

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	14
1.1 Pulmonale Hypertonie des Menschen	14
1.1.1 Definition der pulmonalen Hypertonie (PH)	14
1.1.2 Geschichte und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	14
1.1.3 Prävalenz, Gruppeneinteilung und Klinik	15
1.1.4 Prognose	17
1.1.5 Therapie	18
1.1.6 Pathogenese	19
1.1.6.1 Vaskuläres Remodeling	19
1.1.6.1.1 Anatomie und anatomische Besonderheiten der Lungenstrombahn	19
1.1.6.1.2 Remodeling der <i>Intima</i>	21
1.1.6.1.3 Remodeling der <i>Media</i>	22
1.1.6.1.4 Remodeling der <i>Adventitia</i>	22
1.1.6.2 Inflammation	23
1.1.6.3 In-situ Thrombose	23
1.1.6.4 Vasokonstriktion	23
1.1.6.4.1 Pulmonale Hypoxie und hypoxische Vasokonstriktion	23
1.1.6.4.2 Vasokonstriktion im Rahmen der pulmonalen Hypertonie	25
1.1.6.5 Mediatoren der pulmonalen Hypertonie	25
1.1.6.6 Genetische Grundlagen	26
1.2 Der rechte Ventrikel - lebenslimitierender Faktor	27
1.2.1 Definition des Rechtsherzversagens	27
1.2.2 Anatomische Besonderheiten des rechten Ventrikels	27
1.2.3 Pathophysiologie der PH-induzierten Rechtsherzhypertrophie	28
1.2.4 Therapie der PH-assoziierten rechtsventrikulären Dysfunktion	29
1.2.5 Mechanismen von adaptiver <i>versus</i> maladaptiver Hypertrophie des rechten Ventrikels	29
1.3 Pulmonale Hypertonie in der Tiermedizin	31
1.3.1 Pulmonale Hypertonie des Rindes	31
1.3.2 Pulmonale Hypertonie der Broiler	32
1.3.3 Pulmonale Hypertonie des Hundes	33
1.4 Experimentelle Tiermodelle	35
1.4.1 Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	35

1.4.2 Mausmodell des pulmonalerteriellen „banding“	37
1.5 Siah – Spitze des Eisberges	38
1.5.1 Die Siah-Ubiquitinligasen	38
1.5.2 Ubiquitinligasefunktion von Siah	39
1.5.3 Siah und die hypoxische Reaktion	41
1.5.3.1 Zelluläre Adaptationsvorgänge bei Hypoxie	41
1.5.3.2 Der Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktor (HIF) - Schlüsselenzym der hypoxischen Reaktion	41
1.5.3.3 Prolyl-4-Hydroxylasen und HIF-inhibierender Faktor	42
1.5.4 Siah-Zielproteine – Regulation von HIF	43
1.5.5 Siah als Zielprotein – „upstream Regulation“	44
1.5.6 Andere Zielproteine von Siah	45
1.5.7 Siah in der Forschung	46
1.5.8 Siah knockout-Mäuse	46
1.5.8.1 Siah1a knockout Mäuse	46
1.5.8.2 Siah2 knockout-Mäuse	47
1.6 Rolle der Siah-Kaskade in der pulmonalen Hypertonie und kardialen Hypertrophie	48
1.6.1 Rolle von HIF in der pulmonalen Hypertonie	48
1.6.2 Rolle von HIF im Herzen	48
1.7 Wissenschaftliche Fragestellung der Arbeit	49
2. Material und Methoden	52
2.1 Material	52
2.1.1 Versuchstiere	52
2.1.2 Tierversuchsgenehmigung	53
2.1.3 Material und Geräte für die Mausmodelle	54
2.1.3.1 Injektionslösungen und Substanzen	54
2.1.3.2 Verbrauchsmaterial	54
2.1.3.3 Geräte für die Echokardiographie	56
2.1.3.4 Geräte und Materialien für das Hypoxiemodell	56
2.1.3.5 Geräte und Instrumente für die chirurgische Eingriffe	56
2.1.4 Histologie	57
2.1.4.1 Geräte/ Software/ Makros	57
2.1.4.2 Verbrauchsmaterial	58
2.1.4.3 Lösungen, Kits und Antikörper für die immunhisto- und zytochemischen Markierungen	58
2.1.5 Molekularbiologie	60
2.1.5.1 Verbrauchsmaterial	60
2.1.5.2 Kits und Standards	61

2.1.5.3 Geräte	62
2.1.5.4 Primerdesign und verwendete Primer	63
2.1.5.5 Antikörper für die Westernblotanalysen	64
2.2 Methoden	65
2.2.1 Mausmodell 1: Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie	65
2.2.1.1 Aufteilung der Tiergruppen	66
2.2.2 Mausmodell 2: Pulmonalarterielles „banding“	68
2.2.2.1 Aufteilung der Tiergruppen	69
2.2.3 Echokardiografie	70
2.2.4 Hämodynamische Messungen	73
2.2.4.1 Vorbereitungen	73
2.2.4.2 Präparation der linken Arteria carotis	74
2.2.4.3 Präparation der rechten Vena jugularis	74
2.2.4.4 Messung des systolischen arteriellen und systolischen rechtsventrikulären Druckes	74
2.2.5 Hämatokritwert	75
2.2.6 Entnahme der Lunge	75
2.2.7 Präparation des Herzens	76
2.2.8 Entnahme der Tibia	77
2.2.9 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	77
2.2.9.1 Einbettung und Schneiden des Gewebes	77
2.2.9.2 Histologische Untersuchung der Lungen	77
2.2.9.2.1 Muskularisierungsgrad	78
2.2.9.2.1.1 Protokoll der Anti-alpha Aktin/von Willebrand Faktor-Immunhistochemie	78
2.2.9.2.1.2 Morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades	79
2.2.9.2.2 Wandstärke	81
2.2.9.2.2.1 Färbeprotokoll der <i>Elastica</i> van Gieson-Färbung	81
2.2.9.2.2.1 Morphometrische Analyse der Wandstärke	82
2.2.9.3 Histologische Untersuchung des rechten Ventrikels	83
2.2.9.3.1 Kollagenanteil	83
2.2.9.3.1.1 Färbeprotokoll der Sirius Red Färbung	83
2.2.9.3.1.2 Analyse des Kollagenanteils	84
2.2.9.3.2 Ratio Kapillaren zu Kardiomyozyten	85
2.2.9.3.2.1 Färbeprotokoll der Wheat germ agglutinin / Isolectin B4- Histochemie	85
2.2.9.3.2.2 Analyse der Anzahl der Kardiomyozyten und Kapillaren	86
2.2.10 Molekularbiologische Untersuchungen	88
2.2.10.1 RNA-Isolation, Reinheitsbestimmung und c-DNA-Synthese	88
2.2.10.2 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktionen	89
2.2.10.3 Agarose-Gelelektrophorese	90
2.2.10.4 Proteinisolierung	91

2.2.10.5 Bestimmung der Proteinkonzentration	91
2.2.10.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	92
2.2.10.7 Western Blot	93
2.2.10.8 Enzyme-linked immunosorbent assay	94
2.2.11 Statistische Auswertung	95
3. Ergebnisse	97
3.1 Siah2 Mäuse im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	97
3.1.1 Auswirkungen der Hypoxie-Exposition	97
3.1.2 Hämatokritwert	98
3.1.3 Systolischer arterieller Druck	99
3.1.4 Rechtsventrikulärer systolischer Druck	100
3.1.5 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus Septum als Maß der Rechtsherzhypertrophie	100
3.1.6 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht als Maß der Rechtsherzhypertrophie	101
3.1.7 Morphometrische Analyse der Lungengefäße	102
3.1.7.1 Muskularisierungsgrad	102
3.1.7.2 Mediale Wandstärke	104
3.1.8 Echokardiografische Untersuchungen	105
3.1.8.1 Rechter Ventrikel und rechtes Atrium	105
3.1.8.2 Cardiac output	108
3.1.8.3 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels	109
3.1.8.4 IVRT/RR – diastolische Funktion des rechten Ventrikels	111
3.1.8.5 MPI – globale Funktion des rechten Ventrikels	113
3.1.8.6 Zusammenfassung der echokardiografischen Befunde	115
3.1.9 Prozentualer Kollagenanteil des rechten Ventrikels	115
3.1.10 Molekularbiologische Untersuchungen	116
3.1.10.1 Genexpression von siah2 und siah1a/b in der Lunge und im rechten Ventrikel	116
3.1.10.2 Proteinexpression der Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD)1, PHD2 und PHD3 in der Lunge und im rechten Ventrikel	119
3.1.10.3 Proteinexpression von vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in der Lunge und im rechten Ventrikel	123
3.1.10.4 Genexpression von vascular endothelial growth factor a, vegf-rezeptor 1 und vegf-rezeptor 2 in der Lunge und im rechten Ventrikel	124
3.2 Siah2 Mäuse im Modell des pulmonalarteriellen „banding“	128
3.2.1 Auswirkungen des pulmonalarteriellen „banding“	128
3.2.2 Systolischer arterieller Druck	129
3.2.3 Rechtsventrikulärer systolischer Druck	130

3.2.4 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus <i>Septum</i> als Maß der Rechtsherzhypertrophie	131
3.2.5 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht als Maß der Rechtsherzhypertrophie	131
3.2.6 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem <i>Atrium</i> und Körpergewicht als Maß des Rechtsherzversagens	132
3.2.7 Echokardiografische Untersuchungen	133
3.2.7.1 Rechter Ventrikel und rechtes Atrium	133
3.2.7.2 Cardiac output	136
3.2.7.3 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels	137
3.2.7.4 IVRT/RR – diastolische Funktion des rechten Ventrikels	139
3.2.7.5 MPI – globale Funktion des rechten Ventrikels	140
3.2.7.6 Zusammenfassung der echokardiografischen Befunde	142
3.2.8 Prozentualer Kollagenanteil des rechten Ventrikels	142
3.2.9 Verhältnis der Anzahl der Kapillaren zur Anzahl der Kardiomyozyten im rechten Ventrikel	144
3.2.10 Molekularbiologische Untersuchungen	144
3.2.10.1 Genexpression von <i>siah2</i> und <i>siah1a/b</i> im rechten Ventrikel	144
3.2.10.2 Proteinexpression der Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD)1, PHD2 und PHD3 im rechten Ventrikel	146
3.2.10.3 Proteinexpression von vascular endothelial growth factor A im rechten Ventrikel	148
3.2.10.4 Genexpression von vascular endothelial growth factor a, vegf-rezeptor 1 und vegf-rezeptor 2 im rechten Ventrikel	149
3.3 <i>Siah1/2</i> Mäuse im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	151
3.3.1 Auswirkungen der Hypoxie-Exposition	151
3.3.2 Hämatokritwert	153
3.3.3 Systolischer arterieller Druck	153
3.3.4 Rechtsventrikulärer systolischer Druck	154
3.3.5 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus <i>Septum</i> als Maß der Rechtsherzhypertrophie	155
3.3.6 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht als Maß der Rechtsherzhypertrophie	155
3.3.7 Morphometrische Analyse der Lungengefäße	156
3.3.7.1 Muskularisierungsgrad	156
3.3.7.2 Mediale Wandstärke	158
3.3.8 Echokardiografische Untersuchungen	159
3.3.8.1 Rechter Ventrikel und rechtes Atrium	159
3.3.8.2 Cardiac output	162
3.3.8.3 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels	163
3.3.8.4 IVRT/RR – diastolische Funktion des rechten Ventrikels	165

3.3.8.5 MPI – globale Funktion des rechten Ventrikels	167
3.3.8.6 Zusammenfassung der echokardiografischen Befunde	169
3.3.9 Prozentualer Kollagenanteil des rechten Ventrikels	169
3.3.10 Molekularbiologische Untersuchungen	170
3.3.10.1 Proteinexpression der Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD)1, PHD2 und PHD3 in der Lunge	170
3.4 Siah1/2 Mäuse im Modell des pulmonalarteriellen „banding“	173
3.4.1 Auswirkungen des pulmonalarteriellen „banding“	173
3.4.2 Systolischer arterieller Druck	174
3.4.3 Rechtsventrikulärer systolischer Druck	175
3.4.4 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus Septum als Maß der Rechtsherzhypertrophie	176
3.4.5 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht als Maß der Rechtsherzhypertrophie	176
3.4.6 Verhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Tibialänge als Maß der Rechtsherzhypertrophie	177
3.4.7 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Atrium und Körpergewicht als Maß des Rechtsherzversagens	178
3.4.8 Echokardiografische Untersuchungen	179
3.4.8.1 Rechter Ventrikel und rechtes Atrium	179
3.4.8.2 Cardiac output	182
3.4.8.3 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels	183
3.4.8.4 IVRT/RR – diastolische Funktion des rechten Ventrikels	185
3.4.8.5 MPI – globale Funktion des rechten Ventrikels	187
3.4.8.6 Zusammenfassung der echokardiografischen Befunde	188
3.4.9 Prozentualer Kollagenanteil des rechten Ventrikels	188
4. Diskussion	190
4.1 Wahl der Tiermodelle	190
4.1.1 Chronische Hypoxie	190
4.1.2 Pulmonalarteriell „banding“	192
4.2 Interpretation der physiologischen, histologischen und echokardiografischen Untersuchungsergebnisse der Siah Mäuse im Modell der chronischen Hypoxie	194
4.2.1 Physiologische Parameter	194
4.2.2 Histologische Parameter	195
4.2.3 Echokardiografische Messungen	196
4.3 Interpretation der physiologischen, histologischen und echokardiografischen Untersuchungsergebnisse der Siah Mäuse im Modell des pulmonalarteriellen „banding“	198
4.3.1 Physiologische Parameter	198
4.3.2 Echokardiografische Parameter	199

4.3.3 Histologische Parameter	201
4.4 Molekularbiologische Untersuchungen	204
4.4.1 Genexpression der Siah-Ubiquitinligasen	204
4.4.2 Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD)	205
4.4.2.1 Proteinexpression von PHD1	205
4.4.2.2 Proteinexpression von PHD2	206
4.4.2.3 Proteinexpression von PHD3	207
4.4.2.4 Auswirkung der Prolyl-4-Hydroxylaseexpression bei SiahKO Tieren auf die Entwicklung der pulmonalen Hypertonie	209
4.4.3 Vascular endothelial growth factor (VEGF)	210
4.4.3.1 Physiologische Funktion von vascular endothelial growth factor	211
4.4.3.2 Bedeutung von vascular endothelial growth factor in der pulmonalen Hypertonie	212
4.4.3.3 Bedeutung von vascular endothelial growth factor im Herzen	212
4.4.3.4 Vascular endothelial growth factor A Proteinexpression in der Lunge und im rechten Ventrikel der Siah2 Mäuse	213
4.4.3.5 Genexpression von vascular endothelial growth factor (vegfa), vegf-rezeptor 1 und vegf-rezeptor 2	214
4.5 Resümee	216
5. Zusammenfassung	217
6. Summary	219
7. Literaturverzeichnis	221
8. Abbildungsverzeichnis	243
9. Tabellenverzeichnis	251
10. Wissenschaftliche Beiträge	254
10.1 Veröffentlichungen	254
10.2 Poster	254
11. Danksagung	256