is highly expressed in colorectal tumor cells', *Cancer Lett*, 165: 71-9.
- Okamura, Katsutomo, Na Liu, and Eric C. Lai. 2009. 'Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila Argonautes*', *Molecular cell*, 36: 431-44.
- Olena, Abigail F., and James G. Patton. 2010. 'Genomic organization of microRNAs', *Journal of cellular physiology*, 222: 540-45.
- Orriols, M., M. C. Gomez-Puerto, and P. Ten Dijke. 2017. 'BMP type II receptor as a therapeutic target in pulmonary arterial hypertension', *Cell Mol Life Sci*, 74: 2979-95.
- Ozgun Yurttas, N., and A. E. Eskazan. 2018. 'Dasatinib-induced pulmonary arterial hypertension', *Br J Clin Pharmacol*, 84: 835-45.
- Parasuraman, Sathish, Seamus Walker, Brodie L. Loudon, Nicholas D. Gollop, Andrew M. Wilson, Crystal Lowery, and Michael P. Frenneaux. 2016. 'Assessment of pulmonary artery pressure by echocardiography-A comprehensive review', *International journal of cardiology. Heart & vasculature*, 12: 45-51.
- Park, J. K., K. Y. Kim, Y. W. Sim, Y. I. Kim, J. K. Kim, C. Lee, J. Han, C. U. Kim, J. E. Lee, and S. Park. 2019. 'Structures of three endymin-related proteins suggest their function as a hydrophobic molecule binder', *IUCrJ*, 6: 729-39.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson, and G. Ruvkun. 2000. 'Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA', *Nature*, 408: 86-9.
- Peacock, A. J., N. F. Murphy, J. J. McMurray, L. Caballero, and S. Stewart. 2007. 'An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension', *Eur Respir J*, 30: 104-9.
- Pepke-Zaba, J., M. Delcroix, I. Lang, E. Mayer, P. Jansa, D. Ambroz, C. Treacy, A. M. D'Armini, M. Morsolini, R. Snijder, P. Bresser, A. Torbicki, B. Kristensen, J. Lewczuk, I. Simkova, J. A. Barbera, M. de Perrot, M. M. Hoeper, S. Gaine, R. Speich, M. A. Gomez-Sanchez, G. Kovacs, A. M. Hamid, X. Jais, and G. Simonneau. 2011. 'Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): results from an international prospective registry', *Circulation*, 124: 1973-81.
- Perdhana, Fajar, and Herdono Purnomo. 2018. 'Review Article: Management of Perioperative Anesthesia in Right Heart Failure', *Folia Medica Indonesiana*, 54: 75.
- Pousada, G., A. Balloira, C. Vilarino, J. M. Cifrian, and D. Valverde. 2014. 'Novel mutations in BMPR2, ACVRL1 and KCNA5 genes and hemodynamic parameters in patients with pulmonary arterial hypertension', *PLoS One*, 9: e100261.
- Pulido, T., I. Adzerikho, R. N. Channick, M. Delcroix, N. Galie, H. A. Ghofrani, P. Jansa, Z. C. Jing, F. O. Le Brun, S. Mehta, C. M. Mittelholzer, L. Perchenet, B. K. Sastry, O. Sitbon, R. Souza, A. Torbicki, X. Zeng, L. J. Rubin, and G. Simonneau. 2013. 'Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension', *N Engl J Med*, 369: 809-18.

- Pyle RL, Abbott J, MacLean H. 2004. 'Pulmonary hypertension and cardiovascular sequelae in 54 dogs', *Intern J Appl Res Vet Med*.
- Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L. 1979. 'Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features', *Am J Physiol*.
- Rabinovitch, M. 2012. 'Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension', *J Clin Invest*, 122: 4306-13.
- Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T., and Blakely RD Chang AS. 1993. 'Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning expression, and chromosomal localization', *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:2542-2546.
- Ramirez, R. L., 3rd, V. J. Perez, and R. T. Zamanian. 2018. 'Methamphetamine and the risk of pulmonary arterial hypertension', *Curr Opin Pulm Med*, 24: 416-24.
- Reinero, Carol, Lance C. Visser, Heidi B. Kellihan, Isabelle Masseur, Elizabeth Rozanski, Cécile Clercx, Kurt Williams, Jonathan Abbott, Michele Borgarelli, and Brian A. Scansen. 'ACVIM consensus statement guidelines for the diagnosis, classification, treatment, and monitoring of pulmonary hypertension in dogs', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, n/a.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz, and G. Ruvkun. 2000. 'The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 403: 901-6.
- Respress, Jonathan L., and Xander H. T. Wehrens. 2010. 'Transthoracic echocardiography in mice', *Journal of visualized experiments : JoVE*: 1738.
- Rich, J. D., T. Thenappan, B. Freed, A. R. Patel, R. A. Thisted, R. Childers, and S. L. Archer. 2013. 'QTc prolongation is associated with impaired right ventricular function and predicts mortality in pulmonary hypertension', *Int J Cardiol*, 167: 669-76.
- Rich, S., E. Kaufmann, and P. S. Levy. 1992. 'The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension', *N Engl J Med*, 327: 76-81.
- Rich, Stuart, David R. Dantzker, Stephen M. Ayres, Edward H. Bergofsky, Bruce H. Brundage, Katherine M. Detre, Alfred P. Fishman, Roberta M. Goldring, Bertron M. Groves, Spencer K. Koerner, Paul C. Levy, Lynne M. Reid, Carol E. Vreim, and George W. Williams. 1987. 'Primary Pulmonary Hypertension: A National Prospective Study', *Annals of Internal Medicine*, 107: 216-23.
- Roos, Kenneth P., Maria C. Jordan, Michael C. Fishbein, Matthew R. Ritter, Martin Friedlander, Helen C. Chang, Paymon Rahgozar, Tieyan Han, Alejandro J. Garcia, W. Robb Maclellan, Robert S. Ross, and Kenneth D. Philipson. 2007. 'Hypertrophy and heart failure in mice overexpressing the cardiac sodium-calcium exchanger', *Journal of cardiac failure*, 13: 318-29.
- Rosenkranz, S. 2015. 'Pulmonary hypertension 2015: current definitions, terminology, and novel treatment options', *Clin Res Cardiol*, 104: 197-207.
- Rosenkranz, S., J. S. Gibbs, R. Wachter, T. De Marco, A. Vonk-Noordegraaf, and J. L. Vachiery. 2016. 'Left ventricular heart failure and pulmonary hypertension', *Eur Heart J*, 37: 942-54.
- Rubin, Lewis J. 1997. 'Primary Pulmonary Hypertension', *New England Journal of Medicine*, 336: 111-17.
- Rudski, Lawrence G., Wyman W. Lai, Jonathan Afilalo, Lanqi Hua, Mark D. Handschumacher, Krishnaswamy Chandrasekaran, Scott D. Solomon, Eric K.

- Louie, and Nelson B. Schiller. 2010. 'Guidelines for the Echocardiographic Assessment of the Right Heart in Adults: A Report from the American Society of Echocardiography: Endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography', *Journal of the American Society of Echocardiography*, 23: 685-713.
- Russell, W.M.S., and R.L. Burch. 1959. 'The Principles of Humane Experimental Technique'.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase', *Science*, 239: 487-91.
- Saini, H. K., S. Griffiths-Jones, and A. J. Enright. 2007. 'Genomic analysis of human microRNA transcripts', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 17719-24.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 5463-67.
- Sastry, B. K., C. Narasimhan, N. K. Reddy, and B. S. Raju. 2004. 'Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study', *J Am Coll Cardiol*, 43: 1149-53.
- Savale, Laurent, Ly Tu, Dominique Rideau, Mohamed Izziki, Bernard Maitre, Serge Adnot, and Saadia Eddahibi. 2009. 'Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice', *Respiratory Research*, 10: 6.
- Schaiberger, P. H., T. C. Kennedy, F. C. Miller, J. Gal, and T. L. Petty. 1993. 'Pulmonary hypertension associated with long-term inhalation of "crank" methamphetamine', *Chest*, 104: 614-6.
- Schmidt, R. 1995. 'Cell-adhesion molecules in memory formation', *Behav Brain Res*, 66: 65-72.
- Seeger, W., Y. Adir, J. A. Barbera, H. Champion, J. G. Coghlan, V. Cottin, T. De Marco, N. Galie, S. Ghio, S. Gibbs, F. J. Martinez, M. J. Semigran, G. Simonneau, A. U. Wells, and J. L. Vachiery. 2013. 'Pulmonary hypertension in chronic lung diseases', *J Am Coll Cardiol*, 62: D109-16.
- Serres, F., V. Chetboul, V. Gouni, R. Tissier, C. C. Sampedrano, and J. L. Pouchelon. 2007. 'Diagnostic value of echo-Doppler and tissue Doppler imaging in dogs with pulmonary arterial hypertension', *J Vet Intern Med*, 21: 1280-9.
- Serres, F. J., V. Chetboul, R. Tissier, C. Carlos Sampedrano, V. Gouni, A. P. Nicolle, and J. L. Pouchelon. 2006. 'Doppler echocardiography-derived evidence of pulmonary arterial hypertension in dogs with degenerative mitral valve disease: 86 cases (2001-2005)', *J Am Vet Med Assoc*, 229: 1772-8.
- Shashoua, V. E. 1991. 'Ependymin, a brain extracellular glycoprotein, and CNS plasticity', *Ann N Y Acad Sci*, 627: 94-114.
- Simonneau, G., N. Galie, L. J. Rubin, D. Langleben, W. Seeger, G. Domenighetti, S. Gibbs, D. Lebrec, R. Speich, M. Beghetti, S. Rich, and A. Fishman. 2004. 'Clinical classification of pulmonary hypertension', *J Am Coll Cardiol*, 43: 5S-12S.
- Simonneau, G., I. M. Robbins, M. Beghetti, R. N. Channick, M. Delcroix, C. P. Denton, C. G. Elliott, S. P. Gaine, M. T. Gladwin, Z. C. Jing, M. J. Krowka, D. Langleben, N. Nakanishi, and R. Souza. 2009. 'Updated clinical classification of pulmonary hypertension', *J Am Coll Cardiol*, 54: S43-54.

- Simonneau, Gerald, Michael A. Gatzoulis, Ian Adatia, David Celermajer, Chris Denton, Ardeschir Ghofrani, Miguel Angel Gomez Sanchez, R. Krishna Kumar, Michael Landzberg, Roberto F. Machado, Horst Olschewski, Ivan M. Robbins, and Rogiero Souza. 2013. 'Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension', *Journal of the American College of Cardiology*, 62: D34-D41.
- Singh, T. P., M. Rohit, A. Grover, S. Malhotra, and R. Vijayvergiya. 2006. 'A randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study to evaluate the efficacy of oral sildenafil therapy in severe pulmonary artery hypertension', *Am Heart J*, 151: 851.e1-5.
- Sitbon, O., M. Humbert, X. Jais, V. Iosifescu, A. M. Hamid, S. Provencher, G. Garcia, F. Parent, P. Herve, and G. Simonneau. 2005. 'Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension', *Circulation*, 111: 3105-11.
- Slack, F. J., M. Basson, Z. Liu, V. Ambros, H. R. Horvitz, and G. Ruvkun. 2000. 'The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor', *Molecular cell*, 5: 659-69.
- Soydan, Lydia C., Heidi B. Kellihan, Melissa L. Bates, Rebecca L. Stepien, Daniel W. Consigny, Alessandro Bellofiore, Christopher J. Francois, and Naomi C. Chesler. 2015. 'Accuracy of Doppler echocardiographic estimates of pulmonary artery pressures in a canine model of pulmonary hypertension', *Journal of Veterinary Cardiology*, 17: 13-24.
- Stepien, R. L. 2009. 'Pulmonary arterial hypertension secondary to chronic left-sided cardiac dysfunction in dogs', *J Small Anim Pract*, 50 Suppl 1: 34-43.
- Stewart, Duncan J. 2005. 'Bone Morphogenetic Protein Receptor-2 and Pulmonary Arterial Hypertension', *Unraveling a Riddle Inside an Enigma?*, 96: 1033-35.
- Stickel, Simone, Wendy Gin-Sing, Martha Wagenaar, and J. Simon R. Gibbs. 2019. 'The practical management of fluid retention in adults with right heart failure due to pulmonary arterial hypertension', *European heart journal supplements : journal of the European Society of Cardiology*, 21: K46-K53.
- Sun, X. G., J. E. Hansen, R. J. Oudiz, and K. Wasserman. 2003. 'Pulmonary function in primary pulmonary hypertension', *J Am Coll Cardiol*, 41: 1028-35.
- Tantini, B., A. Manes, E. Fiumana, C. Pignatti, C. Guarnieri, R. Zannoli, A. Branzi, and N. Galie. 2005. 'Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells', *Basic Res Cardiol*, 100: 131-8.
- Thenappan, T., S. J. Shah, S. Rich, L. Tian, S. L. Archer, and M. Gomberg-Maitland. 2010. 'Survival in pulmonary arterial hypertension: a reappraisal of the NIH risk stratification equation', *Eur Respir J*, 35: 1079-87.
- Thibault, Hélène B., Baptiste Kurtz, Michael J. Raheer, Rahamthulla S. Shaik, Aaron Waxman, Geneviève Derumeaux, Elkan F. Halpern, Kenneth D. Bloch, and Marielle Scherrer-Crosbie. 2010. 'Noninvasive Assessment of Murine Pulmonary Arterial Pressure', *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 3: 157-63.
- Tousignant, C., H. Kim, F. Papa, and C. D. Mazer. 2012. 'Evaluation of TAPSE as a measure of right ventricular output', *Can J Anaesth*, 59: 376-83.
- Trip, P., E. J. Nossent, F. S. de Man, I. A. van den Berk, A. Boonstra, H. Groepenhoff, E. M. Leter, N. Westerhof, K. Grunberg, H. J. Bogaard, and A. Vonk-Noordegraaf. 2013. 'Severely reduced diffusion capacity in idiopathic pulmonary arterial hypertension: patient characteristics and treatment responses', *Eur Respir J*, 42: 1575-85.

- Tuder, R. M., S. L. Archer, P. Dorfmueller, S. C. Erzurum, C. Guignabert, E. Michelakis, M. Rabinovitch, R. Schermuly, K. R. Stenmark, and N. W. Morrell. 2013. 'Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension', *J Am Coll Cardiol*, 62: D4-12.
- Tuder, R. M., B. Groves, D. B. Badesch, and N. F. Voelkel. 1994. 'Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension', *The American journal of pathology*, 144: 275-85.
- Upton, P. D., and N. W. Morrell. 2013. 'The transforming growth factor-beta-bone morphogenetic protein type signalling pathway in pulmonary vascular homeostasis and disease', *Exp Physiol*, 98: 1262-6.
- van Dijk, Erwin L., Hélène Auger, Yan Jaszczyszyn, and Claude Thermes. 2014. 'Ten years of next-generation sequencing technology', *Trends in Genetics*, 30: 418-26.
- Visser, L. C., M. K. Im, L. R. Johnson, and J. A. Stern. 2016. 'Diagnostic Value of Right Pulmonary Artery Distensibility Index in Dogs with Pulmonary Hypertension: Comparison with Doppler Echocardiographic Estimates of Pulmonary Arterial Pressure', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30: 543-52.
- Voelkel, N. F., R. A. Quaife, L. A. Leinwand, R. J. Barst, M. D. McGoon, D. R. Meldrum, J. Dupuis, C. S. Long, L. J. Rubin, F. W. Smart, Y. J. Suzuki, M. Gladwin, E. M. Denholm, D. B. Gail, Lung National Heart, Cellular Blood Institute Working Group on, and Failure Molecular Mechanisms of Right Heart. 2006. 'Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure', *Circulation*, 114: 1883-91.
- Vonk-Noordegraaf, A., F. Haddad, K. M. Chin, P. R. Forfia, S. M. Kawut, J. Lumens, R. Naeije, J. Newman, R. J. Oudiz, S. Provencher, A. Torbicki, N. F. Voelkel, and P. M. Hassoun. 2013. 'Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology', *J Am Coll Cardiol*, 62: D22-33.
- Wahid, Fazli, Adeeb Shehzad, Taous Khan, and You Young Kim. 2010. 'MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803: 1231-43.
- Weiss, A., and L. Attisano. 2013. 'The TGFbeta superfamily signaling pathway', *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2: 47-63.
- Wharton, J., J. W. Strange, G. M. Moller, E. J. Growcott, X. Ren, A. P. Franklyn, S. C. Phillips, and M. R. Wilkins. 2005. 'Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells', *Am J Respir Crit Care Med*, 172: 105-13.
- Wienholds, Erno, and Ronald H. A. Plasterk. 2005. 'MicroRNA function in animal development', *FEBS Letters*, 579: 5911-22.
- Wightman, Bruce, Ilho Ha, and Gary Ruvkun. 1993. 'Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*', *Cell*, 75: 855-62.
- Wu, Ke, Juan He, Wenchen Pu, and Yong Peng. 2018. 'The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer', *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 16: 120-26.
- Yang, Zeng, Qu Xuebin, Li Hongling, Huang Shan, Wang Shihua, Xu Qilin, Lin Ruizhu, Han Qin, Li Jing, and Zhao Robert Chunhua. 2012. 'MicroRNA-100

- regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting BMP2', *FEBS Letters*, 586: 2375-81.
- Yin, F. C., H. A. Spurgeon, K. Rakusan, M. L. Weisfeldt, and E. G. Lakatta. 1982. 'Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 243: H941-H947.
- Yock, P. G., and R. L. Popp. 1984. 'Noninvasive estimation of right ventricular systolic pressure by Doppler ultrasound in patients with tricuspid regurgitation', *Circulation*, 70: 657-62.
- Yu, A. Y., L. A. Shimoda, N. V. Iyer, D. L. Huso, X. Sun, R. McWilliams, T. Beaty, J. S. Sham, C. M. Wiener, J. T. Sylvester, and G. L. Semenza. 1999. 'Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha', *The Journal of Clinical Investigation*, 103: 691-96.
- Zeng, Y. 2006. 'Principles of micro-RNA production and maturation', *Oncogene*, 25: 6156-62.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifizierung der pulmonalen Hypertonie modifiziert nach <i>Galie N, Humbert M, Vachery JL, et al.</i>	9
Abbildung 2: Versuchsaufbau über 9 Wochen mit initialer Tamoxifeninduktion (Tam) und sechswöchiger Hypoxieexposition. Anschließend wurden die Echokardiographie und die Organentnahme durchgeführt.	55
Abbildung 3: Schematische Aufteilung der Lungenlappen der Maus.	58
Abbildung 4: Darstellung der relativen miR-100 Expression von humanen pulmonalen Muskelzellen mittels zweistufiger PCR nach Transfektion.	63
Abbildung 5: Bestimmung der miR-100-Überexpression der transfizierten, für das NGS bestimmten hPASCs.	64
Abbildung 6: BMPR2-Expression in hPASCs, welche mit <i>precursor</i> - und <i>antisense</i> - Oligonukleotiden für miR-100 transfiziert wurden.	66
Abbildung 7: EPDR1-Expression auf mRNA-Ebene in transfizierten hPASCs	67
Abbildung 8: Körpergewichte der Versuchstiere vor und nach der fünftägigen Tamoxifeninjektion	69
Abbildung 9: körperliche Parameter der Versuchsmäuse nach der Exposition mit Normoxie oder Hypoxie ...	71
Abbildung 10: Echokardiographische Untersuchungen der LV-Ejektionsfraktion und des RVIDd/LVIDd-Quotienten der Mäuse	73
Abbildung 11: Echokardiographische Untersuchung der TAPSE bei den Versuchsmäusen	74
Abbildung 12: Echokardiographische Untersuchung des PAT/PET-Quotienten der Versuchsmäuse	75
Abbildung 13: Elastica-van-Gieson Färbung der arteriellen Lungengefäße.	76
Abbildung 14: miR-100 Expression in den Lungen der Versuchstiere	77
Abbildung 15: BMPR2-Expression in Lungen der Versuchstiere auf mRNA-Ebene	78
Abbildung 16: BMPR2-Expression in Lungen der Versuchstiere auf Protein-Ebene	79
Abbildung 17: EDPR1-Expression in Lungen der Versuchstiere auf mRNA-Ebene	80
Abbildung 18: EPDR1-Expression in Lungen der Versuchstiere auf Protein-Ebene.....	81
Abbildung 19: miR-100 Expression in den Aorten der Versuchstiere	82
Abbildung 20: BMPR2-Expression in Aorten der Versuchstiere auf mRNA-Ebene.....	83
Abbildung 21: EPDR1-Expression in Aorten der Versuchstiere auf mRNA-Ebene.....	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bestimmung des Drucks im rechten Vorhof anhand des sich während der Inspiration verändernden Durchmessers der V. cava inferior.....	20
Tabelle 2: Beurteilung der Wahrscheinlichkeit für eine PH anhand der Trikuspidalregurgitation.	20
Tabelle 3: Überlebenszeiten und –raten bei PAH-Erkrankung	27
Tabelle 4: Medikamente zur Behandlung der PH.....	29
Tabelle 5: Geräte und Gebrauchsgegenstände	34
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien	37
Tabelle 8: Kits.....	41
Tabelle 9: Primer (SYBRGreen)	41
Tabelle 10: Taqman und PrimePCR Assays	41
Tabelle 11: Marker	42
Tabelle 12: Enzyme	42
Tabelle 13: Primärantikörper für Western Blot	42
Tabelle 14: Sekundärantikörper für Western Blot.....	43
Tabelle 15: Programme	43
Tabelle 16: Ergebnisse der Transkriptomanalyse der mit miR-100 <i>precursor</i> - und Kontroll-Oligonukleotiden transfizierten hPASCs; aufgeführt sind die 10 am stärksten herabregulierten Gene.	65
Tabelle 18: Ergebnisse der Transkriptomanalyse der mit miR-100 <i>precursor</i> - und Kontroll-Oligonukleotiden transfizierten hPASCs; aufgeführt sind alle 222 herunterregulierten Gene.	XXIII
Tabelle 19: Monitoring der Versuchstiere in der Hypoxie-Kammer über 6 Wochen; Angegeben sind die Kontrollwerte in der Kammer (Sauerstoff, CO ₂ , NH ₃ , Temperatur und Luftfeuchtigkeit).	XXVI

Abkürzungsverzeichnis

ACVRL1	Serin / Threonin-Proteinkinase-Rezeptor R3
BMP	Bone morphogenetic protein
<i>aqua dest</i>	destilliertes Wasser
BMPR1	Bone morphogenetic protein receptor 1
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor 2
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAV1	Caveolin-1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter (Maßeinheit)
CO	Herzzeitvolumen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CT	Computertomographie
CTEPH	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPAH	Drogenassoziierte Pulmonale arterielle Hypertonie
EKG	Elektrokardiogramm
ENG	Endoglin
EPDR	Ependymin-related Protein
EPDR1	Ependymin-related Protein 1
ERS	European Respiratory Society
ESC	European Society of Cardiology
ET-1	Endothelin-1
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FBS/FCS	Fetales Kälberserum
xg	Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm (Maßeinheit für Masse)
GDF5&6	Wachstums-/Differenzierungsfaktor 5&6
h	Stunde

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPAH	vererbte Variante der Pulmonale arterielle Hypertonie
hPASC	humane Pulmonal-arterielle glatte Muskelzelle/n
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung
i.p.	intraperitoneal
IPAH	Idiopathische Pulmonale arterielle Hypertonie
IVC	individuell ventilierter Käfig
KGW	Körpergewicht
MERP	Mammalian ependymin-related protein
Meth-APAH	Methamphetamin-assoziierte Pulmonale arterielle Hypertonie
mg	Milligramm (Maßeinheit für Masse)
miR	microRNA
miR-100	microRNA-100
miRISC	microRNA-induced silencing complex
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Maßeinheit für Druck)
mRNA	Messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
mPAP	Mittlerer pulmonal-arterieller Druck
mS	Millisekunde
mV	Millivolt
N ₂	Stickstoff
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
O ₂	Sauerstoff
PaCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PAEC	Pulmonal-arterielle Endothelzellen
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PASC	Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen
PASP	Pulmonal-arterieller systolischer Druck
PAT	Pulmonale Akzelerationszeit
PAWP	Pulmonal-arterieller Wedge Druck

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCWP	Pulmonal-kapillarer Wedge Druck
PDE-5	Phosphodiesterase-5
PET	Pulmonale Ejektionszeit
PH	Pulmonale Hypertonie
PLCH	Pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose
PMDS	Persistierende Müllersche Gänge
PVR	Pulmonaler Gefäßwiderstand
RAP	Rechtsatrialer Druck
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Systemische Sklerose
SMAD	SMAD-Potein
TBX4	T-Box Transcription Factor 4
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
U	Units (Enzym-Einheit)
UCC1	Upregulated in colorectal cancer Gen 1
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius

Zusätzliche Daten

Tabelle 17: Ergebnisse der Transkriptomanalyse der mit miR-100 precursor- und Kontroll-Oligonukleotiden transfizierten hPASCs; aufgeführt sind alle 222 herunterregulierten Gene.

Gene Name	log2FC					
PKIA	0,0491	-0,1547	0,0936	1,6335	1,7846	1,9159
RDX	0,1262	-0,0803	-0,0547	1,3464	1,1998	1,3507
SLC30A6	0,1987	-0,0779	-0,1443	1,4617	1,4233	1,4041
ADAM12	0,0682	0,1111	-0,1984	1,0532	0,8824	1,0244
ITGB8	0,0450	-0,1085	0,0577	1,2856	1,2785	1,1178
DDX3Y	0,3024	-0,0682	-0,2988	1,1460	0,9962	1,4566
CDR1	-0,4309	-0,0322	0,3565	0,9820	1,3237	1,4359
RP2	0,1805	0,0164	-0,2255	1,2151	1,2930	1,2799
ERLIN2	-0,0425	0,0235	0,0180	1,0216	0,9629	0,9676
PRRC2C	0,1230	0,0048	-0,1398	0,8612	0,9305	0,9254
YWHAG	-0,0611	0,1110	-0,0567	0,8444	0,9466	0,9111
SPOPL	-0,5818	0,0624	0,3648	1,3886	1,1243	1,4069
SEC24A	0,0089	0,0843	-0,0990	0,7935	0,8589	0,8058
GNA13	0,0300	-0,0279	-0,0026	0,9148	0,8293	0,9473
SWAP70	-0,0404	-0,0635	0,0986	0,9080	0,8872	0,8723
CDK14	0,0915	0,1067	-0,2214	1,1770	1,0550	1,1173
PMM2	0,1927	-0,0616	-0,1539	1,5542	1,3434	1,4080
RBSN	0,0360	-0,0048	-0,0320	1,0299	1,1479	1,6659
SSH1	-0,0494	-0,0143	0,0615	0,9340	0,8542	0,9405
ATL3	-0,0568	0,0522	0,0025	0,7544	0,8363	0,7871
STAT3	-0,0461	0,0396	0,0051	0,7625	0,9293	0,8387
PRRC2B	-0,1685	0,0856	0,0692	0,7686	0,8851	0,8194
DENND6A	0,5356	0,0806	-1,0205	1,3415	1,7010	1,7564
UBASH3B	-0,1002	0,1498	-0,0624	0,9177	0,8356	0,7852
KLHL11	0,0276	0,1992	-0,2642	0,7033	0,9973	1,1312
PPIF	-0,0164	0,0294	-0,0135	0,9526	0,9230	0,9620
TMEM181	-0,0191	0,0129	0,0060	0,6015	0,8152	1,0207
TNRC6A	0,0305	-0,0089	-0,0221	0,8485	0,7826	0,8917
DPY19L3	-0,1057	0,1628	-0,0722	0,8422	0,8240	0,7316
PDCD4	0,2281	0,0969	-0,3974	0,9723	1,1487	1,0758
HNRNPR	0,1604	-0,1501	-0,0273	0,7069	0,7865	1,0587
CTNNB1	-0,1564	0,0698	0,0747	0,6772	0,7220	0,6861
LSM14A	0,0970	-0,0419	-0,0603	0,9945	0,7843	0,7853
PDPK1	0,1764	-0,1418	-0,0536	0,7688	0,9375	0,8288
C10orf12	-0,2030	-0,0823	0,2470	0,8432	1,0124	0,9148
EML4	0,0436	0,0129	-0,0584	0,8065	0,9045	0,6979
TGFBR1	0,0483	-0,0785	0,0270	0,7507	0,7112	0,6603
PGM2L1	0,0814	-0,1242	0,0348	0,9159	0,7839	1,1677
FECH	-0,0830	0,1276	-0,0538	1,0043	0,6670	1,1317
SLC26A2	0,0791	-0,0739	-0,0093	0,6284	0,7120	0,7807
GXYLT1	-0,0636	-0,0500	0,1073	0,8188	0,6868	0,6843
PTPN14	-0,0782	0,0171	0,0577	0,6713	0,5868	0,5950
ANKRD44	-0,4812	0,4036	-0,0576	0,7797	1,5618	1,5996
TMEM2	0,0695	0,0237	-0,0984	0,6680	0,6600	0,8318
SH3RF1	-0,0089	0,0116	-0,0028	0,5832	0,5956	0,7347
DLC1	0,0178	0,0432	-0,0631	0,6551	0,6207	0,5712
CTGF	-0,0508	0,0240	0,0255	0,6293	0,6591	0,4852
VKORC1L1	0,1080	0,0028	-0,1198	0,5083	0,8332	0,6352
NDC1	0,2484	-0,3162	0,0128	0,9799	0,9385	0,7043
ANKRD13C	0,2706	-0,0879	-0,2298	0,5536	0,8699	0,9975
C1GALT1	0,0814	-0,0322	-0,0529	0,6762	0,5308	0,7181
QKI	0,0851	-0,0097	-0,0802	0,7231	0,6961	0,4910
DDAH1	-0,0439	0,0703	-0,0291	0,6433	0,6214	0,5345
DDHD1	0,0261	-0,0107	-0,0158	0,4907	0,8468	0,7373
PAPPA-AS1	-0,7763	-0,5052	0,7754	0,9116	1,1168	2,0281
MAPK1	0,0300	0,0607	-0,0953	0,5822	0,4698	0,6147
C12orf49	0,1554	-0,1913	0,0150	0,6076	0,5719	0,7409
GNB4	-0,0218	0,0240	-0,0026	0,6224	0,5414	0,5644
TJP1	-0,0556	0,0700	-0,0173	0,4626	0,5999	0,5971
SLC39A14	0,0150	0,0055	-0,0208	0,4870	0,5565	0,6213
ITGA6	0,1239	-0,0328	-0,1003	0,5077	0,5550	0,6872
PRR14L	-0,0495	0,0024	0,0456	0,6104	0,6400	0,5324
ENTPD4	0,0686	-0,1628	0,0814	0,4972	0,6317	0,6635
TRIM2	-0,0461	0,3874	-0,4670	0,7667	0,2720	0,2472
TMEM248	-0,0703	-0,0723	0,1328	0,5022	0,6063	0,5432
PBX1	0,0756	-0,1630	0,0745	0,5996	0,5619	0,6621
SKIL	0,0412	-0,0033	-0,0390	0,6879	0,6248	0,3190
ZFHX3	-0,1815	0,0873	0,0784	0,4893	0,6880	0,5249
OSBP19	0,2013	0,0214	-0,2596	0,6274	0,5209	0,9239

CYBRD1	0,1006	0,0167	-0,1264	0,4973	0,5816	0,4470
ABCA1	-0,1285	0,0650	0,0553	0,4512	0,5676	0,4883
HNRNPM	0,0956	-0,1426	0,0365	0,4456	0,5647	0,6249
ERLIN1	0,1285	-0,0886	-0,0493	0,6459	0,5300	0,7783
F2RL1	-0,0486	-0,1314	0,1637	0,5664	0,4666	0,6187
MFAP3	-0,0164	0,2818	-0,3300	0,7049	0,7135	0,5363
BCAP29	0,0923	-0,1126	0,0129	0,5772	0,6233	0,5121
ARL6IP1	-0,0875	-0,0079	0,0899	0,4824	0,5582	0,4739
SMIM13	-0,1377	-0,1259	0,2322	0,7165	0,7512	0,6606
DNAJC16	0,1777	-0,1575	-0,0404	0,7426	0,4946	0,6247
ECE1	-0,0860	0,1397	-0,0646	0,4700	0,4675	0,5311
ATP6V1A	0,0132	0,0384	-0,0531	0,5716	0,4584	0,4367
RAB8B	0,0516	-0,0246	-0,0284	0,5255	0,4996	0,4858
C5orf51	0,1126	0,0542	-0,1835	0,4491	0,6213	0,6118
ASH1L	-0,1247	0,0470	0,0700	0,5738	0,3727	0,5820
SMURF2	0,1263	-0,0712	-0,0638	0,5073	0,4807	0,5196
CDC42SE2	0,2117	-0,1654	-0,0736	0,6997	0,6350	0,6305
TUBB2A	-0,1487	0,0064	0,1289	0,5379	0,3733	0,3503
CEP170	0,1688	-0,1096	-0,0754	0,4816	0,3650	0,5246
XYLT1	-0,1142	0,0956	0,0109	0,4171	0,5015	0,5444
PPP6R1	-0,2871	0,2213	0,0211	0,5975	0,6421	0,4287
ADAM17	0,0718	-0,0699	-0,0054	0,5327	0,5547	0,5351
FGD4	0,0690	0,0196	-0,0933	0,5409	0,5266	0,7044
ZEB2	0,0500	0,0291	-0,0827	0,4894	0,4540	0,4855
SBNO1	0,1341	-0,0877	-0,0566	0,5556	0,3892	0,4979
GFPT2	-0,0763	0,0896	-0,0183	0,4245	0,3974	0,5647
APPL2	0,0161	-0,0597	0,0416	0,6268	0,3953	0,6970
LMBR1	-0,0132	0,0042	0,0090	0,5273	0,3796	0,6391
ZBTB20	0,5806	-0,4311	-0,3906	1,3370	2,2692	-0,0183
GNB1	0,0115	0,0972	-0,1166	0,4524	0,4907	0,3545
DDX3X	0,1447	-0,1083	-0,0487	0,6133	0,4849	0,4762
MOB1B	0,1044	-0,1002	-0,0115	0,5531	0,4902	0,3855
SLC20A1	-0,0098	-0,0254	0,0345	0,4690	0,3872	0,4174
DICER1	0,1063	-0,0486	-0,0639	0,3950	0,4280	0,5131
EFCAB14	0,0543	-0,0686	0,0116	0,4537	0,4551	0,4306
H2AFV	0,0598	0,0520	-0,1187	0,4592	0,5003	0,4320
DERL1	-0,0544	-0,0187	0,0702	0,3942	0,5083	0,4808
HMGCS1	0,2269	-0,0592	-0,2012	0,3643	0,4584	0,5617
ZNF451	0,0542	0,0013	-0,0576	0,3322	0,3828	0,3478
ETF1	0,0755	0,0415	-0,1249	0,3122	0,3584	0,5057
IDI1	0,0341	-0,0691	0,0326	0,3295	0,4294	0,5181
CBFB	-0,0721	0,1019	-0,0357	0,4806	0,5112	0,3079
AIDA	0,0162	-0,0769	0,0574	0,4229	0,3953	0,2808
CAPRN1	-0,0420	0,0792	-0,0406	0,3956	0,3224	0,4283
NPTN	0,0550	-0,0203	-0,0363	0,4387	0,3772	0,4273
FRMD6	0,0638	0,0221	-0,0902	0,4263	0,3567	0,3772
MRPL19	0,0035	-0,0566	0,0511	0,5091	0,2460	0,4934
GAPVD1	0,1907	-0,1832	-0,0322	0,4226	0,4996	0,4915
HK2	-0,1452	0,1504	-0,0205	0,5600	0,2499	0,3947
MAPK1IP1L	-0,0446	0,0227	0,0209	0,3804	0,4112	0,3886
IRF2BP2	-0,2360	0,2208	-0,0210	0,4685	0,6260	0,4167
CACUL1	0,0302	-0,1119	0,0752	0,3875	0,4118	0,4427
PRRX1	0,1316	-0,0807	-0,0606	0,4478	0,2920	0,4070
NCEH1	0,0486	-0,0912	0,0384	0,3846	0,3766	0,4259
TUBB4B	-0,1141	0,0188	0,0881	0,4671	0,3921	0,3166
STAG2	0,0774	-0,1360	0,0494	0,3114	0,3195	0,5670
ACLY	-0,0892	0,0691	0,0156	0,3138	0,3856	0,4193
MOB1A	0,0925	-0,0394	-0,0578	0,3996	0,3665	0,4354
TROVE2	0,0492	-0,1147	0,0590	0,4160	0,2911	0,4543
TUBB3	-0,2900	0,0888	0,1617	0,5307	0,3107	0,3377
ITGA2	0,0751	-0,0815	0,0022	0,3576	0,2937	0,4037
CREB3L2	-0,0541	0,0616	-0,0098	0,3958	0,4638	0,2492
FSTL1	-0,0091	0,0414	-0,0333	0,3439	0,3000	0,3969
HHIP	-0,1505	0,0402	0,0986	0,3397	0,3720	0,3714
SLC1A1	0,1260	0,0290	-0,1707	0,4088	0,3374	0,3738
CDK17	0,1346	-0,1661	0,0157	0,2858	0,4296	0,3773
SYPL1	-0,0026	-0,0001	0,0027	0,3469	0,4101	0,3297
CAV2	0,0262	-0,0068	-0,0197	0,2026	0,4157	0,4388
TSPYL1	-0,0561	0,1741	-0,1363	0,3644	0,4329	0,2347
NRAS	0,0775	-0,0659	-0,0153	0,3401	0,4065	0,2900
BCAT1	0,0972	0,0325	-0,1401	0,3800	0,4099	0,3850
KDELRL2	-0,0500	0,0317	0,0170	0,3595	0,3139	0,2882
SACS	-0,0622	-0,0459	0,1024	0,2503	0,3776	0,3874
HMG2	0,1114	-0,0310	-0,0878	0,3174	0,3309	0,3254
SLC4A7	0,0477	-0,0058	-0,0433	0,2439	0,3897	0,3093
PTAR1	0,0950	-0,0230	-0,0775	0,3360	0,3218	0,3007
HIPK2	-0,1498	0,0754	0,0635	0,2373	0,3129	0,3543

NUFIP2	0,0459	-0,1133	0,0610	0,3351	0,3375	0,2578
ZMAT3	-0,0631	0,0948	-0,0367	0,2868	0,2551	0,3504
ASPH	0,1210	-0,1326	0,0005	0,2764	0,2449	-0,0676
TMTC3	0,1424	-0,0263	-0,1292	0,3370	0,3167	0,2541
MSMO1	0,0800	-0,0547	-0,0288	0,2333	0,3022	0,3171
FGF2	0,0878	-0,0172	-0,0753	0,2431	0,2722	0,3047
ATRX	0,1341	-0,1009	-0,0437	0,1990	0,2787	0,3534
UGDH	0,1030	-0,0490	-0,0598	0,2884	0,3308	0,1722
PJA2	0,1171	-0,0646	-0,0600	0,3111	0,2111	0,3116
CDH6	-0,0450	0,0881	-0,0474	0,2630	0,2714	0,2466
TMEM200A	-0,0430	0,0298	0,0122	0,1974	0,2417	0,1310
NTSE	0,1991	-0,0796	-0,1429	0,3598	0,2821	0,3761
PDE5A	0,1025	-0,0925	-0,0167	0,2620	0,2092	0,2618
TNPO1	0,0167	-0,0221	0,0052	0,2301	0,1458	0,3302
ATP2A2	-0,0006	-0,0079	0,0084	0,2198	0,2574	0,2280
ATP13A3	0,0796	-0,0616	-0,0217	0,1983	0,1783	0,2742
SPTAN1	-0,0769	0,0455	0,0284	0,1812	0,1873	0,2604
HSP90AB1	0,0703	0,0083	-0,0827	0,1890	0,1593	0,1719
DCBLD2	0,0779	-0,0257	-0,0556	0,2094	0,2136	0,1106
CLIC4	0,0402	-0,0044	-0,0369	0,1721	0,1352	0,2127
HSPA8	0,0264	-0,0382	0,0110	0,1963	0,1299	0,1705
SERPINE1	-0,0248	-0,0087	0,0329	0,1539	0,1576	0,1620
CCND1	-0,0225	0,0108	0,0114	0,1777	0,1391	0,1476
TAOK1	0,0210	0,0085	-0,0300	-0,2477	-0,3149	-0,2590
TXNRD1	0,1594	-0,1180	-0,0563	-0,3429	-0,3901	-0,1717
CALM2	0,1630	-0,0532	-0,1256	-0,3514	-0,2903	-0,2530
ATP2B4	-0,0074	0,0067	0,0007	-0,3293	-0,2918	-0,2869
FAM198B	0,0334	0,0334	-0,0692	-0,3988	-0,3030	-0,2502
LHFPL2	0,0186	0,0200	-0,0395	-0,4211	-0,4506	-0,1846
PPP3CA	0,0426	0,0522	-0,0998	-0,3207	-0,3409	-0,4610
PURB	0,0119	-0,1256	0,1044	-0,3244	-0,3854	-0,3712
COL3A1	0,0458	-0,1032	0,0521	-0,4324	-0,4226	-0,2304
C3	0,0167	-0,1063	0,0833	-0,5205	-0,3263	-0,3170
SLC39A6	0,0985	-0,0636	-0,0403	-0,4714	-0,3281	-0,3760
ZC3H12C	0,0092	-0,1140	0,0970	-0,4151	-0,4169	-0,4631
FBXO32	-0,1297	0,1294	-0,0114	-0,3934	-0,4937	-0,4822
SNX9	-0,0003	0,0350	-0,0356	-0,5388	-0,4062	-0,4072
GLB1	0,2126	-0,1061	-0,1327	-0,5704	-0,4474	-0,3914
ZZEF1	-0,2084	0,1955	-0,0155	-0,4876	-0,4339	-0,5432
LRRC17	0,1427	-0,2236	0,0561	-0,5309	-0,6190	-0,2984
ANKRD28	-0,0026	0,0603	-0,0602	-0,4907	-0,4970	-0,5497
CRABP2	-0,0391	0,0786	-0,0428	-0,4657	-0,5998	-0,5388
PPP4R3B	-0,0549	0,0809	-0,0297	-0,6634	-0,4907	-0,4388
VLDLR	0,0177	0,0164	-0,0347	-0,3623	-0,7175	-0,7051
TMEM30A	0,0668	-0,0552	-0,0142	-0,5604	-0,5291	-0,3939
LUM	0,2998	-0,0413	-0,3269	-0,7749	-0,8258	-0,3422
ABCA6	0,0974	-0,2202	0,0999	-0,7170	-0,7274	-0,4249
CXCL1	0,0726	-0,0217	-0,0539	-0,6403	-0,5168	-0,4515
STAT5B	-0,0187	0,0931	-0,0798	-0,7603	-0,6876	-1,0052
ARHGAP20	-0,0970	0,0094	0,0820	-1,0417	-0,9767	-0,4362
DGCR2	-0,2403	0,0413	0,1692	-0,6341	-0,9839	-0,8436
FZD8	-0,2541	0,3108	-0,1186	-0,4927	-0,7534	-1,0190
ZDHHC18	-0,0782	-0,2131	0,2511	-0,8248	-1,2310	-1,3983
SLC44A1	0,0801	-0,0992	0,0135	-0,5954	-0,6112	-0,5794
SPSB1	-0,2599	0,1228	0,1057	-0,7509	-0,6199	-0,8567
CLDN11	-0,1138	0,1372	-0,0349	-0,6443	-0,5559	-0,7096
NEU1	0,0688	-0,0884	0,0152	-0,6910	-0,7238	-0,6735
NMT1	0,1234	-0,1438	0,0080	-0,7712	-0,7610	-0,6112
BAZZA	0,0483	0,0537	-0,1078	-0,6834	-0,6052	-0,8286
ANKRD52	-0,2051	0,1236	0,0608	-0,7370	-0,6523	-0,6862
CTDSP2	-0,0481	0,1323	-0,0943	-0,8026	-0,5535	-0,7878
IMPDH1	-0,2383	0,2263	-0,0256	-1,0176	-0,6196	-1,3275
RMND5A	-0,0418	-0,1008	0,1323	-0,7412	-0,9229	-0,8487
ADAMT5S	0,0196	0,1613	-0,2042	-0,9335	-0,8046	-0,9348
MTOR	-0,0731	0,0762	-0,0069	-0,6453	-0,7523	-0,8678
SUDS3	0,0658	-0,2114	0,1238	-1,2512	-0,8584	-1,1207
SMARCA5	0,1402	-0,0853	-0,0659	-0,7110	-0,8682	-0,6315
CDK6	-0,0254	-0,0476	0,0702	-0,6736	-0,6805	-0,7812
DIXDC1	0,1461	-0,2892	0,1044	-1,8048	-0,9137	-1,3266
IFIT2	-0,3171	-0,1536	0,3766	-0,7651	-1,8844	-1,7810
ST6GALNAC4	-0,4089	0,2543	0,0759	-1,4306	-1,1708	-1,6467
KCTD10	0,0336	0,0717	-0,1117	-0,8309	-0,9628	-0,7906
SMARCD1	-0,2075	0,1884	-0,0081	-1,0450	-1,2489	-1,5329
ATP6AP1	0,0047	-0,0444	0,0385	-1,0013	-0,9268	-0,9248
ADAM19	0,0627	0,0172	-0,0837	-1,3506	-1,5678	-1,4457
EPDR1	0,0256	-0,0824	0,0533	-1,7454	-1,7695	-1,5250

Anhang

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Grundmann für die Möglichkeit bedanken, in dieser Arbeitsgruppe forschen zu dürfen.

Besonders bedanken möchte ich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Johannes Hirschberger für die Übernahme, die Durchsicht und Einreichung dieser Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Franziska Pankratz für die Betreuung und Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat.

Bei allen Mitgliedern der AG Grundmann möchte ich mich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Dr. rer. nat. Christian Smolka für das Korrekturlesen und Catherina Jähnich für die Einarbeitung und Hilfe bei den Versuchen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Achim Lothar für die Unterstützung bei den *in vivo* Versuchen.

Mein Dank gilt auch Lena Meier und Delia Schlösser für das gemeinsame Durchhalten während der zwei Jahre.

Außerdem möchte ich meinen fleißigen Korrekturlesern Claudine Borris, Christin Emming und Delia Schlösser danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner großartigen Familie, die mir immer den Rücken gestärkt hat. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern dafür, dass sie mich während des Studiums und der Doktorarbeit stets unterstützt haben.

Großer Dank gilt auch meiner Freundin Christin Emming für ihre Unterstützung, Geduld und ihre unermüdliche Art mich zu motivieren.