

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	2
1. EINLEITUNG	3
1.1. Pulmonale arterielle Hypertonie (PAH)	3
1.1.1 Definition und Epidemiologie	3
1.1.2 Klassifizierung	3
1.1.3 Pathophysiologie.....	6
1.1.3.1 Epigenetische Modulation.....	8
1.1.4 Sonstige in der PAH-Pathogenese beteiligte Prozesse	9
1.1.4.1 Stickstoffmonoxid-Signalweg.....	9
1.1.4.2 Prostazyklin-Thromboxan A ₂ -Signalweg.....	9
1.1.4.3 Endothelin-1-Signalweg.....	9
1.1.5 Therapie	10
1.2 Chronische systemische Inflamationsprozesse.....	11
1.2.1 Adipozytokin-vermittelte Inflammation	12
1.2.2 Zytokine	12
1.2.3 Interleukin-6-Zytokin Familie	13
1.2.3.1 Interleukin-6 (IL6).....	13
1.2.3.2 Funktionelle Rolle von IL6 bei PAH.....	15
1.3 Transkriptionsfaktoren.....	16
1.3.1 Forkhead-Box-O (FoxO) Transkriptionsfaktoren.....	17
1.3.1.1 FoxO1	17
1.3.1.2 Rolle von FoxO1 in der glatten Muskelzelle	19
1.3.1.3 Regulatorische Mechanismen der FoxO1-Aktivität.....	19
1.4 Adipositas	20
1.5 Metabolische Programmierung.....	21
1.5.1 Metabolische Programmierung durch perinatale Adipositas	22
1.5.2 Epigenetische Einflüsse bei der perinatalen Programmierung	23
1.6 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	24
1.7 Hypothese und Ziele	26
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 Chemikalien und Substanzen.....	28
2.2 Geräte.....	30

2.3 Verbrauchsmaterialien..... 31

2.4 Tier- und Zelllinien..... 31

2.5 Puffer und Lösungen..... 32

2.6 Antikörper..... 34

2.7 Tierversuche 35

 2.7.1 Tiermodell der *metabolischen Programmierung*..... 35

 2.7.2 Physiologische Daten der Nachkommen 35

 2.7.3 Genotypisierung der IL6-knockout- (IL6^{-/-}) Maus..... 36

 2.7.4 Serum-IL6-ELISA 37

 2.7.5 Behandlung mit Paclitaxel..... 37

 2.7.6 Intraperitonealer Glukosetoleranztest 38

 2.7.7 Echokardiografie..... 38

 2.7.8 Invasive Blutdruckmessung 39

2.8 Histologische Analysen 40

 2.8.1 Gewebepräparation 40

 2.8.2 Histomorphometrische Quantifizierung der Mikrogefäße..... 40

 2.8.3 Isolation von spezifischen Gewebearealen mittels Lasermikrodissektion 41

2.9 Immunhistochemische Färbungen 41

 2.9.1 Von-Willebrand-Faktor (vWF) und alpha smooth muscle actin (αSMA) Co-Färbung 41

 2.9.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 42

2.10 Immunfluoreszenz Färbungen 42

 2.10.1 Co-Färbung FoxO1/Ki67 mit αSMA 42

2.11 Zellkulturstudien..... 43

 2.11.1 Medium 43

 2.11.1.1 Nährmedium (full medium)..... 43

 2.11.1.2 Starvingmedium 43

 2.11.2 Kultivierung der murinen Alveolar Epithel Zellen Typ 2 43

 2.11.3 Stimulation der murinen Alveolar Epithel Zellen Typ 2 44

 2.11.4 Assay..... 44

 2.11.4.1 BrdU-ELISA Zellproliferations-Assay 44

 2.11.4.2 MTT Zellviabilität-Assay..... 45

 2.11.4.3 Caspase-3/7-Glo-Aktivitäts-Assay..... 45

2.12 Methoden zur Bestimmung der Regulation von Expressionsmustern auf RNA-Level 45

 2.12.1 RNA-Isolation und RNA-Konzentrationsbestimmung 45

2.12.2 cDNA-Synthese	46
2.12.3 Quantitative RT-PCR.....	47
2.12.4 Primerliste	48
2.12.5 Statistische Auswertung von qRT-PCR Ergebnissen	49
2.13 Methoden zur Bestimmung der Regulation von Expressionsmustern	
auf Proteinebene	49
2.13.1 Proteinisolation und Bestimmung der Proteinkonzentration	49
2.13.2 Western Blot Analyse	50
2.13.4 Verdünnungen der jeweiligen Primär- und Sekundärantikörper	52
1.14 Statistische Auswertung.....	52
3. ERGEBNISSE	53
3.1. (a) Untersuchung des Einflusses sowie des Mechanismus von mütterlicher Adipositas auf die Mikrogefäßentwicklung in den Nachkommen und (1b) ob mütterliche Adipositas die Entwicklung von PAH begünstigt.....	53
3.1.1 Mütterliche Adipositas induziert eine Zunahme der Muskularisierung, Proliferation und Anzahl pulmonaler Mikrogefäße in den Nachkommen.....	53
3.1.2 Die Genexpression von Endothelzellmarkern und pro-angiogenetischer Marker divergiert in Lungen von Nachkommen Hochfett-diät-gefütterter Muttertiere	55
3.1.3 Mütterliche Adipositas induziert eine rechtsventrikuläre strukturelle und funktionelle Veränderung des Herzens in den Nachkommen	56
3.1.4 Nachkommen adipöser Muttertiere zeigen eine veränderte Genexpression von Blutdruck-regulierenden Genen.....	58
3.2 Analyse, ob die Effekte des <i>vaskulären Remodellings</i> infolge metabolischer Programmierung über eine IL6-FoxO1-Achse vermittelt werden.....	59
3.2.1 Die zytoplasmatische Degradierung des Transkriptionsfaktors FoxO1 und die Regulation dessen Zielgene ist assoziiert mit einem vaskulären Remodelling pulmonaler Mikrogefäße nach metabolischer Programmierung.....	59
3.2.2 IL6-defiziente Mäuse sind geschützt vor der erhöhten Gefäßmuskularisierung nach mütterlicher Adipositas.....	61
3.2.3 IL6-Defizienz schützt vor Veränderungen in der mRNA-Genexpression endothelialer und pro-angiogenetischer Marker in Nachkommen adipöser Muttertiere..	62
3.2.4 IL6-defiziente Nachkommen adipöser Muttertiere sind geschützt vor einer erhöhten Proliferation und nukleären FoxO1-Verlust in Muskelzellen pulmonaler Mikrogefäße .	63
3.3. Testung ob Paclitaxel, als anti-proliferativer FoxO1-Aktivator, vor einer gesteigerten Muskularisierung und <i>vaskulärem Remodelling</i> der Gefäße schützt.	65
3.3.1 FoxO1-Reaktivierung nach pharmakologischer Intervention durch Paclitaxel induziert die Umkehrung vaskulärer Umbauprozesse an den pulmonalen Mikrogefäßen in Nachkommen adipöser Muttertiere	65
3.4 Sekundäres Ziel	69

3.4.1 Inhibition epigenetischer Modifikationen des TFs FoxO1 als alternativer Reaktivierungsmechanismus eines hyperproliferativen Phänotyps in <i>murine lung epithelial cells</i> (MLE-12-Zellen).....	69
4. DISKUSSION	73
4.1 Metabolische Programmierung pulmonaler Mikrogefäße induziert PAH in den Nachkommen.....	73
4.2 IL6-Defizienz schützt vor FoxO1-Inaktivierung und verhindert ein vaskuläres Remodelling.....	76
4.3 Pharmakologische FoxO1-Reaktivierung durch Paclitaxel schützt vor einer metabolischen Programmierung pulmonaler Mikrogefäße und dem Risiko für PAH	78
4.4 Arbeitsmodell der PAH-induzierenden metabolischen Programmierung	79
4.5 Klinische Bedeutung	81
4.6 Ausblick.....	82
4.7 Limitationen.....	83
5. LITERATURVERZEICHNIS	86
6. ABKÜRZUNGEN	93
7. DANKSAGUNG	97