

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	7
2.1	Pulmonale Hypertonie des Menschen	7
2.1.1	Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	7
2.1.2	Epidemiologie und Prognose	10
2.1.3	Pathogenese	11
2.1.4	Pulmonale Hypertonie und linksventrikuläre Hypertrophie	13
2.1.5	Pulmonale Hypertonie und rechtsventrikuläre Hypertrophie	14
2.1.6	Klinik und Gruppeneinteilung	15
2.1.7	Therapie	16
2.2	Mausmodelle der pulmonalen Hypertonie	17
2.2.1	Chronische Hypoxieexposition	17
2.2.2	Sugen5416 und chronische Hypoxie	18
2.2.3	Monocrotalin	19
2.2.4	Wahl des Modells der chronischen Hypoxieexposition in der Maus	20
2.3	Transiente Rezeptor Potential Proteine	20
2.3.1	Die TRP Superfamilie	20
2.3.2	Die klassische TRP Subfamilie	22
2.3.3	Rolle von TRPC Kanälen bei PH	24
2.4	Ziel der vorliegenden Arbeit	24
3	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Geräte und Software	26
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	29
3.1.3	Chemikalien	30
3.1.4	Kits und Assays	33
3.1.5	Antikörper für Western Blot	34
3.1.6	Antikörper für Immunhistochemie	34
3.1.7	Enzyme und Standards	35
3.1.8	Primer	35
3.1.9	Puffer und Lösungen	37
3.1.10	Medien	39
3.1.11	Medienzusammensetzung	40
3.1.12	Mauslinien	40
3.1.13	Versuchstiere	41
3.1.14	Tierversuchsgenehmigungen	41
3.2	Methoden	42
3.2.1	Mausmodell: Chronische Hypoxieexposition	42
3.2.2	Echokardiographie	43
3.2.3	Hämodynamische Messung	44
3.2.4	Messung des Hämatokriten	45
3.2.5	Präparation der Lunge	45
3.2.6	Ermittlung der Herzgewichte	46
3.2.7	Immunhistochemische Färbung	46

3.2.8	<i>Picro-Sirius Red</i> Färbung.....	49
3.2.9	Isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Lunge	50
3.2.10	Myographie von isolierten Blutgefäßen.....	51
3.2.11	Isolierung und Kultivierung muriner pulmonaler arterieller glatter Muskelzellen.....	52
3.2.12	Proliferationsassay	53
3.2.13	Migrationsassay	54
3.2.14	Apoptoseassay	55
3.2.15	Calciummessungen.....	56
3.2.16	RNA Isolation.....	60
3.2.17	Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion	61
3.2.18	Relative Quantifizierung mittels Echtzeit PCR.....	61
3.2.19	Proteinextraktion	62
3.2.20	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	63
3.2.21	Trizin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	63
3.2.22	Western Blot	64
3.2.23	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	65
3.2.24	Statistik.....	67
4	Ergebnisse.....	68
4.1	Beschreibung der Linien TRPC WT und TRPC1/3/6 ^{-/-}	68
4.2	Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf die Entstehung einer chronischen Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie	69
4.2.1	Hämodynamische Messungen	69
4.2.2	Echokardiografische Messungen.....	71
4.2.3	Histologische Bestimmung des Muskularisierungsgrades der Lungengefäße	75
4.3	Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf PASMC nach chronischer Hypoxieexposition.....	76
4.3.1	Proliferation	76
4.3.2	Migration.....	77
4.3.3	Apoptose.....	78
4.3.4	Genexpression	79
4.3.5	Proteinexpression	81
4.4	Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf den Ca ²⁺ -Haushalt von PASMC nach chronischer Hypoxieexposition	85
4.4.1	Untersuchung des Rezeptor-vermittelten Ca ²⁺ -Einstroms.....	86
4.4.2	Untersuchung des Speicher-vermittelten Ca ²⁺ -Einstroms	88
4.4.3	Untersuchung regulatorischer Kompensationen des Rezeptor- und Speicher-vermittelten Ca ²⁺ -Einstroms.....	90
4.5	Einfluss von TRPC1, 3 und 6 auf physiologische Eigenschaften (Phänotyp).....	94
4.5.1	Hämodynamische Messungen	94
4.5.2	Echokardiografische Messungen.....	96
4.5.3	Histologische Bestimmung des Kollagengehalts des rechten und linken Ventrikels sowie der Lunge.....	98
4.5.4	Untersuchungen der Kontraktilität von Pulmonalarterie und Aorta	100
4.5.5	Genexpression	101
4.5.6	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	105
5	Diskussion	107
5.1	Wahl von TRPC1, 3 und 6 als Kandidat für die Entstehung von CHPH.....	107
5.2	Verwendete Modelle.....	109

5.2.1	Wahl des Tiermodells	109
5.2.2	Wahl des Zellkulturmodells	111
5.3	Bedeutung von TRPC1, 3 und 6 für die Entstehung einer CHPH.....	112
5.3.1	TRPC1, 3 und 6 <i>in vivo</i>	112
5.3.2	TRPC1, 3 und 6 <i>in vitro</i>	114
5.4	Einfluss des globalen Knockouts von TRPC1, 3 und 6 auf die Physiologie der Maus	123
5.4.1	Entstehung von rechts- und linksventrikulärer Hypertrophie.....	123
5.4.2	Einfluss auf den Kollagenhaushalt.....	127
5.5	Resümee und Ausblick	129
6	Zusammenfassung.....	131
7	Summary.....	133
8	Literaturverzeichnis.....	135
9	Abbildungsverzeichnis.....	153
10	Tabellenverzeichnis.....	155
11	Eidesstattliche Erklärung	156
12	Anhang	157
12.1	Isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Lunge.....	157
12.2	Veröffentlichungen	158
12.3	Kongressbeiträge.....	158
12.4	Förderung.....	159
13	Danksagung.....	160