

**Rolle des *four and-a-half LIM domain 1* (FHL-1) Proteins bei der
Entstehung der Rechtsherzhypertrophie im Mausmodell des
pulmonalarteriellen *bandings***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Neghabian, Dariusch

aus Bochum

Gießen 2019

Aus dem Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS) Gießen,

unter der Leitung von Prof. Dr. Werner Seeger,

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhild Euler

Tag der Disputation: 12.11.2019

Für meine Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Pulmonale Hypertonie	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Ätiologie und Klassifikation.....	1
1.1.3	Pathogenese.....	3
1.1.4	Klinik	4
1.1.5	Diagnostik	4
1.1.6	Therapie.....	5
1.1.7	Prognose.....	7
1.2	Cor pulmonale.....	7
1.2.1	Definition	7
1.2.2	Prävalenz	8
1.2.3	Klinik	8
1.2.4	Diagnostik	8
1.2.5	Therapie.....	9
1.2.6	Pathophysiologie.....	10
1.3	Das Modell des pulmonalarteriellen <i>bandings</i> bei Mäusen	17
1.4	Sensoren für biomechanischen Stress im Herzen	18
1.5	FHL-1 Protein.....	21
1.6	Wissenschaftliche Fragestellung der Arbeit.....	24
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Versuchstiere	26
2.2	Material	26
2.2.1	Geräte und Equipment	26
2.2.2	Chemikalien, Reagenzien, Antikörper	28
2.2.3	Software.....	31
2.3	Methoden	32
2.3.1	Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung.....	32
2.3.2	Pulmonalarteriell <i>banding</i> (PAB).....	33
2.3.3	Echokardiographie	34
2.3.4	Hämodynamische Messungen	34
2.3.5	Präparation der Herzen	35
2.3.6	Histologische und immunhistologische Untersuchungen	35

Inhaltsverzeichnis

2.3.7	Molekularbiologische Untersuchungen	41
2.3.8	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Echokardiographische Messungen.....	44
3.2	Hämodynamische Messungen	48
3.3	Histologische und immunhistologische Untersuchungen	54
3.3.1	Kollagenanteil	54
3.3.2	Kardiomyozyten-Größe	56
3.3.3	Kapillarisierung.....	58
3.4	Molekularbiologische Untersuchungen	62
4	Diskussion.....	70
4.1	Limitierungen und Generalisierbarkeit der Studie	70
4.2	Interpretation der Ergebnisse	73
4.2.1	Echokardiographische Parameter	73
4.2.2	Hämodynamische Parameter	74
4.2.3	Histologische Parameter	76
4.2.4	Molekularbiologische Parameter	78
4.3	Fazit	81
5	Zusammenfassung.....	83
6	Summary.....	84
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	85
8	Abkürzungsverzeichnis	86
9	Literaturverzeichnis	90
10	Publikationsverzeichnis	99
11	Erklärung zur Dissertation	100
12	Danksagung.....	101

1. Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

Die Zellen im menschlichen Körper benötigen für die Energiegewinnung Sauerstoff und produzieren dabei Kohlenstoffdioxid (1). Die Lunge sorgt dafür, dass das sauerstoffarme Blut wieder mit Sauerstoff angereichert und das überschüssige Kohlenstoffdioxid abgeatmet wird (1). Sie ist dabei Bestandteil des menschlichen Kreislaufsystems, welches sich in ein Hoch- und ein Niederdrucksystem einteilen lässt. Das Hochdrucksystem besteht dabei aus dem linken Ventrikel während der Systole und den Arterien und Arteriolen. Die Venen, die Lungenstrombahn, die beiden Vorhöfe sowie der linke Ventrikel während der Diastole gehören zum Niederdrucksystem (1). Kommt es zu einem dauerhaft erhöhten Blutdruck in der Lungenstrombahn, so spricht man von einer pulmonalen Hypertonie (PH). Knapp 1% der erwachsenen Weltbevölkerung leidet daran. Die Ursachen dafür sind sehr vielfältig und es ist wichtig diese zu unterscheiden und voneinander abzugrenzen, da die Therapien sehr unterschiedlich sein können (2).

1.1.1 Definition

Bei der PH liegt definitionsgemäß ein chronisch erhöhter Pulmonalarteriendruck in Ruhe vor. Der mittlere Pulmonalarteriendruck (mPAP) liegt dabei über 25 mmHg (Normalwert 14 ± 3 mmHg) und wird mittels Rechtsherzkatheter erfasst (3, 4).

1.1.2 Ätiologie und Klassifikation

Die PH ist eine multifaktorielle Erkrankung. Nach der Weltkonferenz der pulmonalen Hypertonie von Nizza 2013 wird sie in fünf Unterklassen eingeteilt (3):

Tabelle 1: Einteilung der pulmonalen Hypertonie nach der Konferenz von Nizza 2013

1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
 - 1.1. Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH)
 - 1.2. Hereditäre pulmonalarterielle Hypertonie (HPAH) (Genmutationen: BMPR2, ALK1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3)
 - 1.3. PAH assoziiert mit Medikamenten, Drogen, Toxinen
 - 1.4. Assoziierte pulmonalarterielle Hypertonie (APAH), bei:
 - 1.4.1. Kollagenosen

-
- 1.4.2. HIV-Infektion
 - 1.4.3. Portaler Hypertonie
 - 1.4.4. Angeborenen systemisch-pulmonalen Shunts
 - 1.4.5. Bilharziose
 - 1.5. Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose (PCH)
 - 1.6. Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
 2. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des linken Herzens
 - 2.1. Systolische Dysfunktion
 - 2.2. Diastolische Dysfunktion
 - 2.3. Herzklappenerkrankungen
 - 2.4. Angeborene/erworbene Obstruktion des Linksherz-Ausflusstrakts und angeborene Kardiomyopathien
 3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
 - 3.1. Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
 - 3.2. Interstitielle Lungenerkrankung
 - 3.3. Andere restriktiv und obstruktiv gemischte pulmonale Erkrankungen
 - 3.4. Schlafbezogene Atemstörungen
 - 3.5. Alveoläre Hypoventilationssyndrome
 - 3.6. Chronische Höhenkrankheit
 - 3.7. Entwicklungsstörungen
 4. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien (CTEPH)
 - 4.1. Typ 1: Thrombus im Hauptstamm
 - 4.2. Typ 2: Befall der Lappenarterien
 - 4.3. Typ 3 und 4: weiter distal gelegene Veränderungen der Lungenarterien
 5. Pulmonale Hypertonie mit unklarer und/oder multifaktorieller Genese
 - 5.1. Hämatologische Erkrankungen: Chronisch hämatolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
 - 5.2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhanszellenhistiozytose, Lymphangioliomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
 - 5.3. Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
 - 5.4. Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronischer Nierenausfall mit Dialyse, segmentale PH (3)

Zudem lassen sich die einzelnen Formen der PH anhand des pulmonal arteriellen Verschlussdruckes (PAWP) in prä-kapillär (PAWP \leq 15 mmHg, Gruppen 1, 3, 4, 5) und post-kapillär (PAWP $>$ 15 mmHg, Gruppe 2) einteilen (4).

Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH, Gruppe 1) hat in Deutschland eine Prävalenz von 25,9 pro eine Millionen Erwachsene und eine jährliche Inzidenz von 3,9 pro eine Millionen Erwachsene (2, 5). Ursache für eine hereditäre PAH ist in 60% der Fälle eine Mutation im BMPR2-Gen, welches unter anderem bei der Regulation von Wachstum und Apoptose eine wichtige Rolle spielt (6). Auch bei anderen Formen der PH konnte eine verringerte BMPR2-Expression beobachtet werden (6). Aber auch Drogen, wie Metamphetamin und Kokain, und Medikamente, wie die Appetitzügler Flenfluramin und Aminorex, können über Beeinflussung der Serotonin-Transporter zu einer PAH führen (6). Des Weiteren besitzen Patienten mit Bindegewebserkrankungen, angeborenen Herzfehlern, HIV-Infektion und portaler Hypertension ein erhöhtes Risiko eine PAH zu entwickeln (6).

Auch die Inzidenz der CTEPH (Gruppe 4) liegt in Deutschland bei knapp 4 von eine Millionen Erwachsenen pro Jahr (2, 7).

Die PH bei Erkrankungen des linken Herzens (Gruppe 2) ist mit rund 50% die häufigste Form der PH. Schätzungen gehen davon aus, dass in Deutschland bis zu 50.000 Erwachsene an einer schweren Form dieser PH leiden (2, 4).

Auch die Prävalenz der zweithäufigsten Form der PH, der PH bei Lungenerkrankungen (Gruppe 3), kann bislang nur abgeschätzt werden (2). Hier geht man von einer ähnlichen Prävalenz wie bei der PH bei Erkrankungen des linken Herzens aus (7). Die häufigsten pulmonalen Grunderkrankungen sind dabei die COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*), die Lungenfibrose und die CPFE (*combined pulmonary fibrosis and emphysema*) (2, 4).

1.1.3 Pathogenese

Allen Formen der PH ist gemeinsam, dass es im Laufe der Chronifizierung zu Umbauvorgängen, sog. *remodeling*-Prozessen, in den Widerstandsgefäßen der Lunge kommt, die zu Intimafibrosierung, Mediahypertrophie, Endothelwucherung und Obliterationen führen (3). Bislang konnten verschiedene pathologische Veränderungen identifiziert werden, die solche *remodeling*-Prozesse auslösen bzw. verstärken können (8). Darunter fallen die Hemmung spannungsabhängiger Kaliumkanäle, Mutationen im *bone morphogenic protein-rezeptor type 2* (BMPR2), die erhöhte Expression von

Endothelin, *tissue factor*, *fibroblast growth factor* (FGF) und *platelet-derived growth factor* (PDGF), eine Überaktivität des Serotonintransporters sowie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) und des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen (NFAT) (9). Des Weiteren treten häufig Thrombosen und Vasokonstriktionen auf. Insgesamt besteht ein Ungleichgewicht zwischen protektiven, vasodilatierenden Faktoren, wie zum Beispiel Prostacycline, NO und ANP, und aggressiven, vasokonstringierenden Faktoren, wie Thromboxan und Endothelin (3). Durch den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks muss der rechte Ventrikel in der Systole einen größeren Druck aufbauen, um den gestiegenen vaskulären Widerstand in der Lunge zu überwinden und das Herzzeitvolumen konstant zu halten. Die Fähigkeit des rechten Ventrikels, dieser Druckbelastung standzuhalten, ist der lebenslimitierende Faktor bei der PH (9).

1.1.4 Klinik

Die Symptomatik bei den Betroffenen ist zu Beginn meist nur relativ diskret und unspezifisch, was dazu führt, dass zwischen Beginn der Symptomatik und Diagnosestellung meist mehrere Monate bis Jahre liegen (2). Neben schneller Ermüdung, Abnahme der Leistungsfähigkeit und Belastungsdyspnoe kann es auch zu Sinustachykardien, Schwindel und Synkopen kommen. Auch Brustschmerzen (Angina pectoris) und Zyanose gehören zur Klinik der Erkrankten. Im Falle einer Dekompensation des rechten Herzens können sich Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz wie Halsvenenstauung, Ödeme, Stauungsleber und erhöhte BNP-Werte im Blut zeigen (3).

1.1.5 Diagnostik

Die Diagnostik spielt eine sehr wichtige Rolle, da je nach zugrundeliegender Ursache eine spezielle Therapie durchgeführt werden sollte und es sich bei der PH um eine progressive Erkrankung handelt (2).

Neben Anamnese und körperlicher Untersuchung spielen EKG, Laboruntersuchungen und vor allem die Echokardiographie wichtige Rollen in der Basisdiagnostik (2). So können bei der Auskultation des Herzens ein lauter 2. Herzton über der Pulmonalklappe und in der Elektrokardiographie (EKG) Zeichen der Rechtsherzhypertrophie auffällig sein (3). Auch erhöhte Werte von BNP bzw. NT-proBNP, als Marker für eine Herzinsuffizienz, können Hinweise für eine PH sein (2).

Große Bedeutung in der Basisdiagnostik hat die Echokardiographie. Dabei lassen sich gut Zeichen einer Rechtsherzbelastung in Form von Hypertrophie und Dilatation des rechten Ventrikels darstellen (2). Auch eine indirekte Messung des systolischen pulmonalarteriellen Druckes (sPAP) ist möglich (3).

Zeigen sich während der Basisdiagnostik Hinweise auf eine PH, so sollte bei Verdacht auf eine PAH oder CTEPH als nächstes eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung erfolgen, um die Verdachtsdiagnose zu bestätigen (10). Bei PAH sollte auch eine Vasoreagibilitäts-Testung erfolgen, um eine mögliche Sensibilität für eine Therapie mit hochdosierten Calcium-Antagonisten festzustellen. Bei PH in Folge von Linksherzkrankungen oder Lungenerkrankungen ist eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung nicht indiziert, da sich daraus keine therapeutischen Konsequenzen ergeben würden (2). Die Rechtsherzkatheter-Untersuchung ermöglicht unter anderem die Messung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks (mPAP), des pulmonalkapilläre Verschlussdruckes (Wedge-Druck) und des pulmonalvaskulären Widerstands (PVR), wodurch der Schweregrad der PH bestimmt werden kann. Schließlich dient die Rechtsherzkatheter-Untersuchung im weiteren Verlauf auch der Therapiekontrolle (3).

Nach Feststellung einer PH sollte auch eine Ventilations-Perfusions-Szintigraphie erfolgen, um eine CTEPH auszuschließen bzw. zu bestätigen (2). Sie ist momentan noch der CT-Angiografie überlegen (4).

1.1.6 Therapie

Die allgemeine Therapie richtet sich vor allem nach der zugrundeliegenden Ursache und dem Schweregrad der PH, sodass der Therapie der Grunderkrankung eine wichtige Rolle zuteilwird. Zur allgemeinen Therapie gehören zudem Physiotherapie und Reha-Maßnahmen, welche die Lebensqualität und Kreislauffunktion der Patienten verbessern können (2). Die Einteilung der Patienten in Risikogruppen erfolgt anhand der durch die verschiedenen Untersuchungen abgeschätzten 1-Jahres-Mortalität in niedrig (< 5%), intermediär (5-10%) und hoch (> 10%). Therapieziel ist das Erreichen bzw. der Erhalt eines niedrigen Risikos. (4)

Die Therapie der PAH erfolgt vor allem medikamentös. Momentan sind insgesamt 10 verschiedene Medikamente aus 5 verschiedenen Substanzklassen in Deutschland zugelassen. Die Wahl des Medikaments bzw. der Medikamenten-Kombination hängt unter anderem vom Schweregrad ab (2). So wird für Patienten mit niedrigem bis mittlerem Schweregrad eine Therapie mit Endothelinrezeptor-Antagonisten (ERA) und Phosphodiesterase-5 (PDE5)-Inhibitoren oder Stimulatoren der löslichen

Guanylatzyklase (sGC) empfohlen. Bei hohem Schweregrad kommt zusätzlich noch ein intravenös appliziertes Prostazyklin-Analogon hinzu (4). Wenn ein Patient bei der Rechtsherzkatheter-Untersuchung auf die Vasoreagibilitäts-Testung anspricht, kommen auch hochdosierte Calcium-Antagonisten als Therapieoption in Frage. Dies betrifft jedoch nur maximal 5% der Patienten mit PAH (2). Für Patienten, die nicht bzw. nicht mehr auf die medikamentöse Therapie ansprechen, steht zur Zeit nur noch die Lungentransplantation als Therapiemöglichkeit zur Verfügung (2). Neue Therapiemöglichkeiten, die momentan noch Gegenstand der Forschung sind, zielen auf die Beeinflussung der pulmonalen Angiogenese und beinhalten unter anderem auch Stammzelltransplantationen (6).

Bei der Therapie der PH in Folge von Linksherzerkrankungen und Lungenerkrankungen können die oben genannten Medikamente für die PAH nicht eingesetzt werden, da sie bei diesen Formen der PH bislang keine Verbesserung des Krankheitsverlaufs zeigten (2). Daher steht für diese Formen momentan nur eine allgemeine Therapie zur Verfügung. Diese kann im Falle einer zugrunde liegenden Linksherzerkrankung aus einer Nachlastsenkung und Volumenkontrolle bestehen oder im Falle einer ursächlichen Lungenerkrankung, wie beispielsweise die COPD, aus einer Langzeitsauerstofftherapie (LOT) (3, 4).

Bei der Therapie der CTEPH ist die pulmonale Endarteriektomie das Mittel der Wahl, welche momentan an drei Standorten in Deutschland durchgeführt werden kann (Bad Nauheim, Hannover und Homburg) (2). Jedoch bleibt im Anschluss bei ca. 20% der operierten Patienten eine behandlungsbedürftige PH. Bei diesen Patienten bzw. bei inoperablen Patienten können Therapien mit den Medikamenten, die bei der PAH zum Einsatz kommen, versucht werden. Allerdings besteht nur für Riociguat, einem Stimulator der löslichen Guanylatzyklase (sGC), eine Indikation für diese Form der PH (2). Auch eine Antikoagulation mit Cumarinen kann bei diesen Patienten lebensverlängernd sein (3). Eine neue interventionelle Möglichkeit besteht in der pulmonalen Ballonangioplastie, dessen Einsatz jedoch nur an den Spezialzentren durchgeführt werden sollte und dessen Erfolge noch evaluiert werden müssen (2).

Für die Therapie der PH mit unklarer und/oder multifaktorieller Genese gibt es bislang nur sehr wenige Studien zu den unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten, sodass hier momentan individuelle Therapieentscheidungen getroffen werden müssen. (11)

1.1.7 Prognose

Dank neuer Therapiemöglichkeiten hat sich die Überlebensdauer von Patienten mit PAH in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert. So stieg die 3-Jahres-Überlebensrate von 40% in den 1980er-Jahren auf aktuell 70-80%. Bei Patienten mit CTEPH liegt sie unter optimaler Therapie derzeit sogar bei rund 90%. (2)

Insgesamt ist die Prognose von verschiedenen Faktoren abhängig (12). Zum einen sprechen hohe mPAP-Werte für eine sehr schlechte Prognose. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem mPAP von über 50 mmHg nur noch 10% (3). Zum anderen bestimmen auch Ausmaß der Hypoxie und Schwere der pulmonalen Obstruktion die Überlebenszeit (3, 4).

Lebenslimitierender Faktor ist das Kompensationsvermögen des rechten Ventrikels, da die meisten Patienten letztlich in Folge einer Rechtsherzdekompensation an Rechtsherzversagen und den damit einhergehenden Rhythmusstörungen sterben (3, 13). Somit stellt die Verbesserung der Funktion des rechten Ventrikels einen wichtigen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer therapeutischer Maßnahmen dar (14). Ohne Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit weniger als 3 Jahre (3).

1.2 Cor pulmonale

1.2.1 Definition

Das Cor pulmonale beschreibt definitionsgemäß eine Hypertrophie und Dilatation des rechten Ventrikels aufgrund von erhöhten pulmonalen Blutdruckwerten, welche ausschließlich Folge einer Erkrankung der Lungengefäße und/oder des Lungenparenchyms sind (9, 15). Je nachdem wie akut die Druckbelastung entsteht, entwickelt sich ein akutes Cor pulmonale ohne Hypertrophie, z.B. bei einer massiven Lungenembolie, oder ein chronisches Cor pulmonale mit rechtsventrikulärer Hypertrophie, z.B. bei der pulmonalarteriellen Hypertonie (9).

Für die Rechtsherzinsuffizienz und das Rechtsherzversagen existieren bislang keine allgemein gültigen Definitionen. Man nimmt bei einem erhöhten Füllungsdruck (rechtsatrialer Mitteldruck > 9 mmHg) und/oder einem verminderten HZV (Herzindex $< 2,5$ l/min/m²) eine Herzinsuffizienz an (14). Von einem Rechtsherzversagen spricht man bei einem Herzindex kleiner als $1,5$ l/min/m² und einem rechtsatrialen Druck von über 18 mmHg (14).

1.2.2 Prävalenz

Die Prävalenz des Cor pulmonale ist relativ schwierig zu erfassen, da nicht jeder Patient mit einer chronischen Lungenerkrankung ein Cor pulmonale entwickelt und die Diagnostik bisher noch nicht sehr sensitiv ist (9). Dies sollte sich jedoch durch Fortschritte im Herzultraschall und bei der Bestimmung von Biomarkern im Blut (z.B. NT-proBNP als Marker für Herzinsuffizienz) in Zukunft verbessern (9).

In den USA sind circa 50% der Fälle eines Cor pulmonale auf die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und die chronische Bronchitis zurückzuführen (9, 15). Weitere Krankheiten, die Ursache eines Cor pulmonale sein können, sind unter anderem die pulmonalarterielle Hypertonie, die zystische Fibrose sowie thromboembolische und interstitielle Lungenerkrankungen (9). In einer Studie mit Patienten, die aufgrund einer sehr fortgeschrittenen Lungenerkrankung eine Lungentransplantation bekommen sollten, zeigten 66% eine deutliche rechtsventrikuläre Dysfunktion (16). Dabei war die Prävalenz einer rechtsventrikulären Dysfunktion bei Patienten mit pulmonalvaskulären Erkrankungen mit 94% am höchsten (16). Grundsätzlich kann jede Erkrankung, die die Lungengefäße und das Lungengewebe betrifft, zu einem Cor pulmonale führen (9).

1.2.3 Klinik

Die Symptomatik des Cor pulmonale ist relativ unspezifisch und kann Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz und einer pulmonalen Hypertonie umfassen (9). Neben Dyspnoe, Schwindel und Synkopen können bei den Betroffenen auch Brustschmerzen und Herzrhythmusstörungen auftreten (9, 15). Leistungsminderung, Zyanose und klinische Zeichen wie gestaute Halsvenen, Aszites und periphere Ödeme können Hinweise auf eine Rechtsherzinsuffizienz sein (17).

1.2.4 Diagnostik

Eine gute Diagnostik ist beim Cor pulmonale sehr wichtig, da später in der Therapie die Behandlung der Grunderkrankung von entscheidender Bedeutung ist (15). Als Hinweise auf ein Cor pulmonale können sich im EKG eine nach rechts verlagerte Herzachse, eine rechtsventrikuläre Hypertrophie sowie ein P-pulmonale zeigen, welches ein Zeichen für eine Druck- oder Volumenbelastung des rechten Vorhofes ist und mit einer schlechteren Prognose einhergeht (9, 18). Zur nicht-invasiven Beurteilung des rechten Herzens und dessen Funktion ist die Echokardiographie gut

geeignet (15). Dabei lassen sich die Wanddicken und Kammerdimensionen messen sowie die Funktion von Pulmonal- und Trikuspidalklappe beurteilen (9). Mittels Doppler-Verfahren können die TAPSE (*Tricuspid annular plane systolic excursion*) und der Tei-Index (*Myocardial performance index*) bestimmt werden, welche Aufschluss über die Funktion des rechten Ventrikels geben, und der pulmonalarterielle Druck kann indirekt gemessen werden (15, 19). Da es vor allem bei Erkrankungen des Lungenparenchyms schwierig sein kann, das rechte Herz echokardiographisch zu beurteilen, kann bei diesen Patienten alternativ ein Kardio-MRT sehr nützlich sein (9, 15). Im Thorax-Röntgen gibt die Vergrößerung von Truncus pulmonalis und Hilusgefäßen einen Hinweis auf eine pulmonale Hypertonie als Grunderkrankung (9, 15). Die Spirometrie dient zur Unterscheidung zwischen obstruktiven und restriktiven Ventilationsstörungen (9). Mittels Blutgasanalyse können Hypoxie und/oder Hyperkapnie erkannt werden (9). Zudem ist BNP, welches bei einer übermäßigen Belastung des Herzens von den Ventrikeln sezerniert wird, als Marker für eine rechtsventrikuläre Dysfunktion geeignet und kann als Prognosefaktor verwendet werden (20). Die Computertomographie dient schließlich zum Nachweis von thromboembolischen und interstitiellen Lungenerkrankungen (9). Im Falle einer chronischen Thromboembolie kann auch die Ventilations-Perfusions-Szintigraphie sehr nützlich sein (9). Der Rechtsherzkatheter dient zum Nachweis einer pulmonalen Hypertonie sowie zum Ausschluss eines erhöhten linksventrikulären Drucks (9). Insgesamt lassen sich auf diese Weise die Funktionsverhältnisse und Arbeitsbedingungen des rechten Ventrikels gut darstellen (14). Interessante Erkenntnisse liefert auch die Magnetresonanztomographie, mit der sich gut die Energieumsetzung im Myokard beobachten lässt (21). Sie könnte in Zukunft auch bei der Diagnostik einer Rechtsherzinsuffizienz und zur Therapiekontrolle eingesetzt werden (21).

1.2.5 Therapie

Bei der Therapie des akuten Cor pulmonale steht die Behandlung der Ursache im Vordergrund, welche beispielsweise bei einer Lungenembolie eine Thrombolyse sein kann (15). Aber auch beim chronischen Cor pulmonale steht bislang noch die Therapie der Grunderkrankung im Fokus (9). Durch nichtinvasive Beatmung, Bronchodilatoren und Glukokortikoide soll die Atemarbeit vermindert werden (9). Zudem sind eine adäquate Oxygenierung und Infektionsbehandlung sowie die Vermeidung einer respiratorischen Azidose wichtig (9, 15). Diuretika können zur Verminderung der

Ödeme eingesetzt werden (9, 15). Des Weiteren finden Renin-Inhibitoren, ACE-Hemmer und Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten in der Therapie Verwendung, da sie die Angiotensin II-Bildung und –Wirkung hemmen und dadurch unter Umständen eine Regression der Hypertrophie bewirken (22). Die momentan verwendeten therapeutischen Mittel bewirken vor allem eine Vasodilatation der pulmonalen Gefäße und haben relativ wenig rechtsherzspezifische Effekte (23). So können zwar der pulmonalvaskuläre Widerstand verringert und das Schlagvolumen erhöht werden, jedoch wird die Kontraktilität des rechten Ventrikels nicht verbessert (24). Momentan fehlen noch genaue Studien zur Wirksamkeit der oben genannten Medikamente bei der Rechtsherzinsuffizienz (21). Die Therapie der Linksherzinsuffizienz kann nämlich nicht ohne weiteres auf die der Rechtsherzinsuffizienz übertragen werden, da rechter und linker Ventrikel embryonale und molekulare Unterschiede vorweisen (17). Es sollte daher nach spezifischen Therapien für das rechte Herz gesucht werden (17). Eine geeignete Therapie zu finden, welche sowohl den pulmonalen Widerstand senkt als auch die rechtsventrikuläre Funktion steigert, ist jedoch sehr schwierig, da dafür zum Teil gegensätzliche Effekte erzielt werden müssen (25). So sollte einerseits die Kontraktilität der Kardiomyozyten gesteigert, andererseits die Relaxation der glatten Muskelzellen der pulmonalen Gefäße gefördert werden (25). Auch in Hinblick auf Angiogenese und Apoptose unterscheiden sich die Ziele im jeweiligen Gewebe (25). Daher ist es von großer Bedeutung gewebsspezifische Therapien zu entwickeln. Bislang konnten vielversprechende Ergebnisse durch Substanzen erreicht werden, die über die Mitochondrien den Metabolismus beeinflussen, wie beispielsweise Dichloracetat (26, 27). Auch der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor α/β (PPAR α/β) Agonist GW0742 zeigte in einer Studie mit PAB protektive und rechtsherzspezifische Effekte (28). Des Weiteren konnten auch für den PDE5-Inhibitor Sildenafil rechtsherzspezifische Effekte nachgewiesen werden, welche zu einer signifikanten Steigerung der Kontraktionskraft des rechten Ventrikels führten (29). Auch Stammzelltherapien und spezifische Gentherapien sind Gegenstand der Forschung (17).

1.2.6 Pathophysiologie

1.2.6.1 Anatomie der Herzmuskulatur

Das Herz macht in etwa 0,4-0,5% des Körpergewichts aus, was bei Frauen in etwa 250-320 g und bei Männern 300-360 g entspricht (30). Die Wand des linken Ventrikels ist ca. 1,3-1,5 cm dick, die des rechten Ventrikels hingegen nur 0,3-0,5 cm, was auf die

sehr unterschiedliche Druckbelastung zurückzuführen ist (30). Dabei besitzt der linke Ventrikel im Querschnitt eine ellipsoide Form, hingegen der rechte Ventrikel eher sichelförmig konfiguriert ist (15). Auch in Hinblick auf die Kardiogenese unterscheiden sich rechter und linker Ventrikel (31, 32). So bilden sich der linke Ventrikel und die Vorhöfe aus dem vom anteriolateralen Mesoderm stammenden primären Herzfeld (PHF). Hingegen entstehen der rechte Ventrikel, der Ausflusstrakt sowie Teile des Einflusstraktes aus dem sekundären Herzfeld (SHF), das sich aus den Zellen des pharyngealen und splanchnischen Mesoderms ableitet (33, 34). Dies hat zur Folge, dass die Genexpression und die Signalwege in den jeweiligen Ventrikeln unterschiedlich sein können (32, 34, 35).

Die Herzmuskulatur wird durch die Kardiomyozyten gebildet, welche vor allem im linken Ventrikel spiralförmig angeordnet sind, um eine koordinierte Kontraktion, beginnend von der Herzspitze zur Herzbasis, zu gewährleisten (30). Im rechten Ventrikel ist diese Anordnung jedoch nicht so streng und etwas mehr aufgelockert (30). Kardiomyozyten sind einkernige Zellen mit einer Länge von ca. 100 μm und einem Durchmesser von etwa 15 μm (1). Neben einem zentral gelegenen Zellkern besitzen sie viele Mitochondrien, mit denen sie hauptsächlich durch oxidative Phosphorylierung Energie gewinnen (30). Diese besondere Abhängigkeit von Sauerstoff macht sie relativ anfällig für Ischämien, sodass bei Sauerstoffmangel, beispielsweise durch einen Myokardinfarkt oder sehr starke Hypertrophie, viele Zellen zugrunde gehen können (30). Die Herzmuskelzellen sind untereinander über Gap Junctions und Zonulae adherentes miteinander verbunden und bilden so eine funktionelle Einheit (1). Die in den Kardiomyozyten enthaltenen Myofibrillen setzen sich aus Sarkomeren zusammen und zeigen, ähnlich wie die Skelettmuskulatur, aufgrund ihrer regelmäßigen Anordnung eine Querstreifung (siehe Abb.1) (1). In den Sarkomeren bilden die dicken Myosinfilamente und die dünnen Aktinfilamente ein hexagonales Gitter, bei

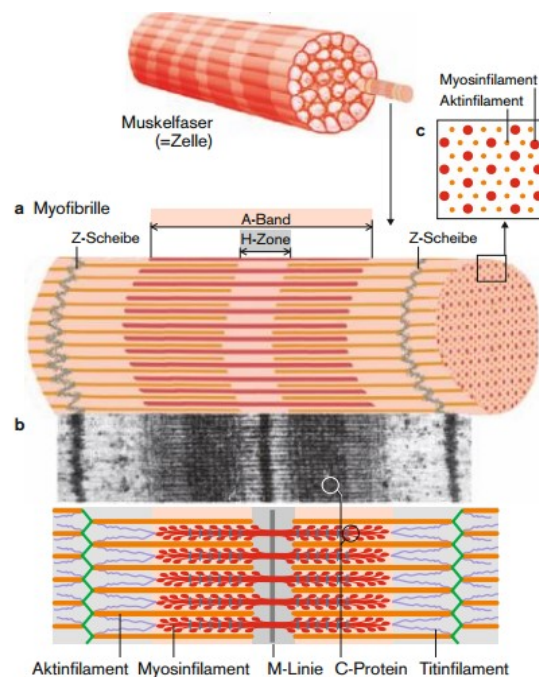


Abbildung 1: Aufbau der quergestreiften Muskulatur (1)

dem jedes Myosinfilament von sechs Aktinfilamenten und jedes Aktinfilament von drei Myosinfilamenten umgeben ist. Somit ergibt sich ein Verhältnis von Aktin zu Myosin von 2:1. Ein Sarkomer beschreibt den Abschnitt zwischen zwei Z-Scheiben. Diese setzen sich hauptsächlich aus α -Aktinin zusammen. Die helle, isotrope Zone um die Z-Scheibe herum, in der nur die dünnen Aktinfilamente vorliegen, wird als I-Bande bezeichnet. An sie schließt sich die dunkle, anisotrope A-Bande an, welche durch die dichte und parallele Anordnung von dicken Myosin- und dünnen Aktinfilamenten zustande kommt. Darauf folgt die H-Zone, in der sich keine Anteile der dünnen Aktinfilamente mehr befinden. Die M-Linie befindet sich in der Mitte des Sarkomers und bildet quasi eine Spielgellinie (1, 36). Die Myosinfilamente sind über Myomesin an die M-Linie gebunden und über Titin an der Z-Scheibe befestigt (1).

Das Titin-Molekül erstreckt sich über die gesamte Distanz zwischen Z-Scheibe und M-Linie und ist mit einem Molekulargewicht von 3000-3800 kDa das größte bekannte Molekül (37). Das Titin-Molekül setzt sich größtenteils aus immunglobulin- und fibronektinartigen Modulen zusammen und enthält eine Kinasedomäne (36, 38). Die Titinfilamente sind vor allem für die passive Kraftentwicklung verantwortlich, da sie sehr elastisch sind und somit als eine Art „molekulare Feder“ dienen (1). Die Dehnbarkeit des Titin-Moleküls wird dabei durch zwei verschiedene Mechanismen reguliert: Zum einen können durch Splicen verschiedene Isoformen des Titin-Moleküls entstehen, welche jeweils eine unterschiedliche Dehnbarkeit besitzen, zum anderen haben Phosphorylierungen, welche vor allem an der N2B-Region durch cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen erfolgen, direkten Einfluss auf die Dehnbarkeit (39).

Die dünnen Aktinfilamente bestehen aus ca. 400 globulären Aktinmonomeren (G-Aktin), die sich zu einer Doppelstrang-Helix anordnen und so das filamentäre Aktin (F-Aktin) bilden. Daran assoziieren Tropomyosin und Troponinkomplexe, bestehend aus Troponin T, C und I, welche für die Kontraktion sehr wichtig sind. Einerseits bindet das Aktinfilament an das α -Aktinin der Z-Scheibe, andererseits ist es über Dystrophindimere an Sarkoglykane im Sarkolemm verankert, welche über Merosin mit den Kollagenfasern der extrazellulären Matrix in Verbindung stehen (1).

Insgesamt sind die Proteine im Sarkomer der Herzmuskelzelle denen in der Skelettmuskelzelle sehr ähnlich. Jedoch gibt es viele herzspezifische Isoformen, welche zum Teil Produkte anderer Gene als beim Skelettmuskel sind (1). Ein Beispiel dafür ist das Titinmolekül, welches in der Herzmuskelzelle eine andere Struktur besitzt und dadurch weniger dehnbar ist (1). Auch das Troponin C, welches in der Herzmuskelzelle eine Ca^{2+} -Bindungsstelle weniger besitzt und das Troponin I, das eine

zusätzliche Phosphorylierungsstelle vorweist, unterscheiden sich im Vergleich zur Skelettmuskelzelle (1).

Bislang geht man davon aus, dass sich die Kardiomyozyten nicht mehr replizieren können und das Herz somit keine Möglichkeit zur Regeneration besitzt (30). Jedoch konnten neue Forschungen zeigen, dass sich in Herzen von Säugetieren durchaus Stamm- und Vorläuferzellen finden lassen, deren Häufigkeit jedoch im Ventrikel sehr gering ist (ca. 1 von 100.000 Zellen; im Gegensatz zum Atrium: 5-10% der Zellen). Zudem ist die Proliferationsrate von Herzstammzellen sehr gering und nimmt mit dem Alter immer weiter ab (mit 50 Jahren sind erst etwa 45% der Kardiomyozyten erneuert), sodass sie nicht ausreicht, durch Infarkte geschädigte Areale wiederherzustellen (30). Dennoch könnten sich durch Stimulation oder Transplantation dieser Stammzellen in Zukunft neue Behandlungsmethoden entwickeln.

1.2.6.2 Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz

Der rechte Ventrikel verbraucht aufgrund des unter physiologischen Bedingungen niedrigen pulmonalvaskulären Widerstands für das gleiche Schlagvolumen nur ca. 25% der Energie des linken Ventrikels (40). Er kann sich aufgrund seiner dünnen und elastischen Wand gut an Volumenveränderungen anpassen. Jedoch ist die Kompensationsfähigkeit bei Druckbelastung schlechter als im Vergleich zum linken Ventrikel und führt relativ schnell zu einer Insuffizienz (9). Bisher stand vor allem der linke Ventrikel im Mittelpunkt der Forschung und es ist immer noch relativ wenig über die molekularen Abläufe im rechten Ventrikel bekannt (17). Aufgrund der unterschiedlichen embryonalen Entwicklung lassen sich jedoch die Erkenntnisse des linken Ventrikels nicht ohne weiteres auf den rechten Ventrikel übertragen (17, 33). So wurden bei der Untersuchung der Genexpression bei Hypertrophie des rechten Ventrikels Unterschiede zum linken Ventrikel deutlich (33, 41, 42). Bei Druckbelastung durch transverse aortale Konstriktion (TAC) bzw. durch ein pulmonalarteriell *banding* (PAB) zeigte der rechte Ventrikel im Vergleich zum linken Ventrikel eine deutlich ausgeprägtere Veränderung in der Genexpression. Einige Membranproteine und Enzyme wurden im hypertrophierten RV stärker exprimiert als bei der Linksherzhypertrophie (43). So unterscheiden sie sich beispielsweise in der zellulären Antwort auf BNP und in der im rechten Ventrikel stärkeren Aktivierung des Wnt-Signalwegs, welcher die Transkription verschiedener Gene reguliert (17). So konnte festgestellt werden, dass eine Langzeitbehandlung mit Norepinephrin zu einer Hypertrophie des linken Ventrikels, aber nicht zu einer des rechten Ventrikels, führt

(44). Auch auf α 1-adrenerge Agonisten reagieren beide Ventrikel unterschiedlich: Im linken Ventrikel wird durch sie die Kontraktionskraft gesteigert, hingegen sie im rechten Ventrikel gesenkt wird (45). Der rechte Ventrikel reagiert aufgrund seiner dünneren Wand deutlich schneller mit Hypertrophie auf eine Druckbelastung als der linke Ventrikel (17). Hingegen kommt es dabei im rechten Ventrikel zu einer geringeren Fibrosierung (17). Dies hat zur Folge, dass sich der rechte Ventrikel bei Nachlastsenkung wieder relativ schnell regenerieren kann (33). Dies konnte schon bei Patienten nach einer Lungentransplantation in Folge einer pulmonalarteriellen Hypertonie beobachtet werden (46). So ließ sich bei einigen Patienten eine Herztransplantation vermeiden, da sich der rechte Ventrikel im Zuge der normalisierten Druckverhältnisse schnell wieder erholen konnte (14, 33). Dies lässt darauf schließen, dass eine Nachlastsenkung ein wichtiges therapeutisches Ziel bei der Behandlung der Rechtsherzinsuffizienz darstellen könnte (14).

Die Kardiomyozyten verlieren in der neonatalen Phase die Fähigkeit zur Mitose und können daher nur mit Hypertrophie auf eine erhöhte Druckbelastung reagieren (22). Ziel ist es, durch die Hypertrophie der Herzmuskulatur die normale Herzfunktion aufrechtzuerhalten (22). Somit handelt es sich zunächst um eine sinnvolle physiologische Reaktion, welche bei der Herzentwicklung von großer Bedeutung ist. Auf lange Sicht kann jedoch eine übermäßige Hypertrophie zu Herzinsuffizienz führen und stellt somit einen Prädiktor für die Morbidität des Herzens dar (47).

Da das Herz annähernd als Kugel betrachtet werden kann, lassen sich die physikalischen Veränderungen gut mittels des Laplace-Gesetzes veranschaulichen:

$$K = \frac{P \times r}{2d}$$

K = Wandspannung; P = Ventrikeldruck; r = Ventrikelradius; d = Ventrikelwanddicke

Bei Druckbelastung (P) kommt es zu erhöhter Wandspannung (K), welche zu Hypertrophieprozessen führt (1). Die Ventrikelwand wird dicker (d), der Ventrikelradius (r) bleibt jedoch zunächst konstant, sodass die Wandspannung wieder abnimmt. Man spricht von konzentrischer Hypertrophie. Bei chronischer Druckbelastung kommt es jedoch nach gewisser Zeit auch zu Dilatation des Ventrikels und somit zur Erhöhung des Ventrikelradius (r), sodass die Wandspannung proportional zum Ventrikelradius weiter ansteigt. Man spricht von exzentrischer Hypertrophie. Dilatiert das hypertrophierte Herz, so kommt es zu einer Dekompensation und es entwickelt sich eine Herzinsuffizienz. Der Wirkungsgrad des Herzens nimmt deutlich ab (1).

Die molekularbiologischen Prozesse, die der Hypertrophie zugrunde liegen, sind bislang für den rechten Ventrikel nur unzureichend erforscht (33). Es konnte gezeigt werden, dass Integrine und dehnungsabhängige Ionenkanäle die erhöhte Wandspannung wahrnehmen und in chemische Signale umwandeln (25). Vermutlich wird dabei die Phospholipase C aktiviert, sodass die Konzentrationen der *second messenger* Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) ansteigen (22). Diese könnten unter anderem zwei Dinge bewirken: Zum einen könnten sie die Proteinkinase C aktivieren, welche Proteine phosphoryliert und letztlich zu einer Expression der Protoonkogene c-FOS, c-JUN, c-MYC und EGR1 führt (30). Zum anderen könnten sie durch Aktivierung der MAP2-Kinase die Proteinsynthese in der Zelle erhöhen (22). Eine weitere wichtige Einflussgröße bei der Entstehung der Hypertrophie sind wahrscheinlich neurohumorale Faktoren wie Noradrenalin, Angiotensin II und Endothelin-1 (38). So wirkt Endothelin-1 im Herzen inotrop und führt zu Hypertrophie der Kardiomyozyten, indem es vor allem durch eine parallele Anordnung von neuen Sarkomeren die Breite der Kardiomyozyten erhöht (48). Insbesondere Endothelin-Rezeptor-Typ A-Antagonisten verbesserten in Studien mit Monocrotalin-behandelten Ratten, einem Versuchsmodell der pulmonalen Hypertonie, die Überlebensrate und verminderten den rechtsventrikulären Druck sowie das ventrikuläre *remodeling* (21). Auch die natriuretischen Peptide spielen eine wichtige Rolle (49). Vor allem BNP und NT-proBNP sind sehr gut als Biomarker der rechtsventrikulären Funktion geeignet (21). ANP und BNP werden von Kardiomyozyten des Atriums und des Ventrikels sezerniert. Die Sekretion wird durch die erhöhte Wanddehnung bei Volumen- oder Druckbelastung getriggert (50). ANP und BNP sind pulmonale Vasodilatoren und verringern die Hypertrophie und Fibrose im Myokard (51). Zudem verbessert BNP die Endothelfunktion und reguliert die Gerinnung und Fibrinolyse (21). Somit ergeben sich neue Therapieziele, z.B. indem die Aktivität von BNP gesteigert oder dessen Abbau gehemmt wird (21).

Im Laufe der adaptiven Hypertrophie kann es jedoch auch zur Entwicklung einer maladaptiven Hypertrophie mit Dilatation kommen, die zu einer Rechtsherzinsuffizienz und Rechtsherzversagen führen kann (25). In einem Modell mit Monocrotalin-behandelten Ratten konnte gezeigt werden, dass adaptive Hypertrophie nicht zwingenderweise einer maladaptiven Hypertrophie vorausgehen muss (52). Ist z.B. die Nachlasterhöhung zu hoch und akut, stellt sich direkt eine maladaptive Hypertrophie mit schnellem Übergang zu einer Rechtsherzinsuffizienz ein (53). Die Mechanismen, die von einer adaptive Hypertrophie zu einer maladaptiven Hypertrophie mit Dilatation

führen, sind noch nicht ausreichend erforscht. Bislang geht man davon aus, dass neurohumorale Faktoren, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS), inflammatorische Prozesse sowie die Apoptose der Kardiomyozyten dabei eine wichtige Rolle spielen (25). Es konnte gezeigt werden, dass bei sich Nachlasterhöhung das Muster der Gen-Expression in den Kardiomyozyten des rechten Ventrikels so verändert, dass es dem während der embryonalen Entwicklung ähnelt (54). Man spricht von einer sogenannten Aktivierung des fetalen Genprogramms (30). Dabei kommt es unter anderem zu einem Wechsel von der α -Myosin *heavy chain* (α -MHC) mit schneller ATPase-Aktivität zu der β -MHC mit langsamer ATPase-Aktivität, wodurch langfristig der Energieverbrauch der Zelle gesenkt werden soll (17, 25, 55, 56). Auch in Hinblick auf die Expression anderer Gene und Proteine, wie beispielsweise VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), sind Veränderungen beim Übergang in die Insuffizienz festgestellt worden (33). Dabei zeigte sich vor allem eine verringerte IGF-1-Expression bei gleichzeitig erhöhter Angiotensin II-Expression (48). Des Weiteren wird durch die Umstellung des Metabolismus von Fettsäureoxidation auf Glykolyse und die Verminderung der Mitochondrienaktivität der Energie- und Sauerstoffverbrauch verringert (17, 57). Des Weiteren nimmt die Anzahl an α -Skelettmuskelaktin und α -Glattmuskelaktin im Gegensatz zum α -Herzmuskelaktin zu (58). Die daraus entstehenden Folgen sind jedoch noch unklar (25). Eine wichtige Rolle spielen auch die Umbauprozesse in der extrazellulären Matrix, welche die diastolische und systolische Funktion sowie die Größe und Struktur des Ventrikels beeinflusst (25). Dabei kommt es zur vermehrten Ablagerung von Typ 3- und Typ 4-Kollagen anstelle des Typ 1-Kollagens und zur Expression von spezifischen Metalloproteinasen (MMP) (21). Diese MMPs bauen vermehrt die Querverbindungen zwischen den Kollagenfasern ab, sodass es im Rahmen der Hypertrophie auch zu einer Dilatation kommt (21). Die MMP-Aktivität wird unter anderem durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) gesteigert (21). Somit ergeben sich auch hier neue therapeutische Angriffsziele, beispielsweise in Form von MMP-Inhibitoren (21). Auch Mastzellen sollen Einfluss auf die MMP-Aktivität und die rechtsventrikuläre Umbauprozesse haben (59).

Ein weiterer wichtiger zur Dekompensation führender Faktor ist die Verschlechterung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Muskelzellen (1). Da bei der Hypertrophie die Kapillarenanzahl des Myokards relativ konstant bleibt und der Sauerstoffverbrauch der Kardiomyozyten hingegen durch die erhöhte Wandspannung deutlich ansteigt,

kommt es schnell zu ischämischen Situationen (1). Somit ist die Größenzunahme des Herzens limitiert und man spricht von einem kritischen Herzgewicht bei ca. 500g (1). Weitere Faktoren, die zur Herzinsuffizienz führen, sind die Abnahme der Koronarreserven und die fortschreitende interstitielle Fibrosierung mit Kollagenfasern (1). Die Perfusion des rechten Ventrikels ist stark von der Wandspannung und dem rechtsatrialen Druck abhängig (60). Die koronare Durchblutung im rechten Ventrikel erfolgt nicht wie im linken Ventrikel hauptsächlich in der Diastole, sondern kontinuierlich (14). Somit nimmt der koronare Blutfluss im rechten Ventrikel bei erhöhter Wandspannung deutlich ab und kann zu einer ischämischen Situation führen, die der Patient als Angina pectoris wahrnimmt (14). Studien weisen darauf hin, dass vor allem die Perfusion der freien rechtsventrikulären Wand ein wesentlicher Faktor beim Rechtsherzversagen darstellt (14, 61). Das Risiko für ischämische Herzkrankheiten steigt also durch die Veränderungen im Zuge der Hypertrophie und Dilatation deutlich an (22). Auch das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien wird durch die zunehmende Heterogenität des Herzmuskelgewebes begünstigt (22). In Folge der Dilatation kann es auch zu einer Trikuspidalinsuffizienz kommen, welche die Ventrikelfunktion zusätzlich stark beeinträchtigt (17). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein dilatierter und hypertrophierter rechter Ventrikel auch die Funktion des linken Ventrikels beeinflusst, indem durch Verlagerung des Interventrikularseptums auf die linke Seite dessen Füllung verschlechtert wird und es zu einer Asynchronie der beiden Ventrikel mit reduzierter Auswurfleistung kommt. (40, 62–64).

1.3 Das Modell des pulmonalarteriellen *bandings* bei Mäusen

Mausmodelle spielen eine wichtige Rolle dabei, menschliche Krankheiten zu imitieren, um deren Krankheitsmechanismen zu erforschen und besser zu verstehen. Die Verwendung von Mäusen als Versuchstiere hat dabei viele Vorteile: Zum einen haben sie eine kurze Tragezeit von nur 21 Tagen mit einer hohen Wurfgröße, zum anderen sind ihre Haltungskosten relativ gering. Zusätzlich besitzen sie ähnliche Gene und Signalwege im Zusammenhang mit der Herz- und Gefäßentwicklung wie der Mensch, was die Übertragbarkeit von Forschungsergebnissen auf den Menschen verbessert (65).

Um die Auswirkungen einer Druckbelastung auf das rechte Herz, wie es im Rahmen des Cor pulmonale der Fall ist, zu untersuchen, eignet sich sehr gut das pulmonalarterielle *banding* (PAB). Auch zur Imitierung der angeborenen Pulmonalstenose, der Fallot'schen Tetralogie und dem Alagille-Syndrom wird diese

Modellform verwendet (65). Ein großer Vorteil des PAB ist, dass die direkten Auswirkungen der Nachlasterrhöhung auf das rechte Herz beobachtet werden können. Somit spielen Einflüsse des pulmonalen oder systemischen Kreislaufs, anders als womöglich bei Hypoxie- oder Monocrotalin-Modellen der pulmonalen Hypertonie, nur eine sehr geringe Rolle (43). In der Vergangenheit wurden chirurgische Verfahren bei kardiovaskulären Tiermodellen vor allem an größeren Tieren wie Hunden, Schweinen und Ratten durchgeführt. Doch die Fortschritte in der Mikrochirurgie und Bildgebung machten es möglich, diese Versuche auch an Mäusen anzuwenden. Bis heute gibt es deutlich mehr Studien zum linken Ventrikel als zum rechten Ventrikel. Auch die bei Studien zum linken Ventrikel häufig angewandte transverse aortale Konstriktion (TAC) ist im Vergleich zum PAB deutlich etablierter. Dies liegt unter anderem daran, dass die Prävalenz von Krankheiten, die zu Rechtsherzhypertrophie und Rechtsherzinsuffizienz führen, insgesamt geringer ist als die, die das linke Herz betreffen (65). Des Weiteren ist die Durchführung des pulmonalarteriellen *bandings* bei Mäusen nicht sehr einfach und erfordert große Erfahrung und gutes chirurgisches Equipment, sodass es nur in wenigen Laboren angewandt wird (66). Die Hauptherausforderungen während der Operation bestehen dabei in der extrem dünnen und fragilen Wand der Pulmonalarterie und der großen Empfindlichkeit des rechten Ventrikels gegenüber einer Nachlasterrhöhung durch das *banding* (65). Neu entwickelte Titan-Clips ermöglichen heutzutage eine definierte Kompression der Pulmonalarterien, sodass sich ein Obstruktionsgrad einstellen lässt, der nicht direkt zu einem Herzversagen führt, sondern zu einer Remodeling-Phase mit stabiler kardialer Funktion, wie sie auch zu Beginn bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen zu beobachten ist (43). Die Mäuse sterben also nicht direkt an akuter Dekompensation des rechten Herzens, sondern entwickeln zunächst die Folgen einer Rechtsherzinsuffizienz, wie periphere Ödeme, Leberstauung und Arrhythmien (43).

1.4 Sensoren für biomechanischen Stress im Herzen

Die Fähigkeit des Herzens, erhöhte Druck- und Volumenbelastung wahrzunehmen und sich daran anzupassen, ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Herzfunktion und die Versorgung des Körpers mit Sauerstoff (1). Es war lange unklar, wie die Herzmuskelzellen den erhöhten biomechanischen Stress durch Druck- oder Volumenbelastung registrieren und in Signalkaskaden, die zu Anpassungsvorgängen führen können, umwandeln. Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung solcher Anpassungsvorgänge sollen beispielsweise Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK)

spielen, deren Signalwege komplex miteinander verknüpft sind und noch weiterer Erforschung bedürfen (67). Die Forschung der letzten Jahre macht deutlich, dass es sich bei der Z-Scheibe nicht nur um ein mechanisches Gelenk handelt, sondern um eine proteinreiche funktionelle Struktur, die bislang noch wenig erforscht ist (68). Studien bei Menschen und Mäusen mit dilatativer Kardiomyopathie lassen vermuten, dass ein Teil des Dehnungssensors im Bereich der Z-Scheiben am Übergang zwischen Zytoskelett und Sarkomer liegt (69). An der Z-Scheibe sind unter anderem die Aktin- und Titinfilamente verankert. Hauptbestandteil ist das α -Aktinin, welches die benachbarten Sarkomere miteinander verbindet. Die Z-Scheibe spielt also eine besondere Rolle im Zusammenhang mit der Organisation und Struktur der Sarkomere und der Kontraktion und Kraftentwicklung der Muskulatur (70). Auch die fokalen Adhäsionskomplexe sollen biomechanischem Stress wahrnehmen können und bei erhöhter Druckbelastung zu einer Aktivierung von ERK 1/2-Signalwegen führen, dessen Auswirkungen auf den Ventrikel jedoch noch erforscht werden müssen (71, 72). Intermediärfilamente umgeben die Z-Scheiben und verbinden diese mit Desmosomen, fokalen Adhäsionskomplexen und dem Nukleus, sodass auch eine Verbindung zur Extrazellulärmatrix besteht (68). Des Weiteren sollen auch Ionenkanäle bei der Wahrnehmung von biomechanischem Stress eine Rolle spielen und diesen in chemische Signale umwandeln können (73).

Ein Protein, das im Zentrum der Forschung zum Sensor für biomechanischen Stress steht, ist das Titin. Titin ist das bisher größte bekannte Molekül mit einem Molekulargewicht von 3000-3800 kDa. Es setzt sich größtenteils aus Immunglobulin- und fibronektinartigen Modulen zusammen und enthält eine Kinasedomäne (38). Es dient als molekulare Springfeder und hält die Struktur von Aktin- und Myosinfilamente aufrecht. Zudem gibt es dem Herzmuskel seine passive Steifigkeit und ist dadurch ein wichtiger Faktor bei der diastolischen Funktion des Herzens (74). Das Titin ist auf einer Seite an der Z-Scheibe verankert und assoziiert dort mit dem dünnen Aktinfilament. Im weiteren Verlauf formt es sich in eine Art "elastische Feder" und überbrückt die Distanz bis zum dicken Myosinfilament, an das es sich anlagert. Von dort aus verläuft es weiter bis zur M-Linie, wo sein Ende an Myomesin bindet (38). Besonders die flexible I-Banden-Region des Titin-Moleküls, welche nahe der Z-Scheibe beginnt und bis zum Anfang der A-Bande reicht, scheint eine wichtige regulatorische Funktion zu besitzen (74). Sie besteht zum einen aus dem PEVK-Segment, welche sich aus wiederholenden Immunglobulin-Sequenzen zusammensetzt und reich an Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) ist und zum anderen aus der Herz-spezifischen

N2B-Sequenz (68, 74). Durch Splicen können unterschiedliche Isoformen der N2B-Sequenz entstehen, welche Einfluss auf die Elastizität des Titin-Moleküls haben (39). Studien konnten zeigen, dass das Titin-Molekül während der Fetal- und Neonatalzeit deutlich elastischer ist als beim Erwachsenen, sodass das Herz sein Verhalten während der diastolischen Füllung noch besser anpassen kann (74). Die Dehnbarkeit der Titin-Moleküle unterliegt zudem einer sehr dynamischen Regulation beispielsweise durch die Kalzium-Konzentration und durch die Protein-Kinase-A-Aktivität (PKA) (39, 74). Auch das FHL-1 Protein scheint zusammen mit dem MAPK-Signalweg (*mitogen-activated protein kinase*) einen Einfluss auf die N2B-Sequenz und somit auch auf die Compliance des Herzmuskels zu haben (75).

Neben Titin spielt auch das Kollagen in der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle bei der diastolischen Steifigkeit des Herzmuskels (74). Weitere Sensoren für biomechanischen Stress befinden sich zudem an den Kostameren, welche über Integrine eine Verbindung zur Extrazellulärmatrix (EZM) herstellen (68). Auch die Glanzstreifen, welche die Kardiomyozyten untereinander verbinden, können eine sensorische Funktion besitzen (68).

Insgesamt wird deutlich, dass die Wahrnehmung von biomechanischem Stress über mehrere Sensoren verläuft, bei denen das Titin-Molekül wohl die bedeutsamste Rolle spielt. Viele verschiedene Signalwege, ausgehend von Sarkolemm und EZM sowie den verschiedenen Abschnitten des Sarkomers, beeinflussen dabei die Dehnungsfähigkeit des Titins (76). Zudem weist die aktuelle Studienlage darauf hin, dass die Antwort auf biomechanischen Stress über viele verschiedene Signalwege verläuft, welche teilweise unabhängig voneinander sind (76). Somit besteht noch viel Forschungsbedarf, um die genauen Mechanismen der Sensorik auf biomechanischen Stress und die darauf folgenden Anpassungsvorgängen zu verstehen (68). Unklar bleibt auch, wie stark sich diese Prozesse in den einzelnen Geweben unterscheiden. Es bleibt beispielsweise ungewiss, ob die Vorgänge im linken Ventrikel identisch sind mit denen im rechten Ventrikel.

1.5 FHL-1 Protein

Das Protein, welches im Fokus der Forschung in dieser Dissertation steht, ist das *Four-and-a-half LIM domain protein 1* (FHL-1). Es gehört zur Gruppe der LIM-Proteine, welche unter anderem über Protein-Protein-Interaktionen für die Genregulation, die Tumorfornation und die Organisation des Zytoskeletts wichtig sind. Dabei

sind sie sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert (77, 78). Der Begriff „LIM“

ist ein Akronym und leitet sich von den drei Homöodomänen Lin-11, Isl-1 und Mec-3 von *Caenorhabditis elegans* ab, in denen sich die charakteristische Struktur, bestehenden aus Cystein-reichen Doppel-Zink-Finger-Domänen, wiederfinden lässt (78). Zudem konnte eine Konsensussequenz identifiziert werden, die in allen LIM-Domänen vorzufinden ist: $CX_2CX_{16-23}HX_2CX_2CX_2CX_{16-21}CX_2(C/H/D)$. Das „X“ steht dabei für jede mögliche Aminosäure, hingegen entsprechen „C“, „H“ und „D“ den Einbuchstabencodes für Cystein, Histidin und Asparaginsäure (77, 79). Abbildung 2 veranschaulicht den Aufbau der Doppel-Zink-Finger-Domäne mit der Konsensussequenz. Die LIM-Proteine werden nach ihrer Struktur in vier Gruppen eingeteilt. Die FHL-Proteine zählen dabei zur Gruppe 2, da sie aus mehr als 2 LIM-Domänen bestehen und viel Cystein enthalten (77, 79). Sie sollen unter anderem Einfluss auf die embryonale Entwicklung und auf Herzerkrankungen haben. So konnte ein Fehlen von LIM-Proteinen mit rechtsventrikulärer Kardiomyopathie in Zusammenhang gebracht werden. Die genauen Funktionen sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt (78).

Die Gruppe der FHL-Proteine umfasst bislang fünf verschiedene Proteine: FHL-1, FHL-2, FHL-3, FHL-4 und FHL-5 (ACT) (68). FHL-1, FHL-2 und FHL-3 werden vor allem in der quergestreiften Muskulatur und im Herzmuskel exprimiert. FHL-4 und FHL-5 kommen fast ausschließlich im Hoden vor (80). Die einzelnen FHL-Proteine unterscheiden sich hauptsächlich in der Länge der vierten LIM-Domäne. So umfasst diese beispielsweise bei FHL-1 56 Aminosäuren, bei FHL-2 hingegen nur 55 Aminosäuren (80). Die Expression der FHL-Proteine ändert sich im Verlauf der embryonalen Entwicklung. So zeigt sich bei embryonalen Mäusen eine ausgeprägte FHL-1-Expression in den Somiten, dem Neuralrohr, den Extremitätenanlagen und im Ausflusstrakt des Herzens (80). Nach Abschluss der embryonalen Entwicklung findet

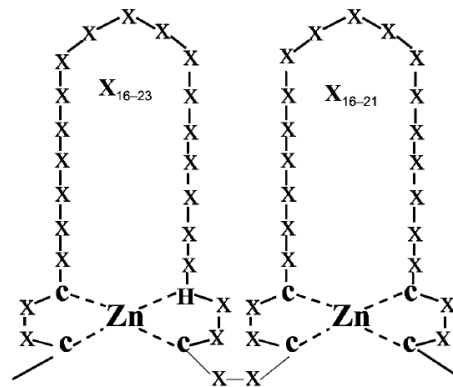


Abbildung 2: Doppel-Zink-Finger-Struktur der LIM-Proteine (77)

sich FHL-1 überwiegend im Skelettmuskel und im Herzen, wo es vor allem in den Septen und in der Nähe des atrioventrikulären Rings und zu geringeren Anteilen auch im Myokard nachzuweisen ist (78). Auch in der Lunge, den Nieren und im Gehirn des Menschen wird FHL-1 exprimiert (80).

Das FHL-1-Gen liegt auf dem menschlichen Chromosom Xq26 und besteht aus 8 Exons (81). Neben der Hauptisoform FHL-1A, können durch alternatives Splicen zwei weitere Isoformen entstehen: FHL-1B und FHL-1C. Diese sind vor allem durch das Vorhandensein einer RBP-Jκ-Bindungsregion (*Recombining binding protein for immunoglobulin kappa J region*) charakterisiert. Jedoch ist ihre genaue Funktion noch unklar (82–84). Bislang konnten mindestens 34 Mutationen im FHL-1-Gen ausfindig gemacht werden, die zu mindestens sechs Muskeldystrophien beim Menschen führen, welche oftmals auch mit Funktionseinschränkungen des Herzens einhergehen. Dazu zählen die X-chromosomale Scapuloperoneal Myopathie, die X-chromosomale Myopathie mit posturaler Muskelatrophie, die X-chromosomale Reducing-Body-Myopathie, die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, das X-chromosomale Emery-Dreifuss-ähnliche Syndrom und das Rigide Wirbelsäulen Syndrom (84–86).

Es konnten bisher für eine Vielzahl an Proteinen nachgewiesen werden, dass sie mit FHL-1 interagieren (84, 87). Auch in Hinblick auf die Funktion von FHL-1 in den verschiedenen Geweben konnten einige Erkenntnisse gewonnen werden. So wurde deutlich, dass es im Skelettmuskel für den Aufbau der Sarkomere und des Zytoskeletts wichtig ist (88, 89). Auch im Rahmen der Skelettmuskelhypertrophie scheint es eine regulierende Rolle zu besitzen (90, 91). Dabei konnten Interaktionen mit MyPB-C und dem NFATc1-Signalweg nachgewiesen werden, welche für die Anordnung der Sarkomere und die Regulation der Muskelkraft und -masse eine regulatorische Funktion besitzen (88, 90, 92). Des Weiteren wird FHL-1 auch im Zytoplasma der glatten Muskelzellen der pulmonalarteriellen Gefäße exprimiert (78). In verschiedenen Modellen der pulmonalen Hypertonie, darunter auch bei der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH), konnte eine deutliche Hochregulierung von FHL-1 in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien gezeigt werden. Die Hypoxie-abhängige FHL-1-Expression wurde dabei durch den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) reguliert. Des Weiteren hatte FHL-1 Einfluss auf die Zellproliferation und -migration (93). Interessant ist auch der Nachweis einer Verminderung der FHL-1-Expression bei verschiedenen Karzinomtypen des Menschen (84). Die Forschung zur Funktion von FHL-1 im Herzen beschränkte sich bis dato hauptsächlich auf das linke Herz. Es konnte gezeigt werden, dass es bei hypertrophierten menschlichen Herzen zu einer

starken Überexpression von FHL-1 kommt (47, 78). Die Expressionswerte von FHL-2 und FHL-3 zeigten jedoch keine Veränderungen, sodass man vermutet, dass insbesondere FHL-1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Herzhypertrophie spielt (80). Auch der Nachweis von Mutationen im FHL-1-Gen, die beim Menschen zu hypertropher Kardiomyopathie (HCM) führen können, verstärken diese Hypothese (94, 95). Zudem konnten erhöhte Expressionswerte von FHL-1 in menschlichen Herzen bei HCM nachgewiesen werden (96, 97). Eine Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren führte in Studien zu einer Hochregulation der Expression von FHL-1, welche durch Gabe von β -adrenergen Rezeptor-Antagonisten wieder gesenkt werden konnte (98). Das FHL-1-Protein scheint vor allem bei der durch biomechanischen Stress induzierten Hypertrophie eine regulierende Funktion zu besitzen (99). Im Mausmodell der transversen aortalen Konstriktion (TAC), welche zu einer chronischen Nachlasterrhöhung des linken Ventrikel führt, zeigten die FHL-1-Knockout-Mäuse eine geringere ventrikuläre Hypertrophie und eine besseren Herzfunktion im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (78, 99). Dabei konnte gezeigt werden, dass FHL-1 unter anderem mit der N2B-Region des Titins einen Komplex bildet und Teil der G α q-MAPK-Kaskade ist, welche bei der Übertragung von Hypertrophie-induzierenden Signalen bei der Kardiomyopathie eine wichtige Rolle spielt (78, 99). Auch eine Aktivierung des Raf-1/MEK/ERK-Signalwegs und damit eine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung konnte nachgewiesen werden (75). Insgesamt scheint FHL-1 großen Einfluss auf die Dehnbarkeit der Sarkomere zu besitzen und Teil des Sensors für biomechanischen Stress in den Herzmuskelzellen zu sein (99). Weitere Proteine, mit denen FHL-1 im linken Ventrikel interagiert, sind die Adenylyl Cyclase 6, MyBP-C, die Lysin-spezifische Demethylase 4A, die Ubiquitin-spezifische Protease 15 und Talin1 (78, 100–104). Wie genau die einzelnen Signalwege, in die FHL-1 mit einbezogen ist, aufgebaut sind, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt und erfordert noch weitere Forschung. Auch ein Zusammenhang zwischen FHL-1 und den elektromechanischen Vorgängen im Herzen ist zu vermuten. So konnte bei Schweinen mit Vorhofflimmern eine erhöhte FHL-1-Expression nachgewiesen werden und auch bei Menschen mit FHL-1-assoziierten Krankheiten kommen Arrhythmieprobleme gehäuft vor (84). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass FHL-1 mit dem spannungsabhängigen Kaliumkanal KCNA5 im Vorhof interagiert. Dies lässt vermuten, dass FHL-1 auch bei der Entstehung von Arrhythmien eine Bedeutung spielen könnte (78, 105).

Die Rolle von FHL-1 im rechten Ventrikel ist im Gegensatz zum linken Ventrikel nur sehr wenig erforscht. Auch hier konnte im Zuge einer chronischen Druckbelastung eine

erhöhte Expression von FHL-1 nachgewiesen werden (43). Die Erkenntnisse über die Funktion von FHL-1 im linken Ventrikel lassen sich jedoch aufgrund der unterschiedlichen embryonalen Entwicklung nicht so einfach auf den rechten Ventrikel übertragen. In Anbetracht dessen besteht noch ein großer Forschungsbedarf, die Funktionen und Interaktionen von FHL-1 im rechten Ventrikel zu ermitteln, um so dessen Rolle bei der Entstehung der Hypertrophie einordnen zu können.

1.6 Wissenschaftliche Fragestellung der Arbeit

Wie eingangs beschrieben, ist die Kompensationsfähigkeit des rechten Ventrikels der lebenslimitierende Faktor bei der pulmonalen Hypertonie und dem Cor pulmonale (3). Bislang ist jedoch nur wenig über die spezifischen Signalwege und Anpassungsmechanismen im rechten Ventrikel bekannt, sodass momentan noch keine spezifischen Therapiemöglichkeiten für das rechte Herz zur Verfügung stehen.

Das FHL-1-Protein wird in den Herzmuskelzellen exprimiert und ist wichtig für deren Entwicklung und Funktion (78). Im Rahmen der Linksherzhypertrophie konnte eine erhöhte FHL-1-Expression nachgewiesen werden, und ein FHL-1-Knockout führte im Mausmodell der transversen aortalen Konstriktion (TAC) zu einer besseren Herzfunktion und geringerer Hypertrophie als im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (99). Dies lässt vermuten, dass FHL-1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Hypertrophie im Herzen besitzt. Inwieweit sich diese Funktion auch im rechten Ventrikel widerspiegelt, ist bislang noch unklar. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von FHL-1 im rechten Ventrikel genauer untersucht werden.

Um eine chronische Druckbelastung des rechten Ventrikels zu erzeugen, wie es bei der Pathogenese des Cor pulmonale der Fall ist, wird in dieser Arbeit das Modell des pulmonalarteriellen *bandings* angewandt. Als Modelltiere werden FHL-1-Knockout-Mäuse verwendet und als Kontrollgruppe dienen Wildtyp-Mäuse. Es wird vermutet, dass durch den FHL-1-Knockout die Hypertrophie-induzierenden Signalwege im rechten Ventrikel vermindert werden und die Herzen somit langfristig eine bessere Funktionalität aufweisen als die Kontrollgruppe. Um die Funktionalität und Struktur der Herzen beider Gruppen zu vergleichen, werden verschiedene Methoden angewendet, um aussagekräftige Parameter zu erheben:

- echokardiographische Untersuchung der Herzen zur Beurteilung der Funktionalität und Hypertrophie
- hämodynamische Messung der Funktionalität der Herzen

-
- histologische Untersuchungen der rechten Ventrikel in Hinblick auf Fibrosierung, Kardiomyozyten-Größe und -Anzahl und Kapillarisation
 - molekularbiologische Bestimmung von Hypertrophie markern mittels qRT-PCR.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von FHL-1 bei der Hypertrophie-Entwicklung im rechten Ventrikel in Folge chronisch erhöhter Druckbelastung zu untersuchen. Darauf aufbauend könnten sich neue spezifische Therapieziele und Behandlungsmöglichkeiten für das Cor pulmonale entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden acht bis zehn Wochen alte männliche FHL-1-KO Mäuse (CrI: NIHBL(S)-FHL1tm) und Black Swiss Wildtyp-Mäuse (CrI: NIHBL(S)) verwendet. Die FHL-1-KO Mäuse sind phänotypisch unauffällig und zeigen ein normales Wachstums-, Putz- und Fressverhalten. Auch ihr Sensorium und Sozialverhalten ist ungestört. Sie wurden unter geeigneten Haltungsbedingungen in einem 12h/12h hell-dunkel Zyklus gehalten und bekamen standardisiertes Laborfutter *ad libitum* und freien Zugang zu Wasser.

Die Wildtyp-Mäuse stammen aus dem Jackson Laboratorium (Bar Harbour, ME, USA) und wurden im zentralen Tierlabor (Frankfurter Straße 105, 35392 Gießen) weiter gezüchtet. Die FHL-1-KO Mäuse wurden von Prof. Ju Chen (Department of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093, USA) zur Verfügung gestellt und im zentralen Tierlabor weiter verpaart.

Die Durchführung von wissenschaftlichen Versuchen an den Mäusen wurde vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt und ist unter folgendem Aktenzeichen zu finden:

GI 20/10 Nr. 39-2012 „Rechtsherzhypertrophie – Rolle von FHL-1“

2.2 Material

2.2.1 Geräte und Equipment

Gerät:	Produktname/-nummer:	Hersteller:
Mikroskop	CTR 6000	Leica Microsystems, Wetzlar
Digital Camera Microscope	DFC310 FX	Leica Microsystems, Wetzlar
Paraffinstreckbad (Wasserbad)	HI 1210	Leica Microsystems, Wetzlar
Paraffinstrecktisch (Wärmeplatte)	HI 1220	Leica Microsystems, Wetzlar

Motorisches Hochleistungsmikrotom	RM 2255	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlplatte	EG 1150 C	Leica Microsystems, Wetzlar
geschlossener Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat	ASP 300 S	Leica Microsystems, Wetzlar
Paraffinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems, Wetzlar
Wärmeschrank (37°C / 59°C)		Memmert GmbH & Co KG, Schwabach
Hettich® MIKRO 200/200R centrifuge	Z652121	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Heizblock (Dry Bath Incubator)	MD-01N	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Vortex Reax Control	541-11000-00	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
NanoDrop™ ND-1000-Spectrophotometer		Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tpersonal Thermocycler		Biometra GmbH, Göttingen
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	1855200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Labnet MPS 1000 Mini plate spinner	Z723533	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
PX1™ PCR Plate Sealer	1814000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MiniVent Type 845	73-0043	Hugo Sachs Elektronik KG, March
Clip-Applizierer	Hemoclip®	Edward Weck & Company Inc., Durham, NC, USA
Ultraschallgerät	Vevo 770 high-resolution Imaging Systems	VisualSonics Inc. Toronto, Ontario, Kanada
Schallkopf	30-MHz RMV-707B	VisualSonics Inc. Toronto, Ontario, Kanada
Katheter	High Fidelity 1,4F Mikromanometer	Millar Instruments, Houston, Texas, USA

Verbrauchsmaterial:	Produktname/-nummer:	Hersteller
Pipetten (1000 µl / 200 µl)		Gilson Incorporated, Middleton, WI, USA
Parafilm		Bemis Corporate, Neenah, WI, USA
Objektträger (25 x 75 x 1,0 mm)		R. Langenbrinck, Emmendingen

Deckgläser 24 x 36 mm		R. Langenbrinck, Emmendingen
Einmalhandschuhe TouchNTuff	92-600	Ansell, Richmond, Australien
Mikrotomklingen MX35 Premier (34°/80mm)		Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Paraffin-Einbettmedium Paraplast Plus	P3683-1KG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Filterpapier	304.207	Schleicher+Schüll GMBH, Dassel
Reagiergefäße 2 ml	72.695.400	Sarstedt AG & Co, Hemer
SuperPlate PCR Plate, 96- well	AB-2100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ABsolute qPCR Plate Seals	AB-1170	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Reagiergefäß 0,5ml Low Binding	72.704.600	Sarstedt AG & Co, Hemer
Titan-Clip	Hemoclip®	Edward Weck & Company Inc., Durham, NC, USA
Polypropylen-Naht	Prolene®	Ethicon Deutschland, Norderstedt

2.2.2 Chemikalien, Reagenzien, Antikörper

2.2.2.1 PAB-Operation, Echokardiographie, hämodynamische Messungen

Wirkstoff:	Handelsname:	Hersteller:
Buprenorphinhydrochlorid	Temgesic®	Essex Pharma GmbH, München
Isofluran	Forene®	Abbott, Wiesbach
Paraformaldehyd		Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken

2.2.2.2 Sirius-Red Färbung

	Produktnummer:	Hersteller:
Ethanol absolut (99,6%)	27690	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Ethanol 96%	27685	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Ethanol 70%	ETO-5000-70-1	SAV-Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn

Xylol rein (>98%)	9713.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure 100%	3738.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pertex	41-4012-00	Medite GmbH, Burgdorf
Siriusrot F3B	C.I. 35780	Niepötter Labortechnik, Bürstadt
Picrinsäure 1,0%	A2520,2500	AppliChem GmbH, Darmstadt
Salzsäure 1N	K025.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natronlauge 1N	1.091.371.000	Merck KGaA, Darmstadt

2.2.2.3 Kardiomyozyten-/Kapillaren-Färbung

	Produktnummer:	Hersteller:
Ethanol absolut (99,6%)	27690	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Ethanol 96%	27685	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Ethanol 70%	ETO-5000-70-1	SAV-Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn
Xylol rein (>98%)	9713.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rodent Decloaker (10x)	RD913M	Biocare Medical, Pacheco, CA, USA
Albumin bovine Fraction V		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (30%)	1.07210.1000	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol reinst (>99,8%)	32213-2.5L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Tris-Wash Buffer (20x)	ZUC052-500	Zytomed Systems, Berlin
Proteinase K (40x)	S2019	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Proteinase K Diluent	S2032	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Flouro Care Anti-Fade Mountant	FP001D	Biocare Medical, Pacheco, CA, USA
WGA-FITC	L4895-2MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

IB4-TRITC	L5264-2MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
DAPI	D9542-5MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

2.2.2.4 RNA-Isolation

	Produktnummer:	Hersteller:
RNeasy FFPE Kit	73504	QIAGEN GmbH, Hilden
Deparaffinization Solution	19093	QIAGEN GmbH, Hilden

2.2.2.5 qRT-PCR

	Produktnummer:	Hersteller:
iScript™ cDNA Synthesis Kit	1708890	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	1725120	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.2.2.6 Primerdesign und verwendete Primer

Die Primer wurden mittels Primer-BLAST des NCBI (National Center for Biotechnology Information) erstellt und bei der Firma Metabion International AG (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) bestellt. Da es durch die Fixierung und Einbettung der Ventrikel zu einer Degradation der RNA kommen kann, wurden Primer verwendet, welche ein PCR-Produkt von unter 100 bp amplifizieren. Des Weiteren wurden die Primer so designt, dass sie Intron-überspannend sind, um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern.

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer

Gen	Primersequenz	Produktgröße (bp)
mouseRyr2	F: 5'-CGAGCGTGTCTGGGTATAG-3'	97
	R: 5'-TTGAGGATGTTCCACCAGGC-3'	
mousePlb	F: 5'-ATACAGCTTCATGCTCTGCAC-3'	60
	R: 5'-TCTTCACCTGCTTCTGTCTTG-3'	

mouseAtp2a2	F: 5'-GCCTTTGTAGAGCCGTTTGT-3'	74
	R: 5'-TTTCTTTCCTGCCACACACC-3'	
mouseBnp	F: 5'-TATCTCAAGCTGCTTTGGGC-3'	77
	R: 5'-ACAACCTTCAGTGC GTTACAGC-3'	
mouseAnp	F: 5'-GCTTCCAGGCCATATTGGAG-3'	82
	R: 5'-GTCTAGCAGTTCTTCAAATCCA-3'	
mouseB2m	F: 5'-ATGCTATCCAGAAAACCCCTCA-3'	80
	R: 5'-GCAGTTCAGTATGTTCCGGCT-3'	
mouse α Mhc	F: 5'-TGTGGTGCCTCGTTCCA-3'	61
	R: 5'-TTTCGGAGGTA CTGGGCTG-3'	
mouse β Mhc	F: 5'-GCATTCTCCTGCTGTTTCCTT-3'	73
	R: 5'-TGGATTCTCAAACGTGTCTAGTGA-3'	
mouseCollagen1a1	F: 5'-CTGACGCATGGCCAAGAAGA-3'	88
	R: 5'-TACCTCGGGTTTCCACGTCT-3'	
mouseCollagen1a2	F: 5'-GCTTGCAGTAACTTCGTGCCT-3'	85
	R: 5'-CAGTGGGGCCCTTTCGTA CT-3'	
mouseCollagen3a1	F: 5'-AAAACCCTGCTCGGA ACTG-3'	96
	R: 5'-CTTGCAGCCTTG GTTAGGAT-3'	

Legende:

F = forward/left primer

R = revers/right primer

Bp = Basenpaare

Ryr2 = Ryanodine receptor 2

Plb = Phospholamban

Atp2a2 = Adenosine triphosphate, Ca⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 (Serca2)

Bnp = brain natriuretic peptide

Anp = atrial natriuretic peptide

B2m = beta2-microglobulin

 α Mhc = alpha myosine heavy chain β Mhc = beta myosine heavy chain

Collagen1a1 = collagen type 1 alpha1

Collagen1a2 = collagen type 1 alpha2

Collagen3a1 = collagen type 3 alpha1

2.2.3 Software

Leica QWin V3	Leica Microsystems, Wetzlar
STEPanizer © stereology tool	PD Dr. med. Tschanz, Uni Bern, Schweiz
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

Prism	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
PowerLab Data Acquisition Systems	AD Instruments, Spechbach
Labchart 7	AD Instruments, Spechbach

2.3 Methoden

2.3.1 Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung

Für die Versuche wurden FHL-1-KO-Mäuse und Wildtyp-Mäuse verwendet. Jeweils die Hälfte der Tiere jeder Genotyp-Gruppe (Wildtyp bzw. FHL-1-KO) erhielt entweder ein PAB oder wurde scheinoperiert (siehe Tabelle 3). Am Tag vor der Operation (Tag -1) wurde an allen Tieren eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt. Nach drei Tagen (Tag 2), nach einer (Tag 6), drei (Tag 20) oder fünf (Tag 34) Wochen *post operationem* wurden sie erneut echokardiographisch untersucht. Einen Tag später erfolgten in allen Gruppen die hämodynamischen Messungen sowie die Organentnahmen (siehe Abbildung 3). Das Ausmaß der Rechtsherzhypertrophie wurde mittels hämodynamischen Messungen an 10 der 15 Tiere jeder Gruppe gemessen. Aus jeder einzelnen Gruppe wurden jeweils fünf Herzen für molekularbiologische Untersuchungen, fünf Herzen für histologische Paraffinschnitte und fünf Herzen für histologische Kryoschnitte entnommen und vorbereitet.

Tabelle 3: Übersicht über die Gruppeneinteilung.

Mauslinie	PAB		Sham	
	FHL-1-KO	Wildtyp	FHL-1-KO	Wildtyp
3 Tage	n=15	n=15	n=15	n=15
1 Woche	n=15	n=15	n=15	n=15
3 Wochen	n=15	n=15	n=15	n=15
5 Wochen	n=15	n=15	n=15	n=15
Gesamtzahl der Mäuse: 240	n=60	n=60	n=60	n=60

Applizierer (Hemoclip®, Edward Weck, USA) auf ca. 0,3 mm Durchmesser, welches einem Stenosegrad von knapp 75% entspricht. Die Brusthöhle und Haut wurden durch eine 6-0 Polypropylen-Naht vernäht (Prolene®, Ethicon, Germany). Für die Kontrollgruppe erfolgte eine Sham-Operation, ohne die Pulmonalarterie zu verengen.

2.3.3 Echokardiographie

Die echokardiographischen Messungen wurden von Dr. Akyzbek Sydykov durchgeführt und erfolgten zum ersten Mal einen Tag vor der Operation und daraufhin einen Tag vor den endgültigen hämodynamischen Messung (siehe Abbildung 3). Die Mäuse wurden mittels Isofluran (1,5% v/v) anästhesiert und auf eine Wärmeplatte gelegt, wodurch ihre Kerntemperatur, die mittels rektaler Sonde gemessen wurde, konstant bei 37 °C gehalten werden konnte. Die echokardiographischen Bilder wurden mit Hilfe des Vevo 770 *high-resolution Imaging Systems* erstellt, welches mit einem 30-MHz RMV-707B Schallkopf (VisualSonics, Toronto, Canada) ausgestattet ist. Die Dicke der freien Wand des rechten Ventrikels (RVWT = *RV free wall thickness*) wurde in der modifizierten parasternalen Langachse und der Innendurchmesser des rechten Ventrikels (RVID = *RV internal diameter*) im apikalen Vierkammerblick gemessen. Zur Beurteilung der rechtsventrikulären Leistung diente die Messung der TAPSE (*tricuspid annular plane systolic excursion*). Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Bilder durch einen einzelnen Begutachter, der in Hinblick auf die durchgeführte Operation geblendet war.

2.3.4 Hämodynamische Messungen.

Die hämodynamischen Messungen der einzelnen Mäuse-Gruppen wurden von Dr. Akyzbek Sydykov durchgeführt und erfolgten *in vivo* 3 Tage, 1 Woche, 3 Wochen oder 5 Wochen nach der PAB-Operation. Die Mäuse wurden mittels Isofluran (1,5% v/v) anästhesiert und auf eine Wärmeplatte gelegt, wodurch ihre Kerntemperatur, die mittels rektaler Sonde gemessen wurde, konstant bei 37 °C gehalten werden konnte. Für die Katheterisierung des rechten Ventrikels wurde die rechte Jugularvene verwendet und der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) gemessen. Der systemische arterielle Druck (SAP) wurde mittels Katheter in der rechten Karotis gemessen. Für die hämodynamischen Messungen wurde ein High Fidelity 1,4F Mikromanometer-Katheter (Millar Instruments, Houston, USA) verwendet. Mittels des PowerLab Data Acquisition Systems (MPVS-Ultra Single Segment Foundation system,

AD instruments, Spechbach, Germany) und der Labchart 7 Software wurden die Daten gesammelt und ausgewertet. Nach Abschluss der Messungen wurden Blutproben und die Herzen entnommen.

2.3.5 Präparation der Herzen

Die Präparation der Herzen erfolgte durch Dr. Himel Luitel. Zunächst wurden die Ventrikel von den großen Gefäßen und Vorhöfen freipräpariert. Dann erfolgte die Isolation des rechten Ventrikels (RV) vom linken Ventrikel (LV) und dem Septum (S) mittels eines Schnittes entlang der Septumlinie. Der RV und LV+S wurden trockengetupft und gewogen. Zur Beurteilung der rechtsventrikulären Hypertrophie wurde das Verhältnis von rechtsventrikulärer Masse zur Tibialänge bestimmt. Die frisch präparierten RV wurden anschließend in 4% Paraformaldehyd fixiert.

2.3.6 Histologische und immunhistologische Untersuchungen

2.3.6.1 Einbettung und Schneiden der rechten Ventrikel

Die rechten Ventrikel wurden mit Hilfe eines geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten entwässert und daraufhin in einer Paraffinausgussstation in Paraffinblöcke gegossen.

Für die histologischen Untersuchungen wurden schließlich mittels Mikrotom 3 µm dicke Schnitte der rechten Ventrikel angefertigt und auf die Objektträger aufgebracht. Diese wurden dann zum Trocknen und Lagern in 37 °C warme Wärmeschränke gelegt.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden jeweils 8 Schnitte von je 5 µm Dicke pro Präparat angefertigt und überschüssiges Paraffin mittels eines Skalpell entfernt. Die auf diese Weise entnommenen Gewebeschnitte wurden für jedes Präparat in einem 2 ml Reagiergefäß gesammelt und dann für die direkt anschließende RNA-Isolation verwendet.

2.3.6.2 Kollagenanteil

2.3.6.2.1 Färbeprotokoll der Sirius-Red Färbung

Tabelle 4: Färbeprotokoll der Sirius-Red Färbung

1.	60 min	Wärmeschrank 58°C
2.	10 min	Xylol rein (>98%)
3.	10 min	Xylol rein (>98%)
4.	10 min	Xylol rein (>98%)
5.	5 min	Ethanol 99,6%
6.	5 min	Ethanol 99,6%
7.	5 min	Ethanol 96%
8.	5 min	Ethanol 70%
9.	kurz	Aqua dest.
10.	60 min (lichtgeschützt!)	0,1% Picro Sirius Red
11.	2 min	Essigsäure 1%
12.	2 min	Essigsäure 1%
13.	2 min	Essigsäure 1%
14.	kurz	Aqua dest.
15.	5 min	Ethanol 70%
16.	5 min	Ethanol 96%
17.	5 min	Ethanol 99,6%
18.	5 min	Xylol rein (>98%)
19.	1 min	Xylol rein (>98%)
20.	Eindecken mit Pertex	

Die 0,1 % Picro Sirius Red-Lösung wurde wie folgt angesetzt:

400 ml Picrinsäure (1,0 %) wurden 2-fach filtriert und darin 0,4 g Siriusrot F3B aufgelöst. Die Lösung wurde anschließend auf einen pH-Wert von 2 titriert und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.3.6.2.2 Analyse des Kollagenanteils

Die Analyse des prozentualen Kollagenanteils in den rechten Ventrikeln wurde mit Hilfe der Analysesoftware QWin V3 von Leica durchgeführt.

Der Farbstoff Sirius Red bindet an Kollagenfasern (Typ I und Typ III) und färbt diese rot. Das restliche, kollagenfreie Gewebe wird gelb gefärbt. Die rot gefärbten Kollagenanteile werden von der Analysesoftware erkannt und markiert (Abb. 4). Daraufhin sind noch manuelle Korrekturen der markierten bzw. nicht markierten Bereiche möglich (Abb. 4b).

Die Analyse der Schnitte erfolgte geblindet. Unter 40-facher Vergrößerung wurden jeweils 40 Bilder pro Schnitt mäanderförmig ausgewertet, wobei die Schnittränder

ausgelassen wurden. Die ermittelten Werte wurden von der Software für jedes Bild in eine Excel-Tabelle übertragen und am Ende wurde der Mittelwert des Kollagenanteils für den jeweiligen Schnitt errechnet. Pro rechtem Ventrikel wurde ein Schnitt ausgewertet.

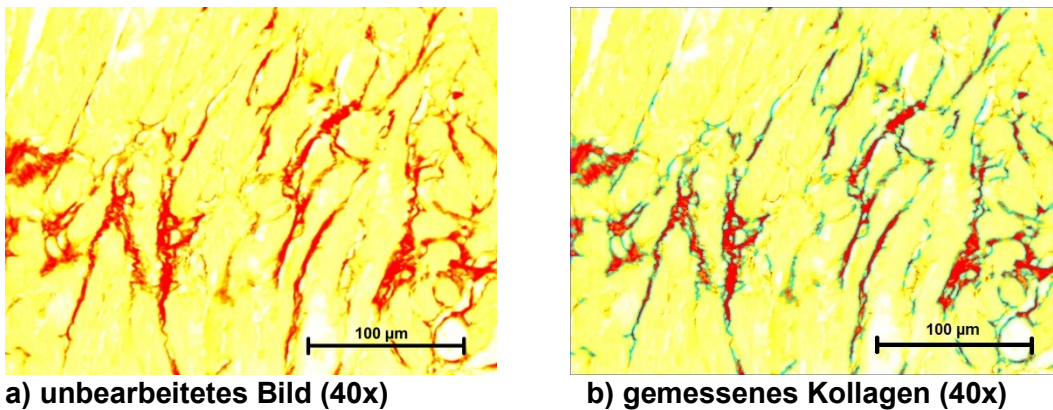


Abbildung 4: Bestimmung des Kollagenanteils in den rechten Ventrikeln

2.3.6.3 Kardiomyozyten-Größe und myokardiale Angiogenese

2.3.6.3.1 Färbeprotokoll der Kardiomyozyten-/Kapillaren-Färbung

Tabelle 5: Färbeprotokoll der Kardiomyozyten-/Kapillaren-Färbung

Nr.	Zeit [min.]	
1.	60	Entparaffinierung bei 58°C
2.	10	Xylol rein (>98%)
3.	10	Xylol rein (>98%)
4.	10	Xylol rein (>98%)
5.	5	Ethanol 99,6%
6.	5	Ethanol 99,6%
7.	5	Ethanol 96%
8.	5	Ethanol 70%
9.	kurz	Aqua dest.
10.	20	Kochen im Wasserkocher (Schnitte stehen in Plastikkuvette mit Rodent Decloaker)
11.	10	Küvette bleibt im heißen Wasser, Wasserkocher ausgeschaltet und Deckel offen
12.	30	Küvetten aus dem Wasserkocher nehmen und bei Raumtemperatur abkühlen lassen
13.	kurz	Aqua dest.
14.	15	H ₂ O ₂ - Methanol Gemisch (15%)
15.	2 x 5	Aqua dest.

16.	3 x 5	TBS
17.	15	Proteinase K (175µl pro Schnitt)
18.	kurz	Aqua dest.
19.	3 x 5	TBS
20.	60	BSA (175µl pro Schnitt)
21.	4 x 5	TBS
22.		Antikörper-Lösung (175µl pro Schnitt)
23.	Über Nacht	Bei 4°C in Black Box inkubieren
24.	6 x 20	TBS
25.		Schnitte mit Flouro Care Anti-Fade Mountant eindecken
26.		Schnitte bei 4°C und im Dunkeln lagern, bis Bilder aufgenommen wurden

Ansätze:

Rodent Decloaker: 90 ml Aqua dest. + 10 ml Rodent Decloaker (10x) (für eine Plastikküvette)

H₂O₂ - Methanol Gemisch (15 %): 100 ml Methanol, reinst + 100 ml H₂O₂ 30 %

TBS: 4750 ml Aqua dest. + 250 ml Tris-Wash Buffer (20x)

Proteinase K: 1 Tropfen pro 1,6 ml Diluent (für 8 Schnitte)

Antikörper-Lösung: 15 µl WGA-FITC + 15 µl IB4-TRITC + 5 µl DAPI + 1965 µl TBS (für 10 Schnitte)

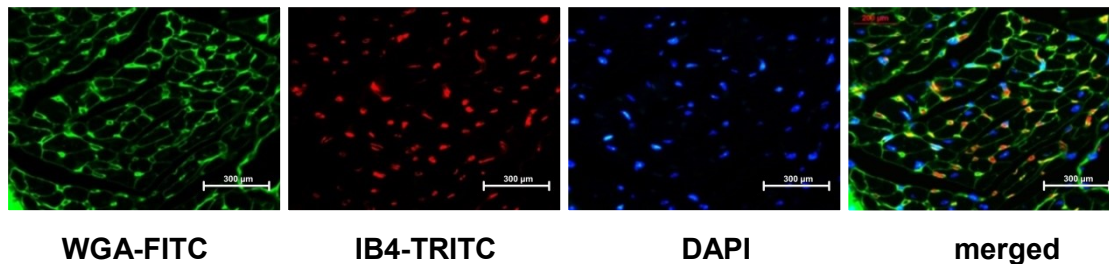
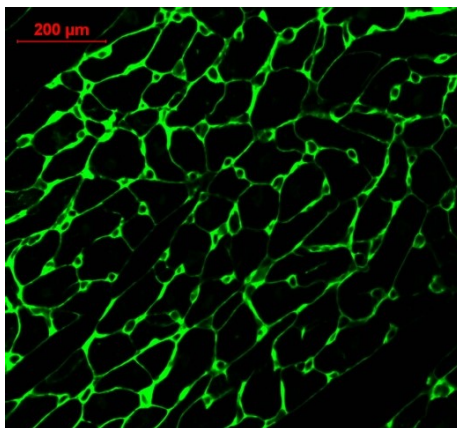


Abbildung 5: Kardiomyozyten-/Kapillaren-Färbung (63x)

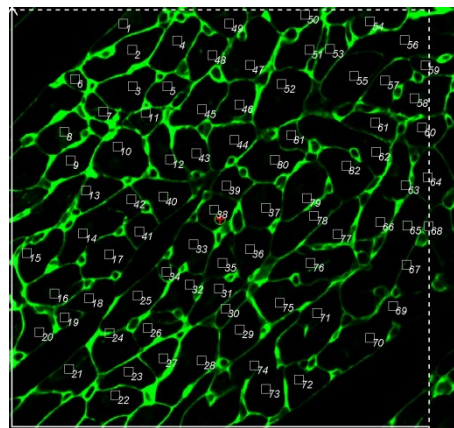
2.3.6.3.2 Analyse der Kardiomyozyten-Größe und -Anzahl

Von jedem Präparat wurden jeweils drei Schnitte angefertigt und die Kardiomyozyten mittels WGA-FITC angefärbt. Weizenkeim-Agglutinin (WGA), welches von der Weizenpflanze *Triticum vulgare* stammt, ist ein Lektin, das an N-Acetyl-β-D-Glykosamin-Reste von Glykoproteinen bindet. Diese finden sich auch in der Zellmembran von Kardiomyozyten. Das WGA ist mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) konjugiert, welches bei einer Wellenlänge von 488 nm grün leuchtet (Abb. 5). Die Zellkerne wurden mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt, das unter ultraviolettem Licht bläulich fluoresziert (Abb. 5).

Pro Schnitt wurden bei 63-facher Vergrößerung jeweils 15 Bilder aufgenommen und anschließend wurde mit Hilfe des STEPanizer © stereology tool von S. A. Tschanz die Kardiomyozyten-Anzahl bestimmt (Abb. 6) Die Auszählung erfolgte dabei geblindet. Die Kardiomyozyten-Anzahlen jedes Bildes wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und die Gesamtanzahl für den jeweiligen Schnitt durch Summieren der Einzelwerte berechnet. Aus den Gesamtanzahlen der drei Schnitte wurde schließlich der Mittelwert für das jeweilige Präparat gebildet.



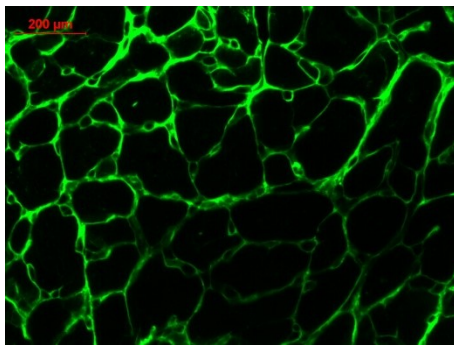
a) WGA-FITC-Färbung (63x)



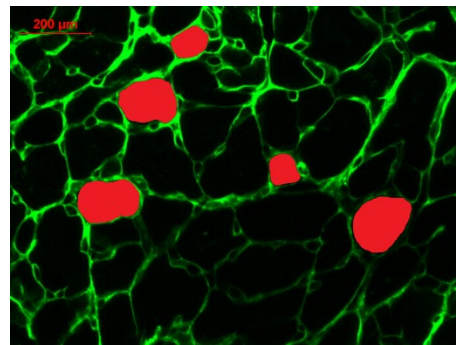
b) Auszählung der Kardiomyozyten

Abbildung 6: Bestimmung der Kardiomyozyten-Anzahl

Die Messung der Kardiomyozyten-Größe wurde mit Hilfe der Analysesoftware QWin V3 von Leica geblindet durchgeführt. Dabei wurden pro Schnitt 100 quer angeschnittene Kardiomyozyten markiert und deren Cross Sectional Area berechnet (Abb. 7). Die Werte wurden schließlich in eine Excel-Tabelle übertragen und es wurde ein Mittelwert für den Schnitt bestimmt. Aus den Mittelwerten der drei Schnitte wurde dann ein Gesamtmittelwert für den jeweiligen rechten Ventrikel ermittelt.



a) WGA-FITC-Färbung (63x)



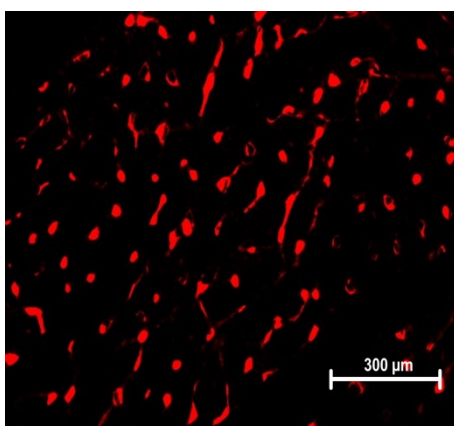
b) Messung der Kardiomyozyten-Größe

Abbildung 7: Bestimmung der Kardiomyozyten-Größe

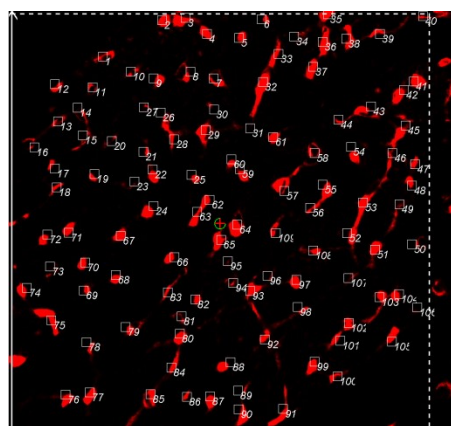
2.3.6.3.3 Analyse der Kapillaren-Anzahl

Zur Bestimmung der Kapillaren-Anzahl wurden von jedem Präparat jeweils drei Schnitte angefertigt und mit IB4-TRITC angefärbt. Isolektin B4 wird aus der Afrikanischen Schwarzbohne *Griffonia simplicifolia* gewonnen und bindet an α -D-Galaktosyl-Reste von Endothelzellen. Es ist mit Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat (TRITC) gekoppelt, das bei einer Wellenlänge von 594 nm rot leuchtet (Abb. 5).

Pro Schnitt wurden bei 63-facher Vergrößerung jeweils 15 Bilder aufgenommen und anschließend wurde mit Hilfe des STEPanizer © stereology tool von S. A. Tschanz die Kapillaren-Anzahl bestimmt (Abb. 8). Die Auszählung erfolgte dabei geblindet. Die Kapillaren-Anzahlen jedes Bildes wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und schließlich wurde die Gesamtanzahl für den jeweiligen Schnitt durch Summieren der Einzelwerte berechnet. Aus den Gesamtanzahlen der drei Schnitte wurde letztlich der Mittelwert für den jeweiligen rechten Ventrikel gebildet.



a) IB4-TRITC-Färbung (63x)



b) Auszählung der Kapillaren

Abbildung 8: Bestimmung der Kapillaren-Anzahl

Am Ende wurde für jedes Präparat der Quotient aus Kapillaren-Anzahl und Kardiomyozyten-Anzahl sowie Kapillaren-Anzahl und Kardiomyozyten-Größe berechnet und alle Werte wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst.

2.3.7 Molekularbiologische Untersuchungen

2.3.7.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des RNeasy FFPE Kits (Qiagen) und den Angaben im entsprechenden Kit-Handbuch isoliert. Kurz zusammengefasst: Zu den gesammelten Gewebeschnitten (siehe Abschnitt 2.3.5.1) wurden 320 μ l Deparaffinisierungslösung hinzugegeben, um das vorhandene Paraffin zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde die Lösung dann mit einem Proteinase K enthaltenen Lysepuffer versehen, um die RNA frei zu setzen. Die Inkubation bei 56 und 80°C diente schließlich dazu das Formalin-*crosslinking* der freigesetzten RNA rückgängig zu machen und so die Qualität aber auch Quantität der RNA zu steigern. Anschließend wurde das Gemisch mit DNase behandelt um die genomische DNA zu entfernen. Nach Zugabe eines Alkohol-enthaltenen Puffers wurde die Probe auf *RNeasy MinElute spin columns* geladen und die RNA konnte an die Säulenmembran binden. Durch Waschschrte wurden Kontaminationen entfernt und die RNA schließlich durch Zugabe von 17 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend erfolgte die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der RNA mit Hilfe des NanoDrops.

2.3.7.2 qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurde zunächst 600 ng der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Dies erfolgte mit Hilfe des iScript™ cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad. Das dafür benötigte Volumen an isolierter RNA wurde mit 4 μ l Puffer (iScript™ reaction mix) und 1 μ l iScript™ reverse Transkriptase vermischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf insgesamt 20 μ l aufgefüllt. Die reverse Transkription erfolgte unter folgenden Bedingungen:

1. 5 min bei 25 °C
2. 30 min bei 42 °C
3. 5 min bei 85 °C
4. Ende bei 4 °C

Die cDNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 300 ng verdünnt und für die quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet.

Für die qRT-PCR wurde ein Synthese-Volumen von 10 µl verwendet, welches sich wie folgt zusammensetzte:

- 1 µl cDNA
- 0,5 µl Primer
- 3,5 µl Nuklease-freies Wasser
- 5 µl iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix

Das Synthese-Volumen von jeder Probe wurde daraufhin als Doppelansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert. Als Negativkontrolle wurde für jedes Gen eine *non-template* Kontrolle verwendet. Anschließend wurde im CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System folgendes Programm durchlaufen:

1. 3 min bei 95 °C
 2. 5 Sekunden bei 95 °C
 3. 10 Sekunden bei 59 °C
 4. 10 Sekunden bei 72 °C
- } 40 x
5. 30 Sekunden 95 °C
 6. 30 Sekunden 65 °C
 7. Aufheizen von 65 °C auf 95 °C für die Schmelzkurvenanalyse in 0,5 °C-Schritten
 8. 5 Sekunden Messen der Platte

Da der SYBR® Green I Farbstoff unselektiv an doppelsträngige DNA bindet, wurde anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden zusätzlich noch mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, um die gezielte Vervielfältigung des gewünschten DNA-Produkts zu bestätigen.

Die *Δcycle threshold* Werte (ΔC_t -Werte) für jedes Ziel-Gen wurden folgendermaßen berechnet: $\Delta C_t = C_t$ (Referenzgen) – C_t (Ziel-Gen). Als Referenzgen wurde dabei das β_2 -Mikroglobulin-Gen (B2M-Gen) verwendet. Zuvor wurde von den C_t -Werten eines jeden Doppelansatzes der Mittelwert gebildet.

2.3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) mittels 2way ANOVA und Tuckey`s Multiple Comparison Test. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM).

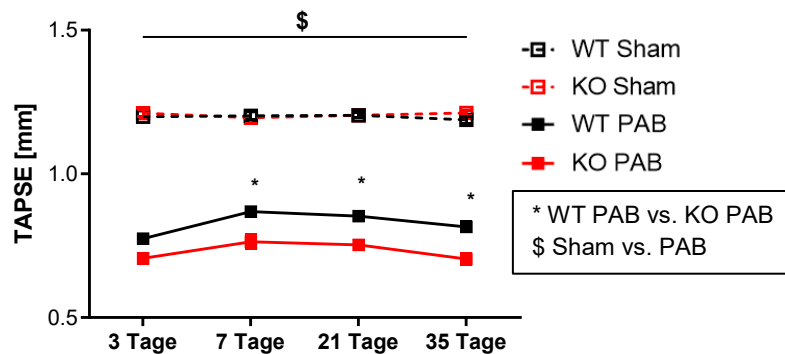
3 Ergebnisse

Um die Rolle von FHL-1 bei der Hypertrophie-Entwicklung im rechten Ventrikel in Folge einer chronisch erhöhten Druckbelastung genau untersuchen zu können, ist es wichtig die Auswirkungen des FHL-1-Knockouts auf verschiedenen Ebenen zu erfassen. Daher wurden neben funktionellen Untersuchungen (Echokardiographie und Hämodynamik) auch die morphologischen (Histologie) und molekularen (qRT-PCR) Auswirkungen untersucht. Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM).

3.1 Echokardiographische Messungen

Zur Beurteilung der rechtsventrikulären Hypertrophie und der Funktionalität des Herzens wurden zu im Vorfeld definierten Zeitpunkten echokardiographische Messungen durchgeführt (siehe Abb. 3). Diese erfolgten allesamt durch Dr. Akylbek Sydykov.

Die TAPSE (*tricuspid annular plane systolic excursion*) ist ein Parameter für die kontraktile Funktionalität des rechten Ventrikels. Wie in Abbildung 9 dargestellt, zeigten die PAB-operierten Mäuse (3 Tage: PAB-WT 0,80 mm \pm 0,01 mm; PAB-KO 0,70 mm \pm 0,02 mm) zu allen Zeitpunkten signifikant geringere Werte und somit eine schlechtere Kontraktilität als die scheinoperierten Mäuse (3 Tage: Sham-WT 1,20 mm \pm 0,01 mm; Sham-KO 1,20 mm \pm 0,01 mm). Bei den Sham-operierten Mäusen blieben die Werte über den ganzen Zeitraum hinweg annähernd konstant (Abb. 9). Die PAB-operierten FHL-1-KO-Mäuse hatten nach drei Tagen tendenziell geringere TAPSE-Werte als die PAB-operierten WT-Mäuse (Abb. 9). Im weiteren Verlauf entwickelte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den PAB-operierten FHL-1-KO-Mäusen und den WT-Mäusen insofern, dass die FHL-1-KO-Mäuse schlechtere TAPSE-Werte vorwiesen als die WT-Mäuse (7 Tage: PAB-WT 0,90 mm \pm 0,01 mm; PAB-KO 0,80 mm \pm 0,03 mm; Abb. 9).

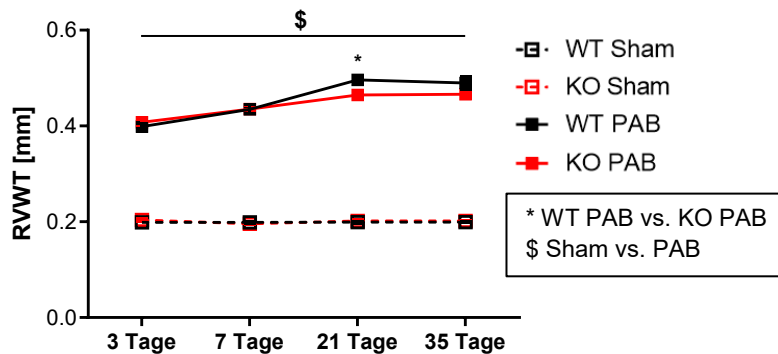


n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	15	15	8	9
7 Tage	11	14	7	11
21 Tage	15	13	13	13
35 Tage	15	13	11	13

Abbildung 9: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE)

Der FHL-1-Knockout zeigt nach sieben Tagen einen negativen Einfluss auf die TAPSE in Folge des PAB. Die Daten wurden in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage) erhoben. n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (* $p < 0,05$ WT-PAB vs. KO-PAB, \$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarteriell *banding*, Sham = schein-operiert.

Ein Parameter für die Hypertrophie des rechten Ventrikels bietet die rechtsventrikuläre Wanddicke (RVWT). Die entsprechenden Messwerte sind in Abbildung 10 dargestellt. Schon nach drei Tagen wiesen die beiden PAB-operierten Mäusegruppen (PAB-WT $0,40 \text{ mm} \pm 0,01 \text{ mm}$; PAB-KO $0,40 \text{ mm} \pm 0,01 \text{ mm}$) im Vergleich zu den beiden Sham-operierten Gruppen (Sham-WT $0,200 \text{ mm} \pm 0,002 \text{ mm}$; Sham-KO $0,200 \text{ mm} \pm 0,004 \text{ mm}$) eine signifikante Verdickung der rechtsventrikulären Wand auf. Während die Sham-operierten Mäuse im Verlauf keine Zunahme der RVWT zeigten, nahm die RVWT bei den PAB-operierten Mäusen zu (Abb. 10). Nach drei Wochen bestand zwischen den PAB-operierten FHL-1-KO-Mäusen und den PAB-operierten WT-Mäusen ein signifikanter Unterschied, indem die FHL-1-KO-Mäuse eine geringere RVWT aufwiesen (PAB-WT $0,50 \text{ mm} \pm 0,01 \text{ mm}$; PAB-KO $0,500 \text{ mm} \pm 0,003 \text{ mm}$). Nach drei Tagen und nach einer und fünf Wochen war kein Unterschied zwischen diesen beiden Mäuse-Gruppen in Hinblick auf die RVWT festzustellen. Auch die Sham-operierten Gruppen zeigten untereinander keine Unterschiede.

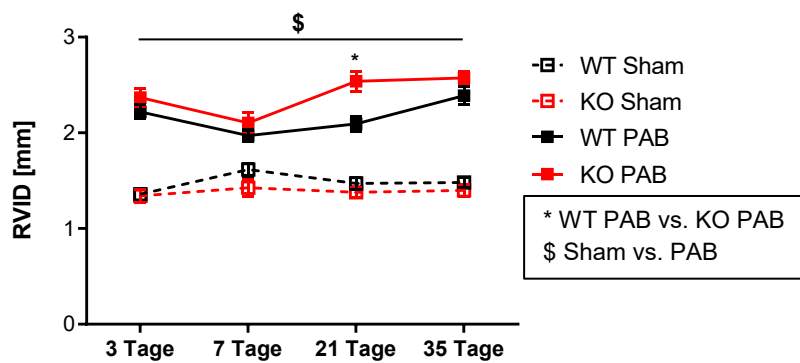


n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	15	15	8	9
7 Tage	10	14	7	11
21 Tage	15	13	13	14
35 Tage	15	13	11	13

Abbildung 10: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT)

Der FHL-1-Knockout zeigt keinen Einfluss auf die PAB-induzierte Zunahme der RVWT. Die Daten wurden in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage) erhoben. n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (* $p < 0,05$ WT-PAB vs. KO-PAB, \$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = schein-operiert.

Die Bestimmung des rechtsventrikulären Innendurchmessers (RVID) gibt Hinweise auf eine Dilatation des rechten Ventrikels. Wie in Abbildung 11 zu sehen, bestand hierbei bei den PAB-operierten Mäusen (3 Tage: PAB-WT $2,20 \text{ mm} \pm 0,07 \text{ mm}$; PAB-KO $2,40 \text{ mm} \pm 0,09 \text{ mm}$) zu allen Messzeitpunkten ein signifikant größerer RVID als im Vergleich zu den Sham-operierten (3 Tage: Sham-WT $1,40 \text{ mm} \pm 0,05 \text{ mm}$; Sham-KO $1,30 \text{ mm} \pm 0,07 \text{ mm}$). Nach drei Wochen wiesen die PAB-operierten FHL-1-KO-Mäuse einen signifikant größeren RVID auf als die PAB-operierten WT-Mäuse (PAB-WT $2,10 \text{ mm} \pm 0,08 \text{ mm}$; PAB-KO $2,50 \text{ mm} \pm 0,11 \text{ mm}$).



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	15	15	8	9
7 Tage	10	14	7	11
21 Tage	15	13	13	14
35 Tage	15	13	11	13

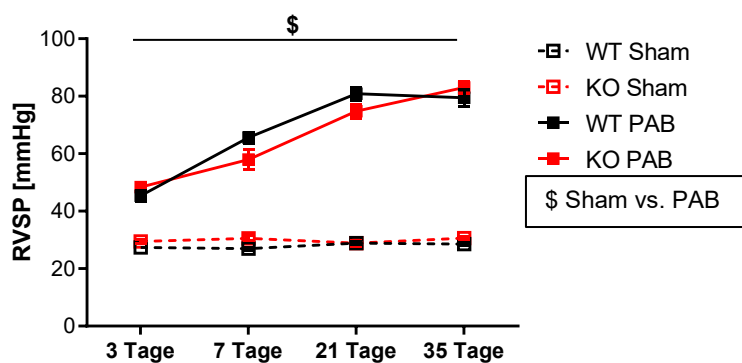
Abbildung 11: Rechtsventrikulärer Innendurchmesser (RVID)

Der FHL-1-Knockout zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die PAB-induzierte Zunahme des RVID. Die Daten wurden in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage) erhoben. n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (* $p < 0,05$ WT-PAB vs. KO-PAB, \$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = schein-operiert.

3.2 Hämodynamische Messungen

Zur Beurteilung der hämodynamischen Veränderungen und der Funktionalität des Herzens wurden zu vorher definierten Zeitpunkten hämodynamische Messungen durchgeführt (siehe Abb. 3). Diese erfolgten allesamt durch Dr. Akylbek Sydykov.

Die systolischen Blutdruckwerte im rechten Ventrikel (RVSP) sind in Abbildung 12 dargestellt und blieben bei den Sham-operierten Mäusen über den gesamten Untersuchungszeitraum annähernd konstant. Die RVSP-Werte der PAB-operierten Mäuse (3 Tage: PAB-WT 45 mmHg \pm 1 mmHg; PAB-KO 48 mmHg \pm 1 mmHg) waren im Vergleich zu den Werten der Sham-operierten Mäuse (3 Tage: Sham-WT 27,0 mmHg \pm 0,5 mmHg; Sham-KO 29 mmHg \pm 2 mmHg) über den gesamten Messzeitraum signifikant höher und zeigten einen zeitabhängigen Anstieg (Abb. 12). Zwischen den FHL-1-KO-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

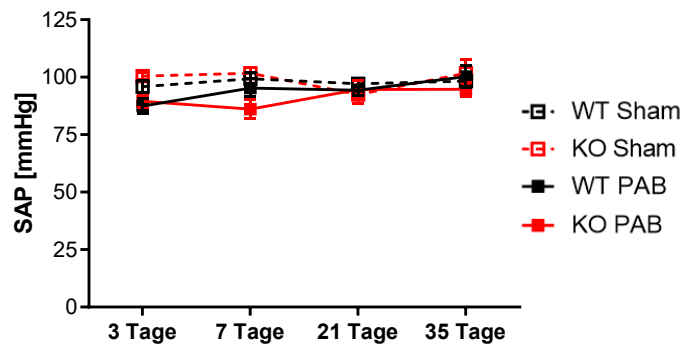


n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	10	10	9	8
7 Tage	10	10	10	10
21 Tage	10	10	10	10
35 Tage	8	9	9	9

Abbildung 12: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP)

Der FHL-1-Knockout zeigt keinen Einfluss auf den PAB-induzierten Anstieg des RVSP. Die Daten wurden in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage) erhoben. n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (\$ p < 0,05 Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarteriell *banding*, Sham = schein-operiert.

Bei den Messungen des systemischen arteriellen Blutdrucks (SAP) bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Über den gesamten Beobachtungszeitraum blieben die Werte annähernd konstant (Abb. 13).

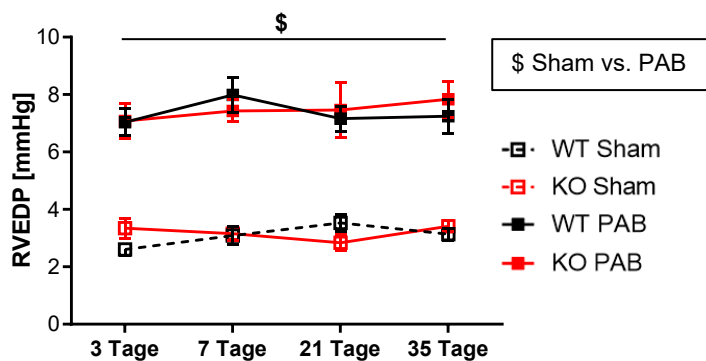


n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	10	10	8	8
7 Tage	10	10	10	10
21 Tage	10	10	10	10
35 Tage	8	8	8	9

Abbildung 13: Systemischer arterieller Blutdruck (SAP)

Die Werte des SAP zeigten in allen Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikanten Unterschiede. Die Daten wurden in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage) erhoben. n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterieller *banding*, Sham = schein-operiert.

Die rechtsventrikulären enddiastolischen Blutdruckwerte (RVEDP) sind in Abbildung 14 dargestellt und waren bei den PAB-operierten Mäusen (3 Tage: PAB-WT 7,0 mmHg \pm 0,5 mmHg; PAB-KO 7,0 mmHg \pm 0,6 mmHg) zu allen Messzeitpunkten signifikant höher als bei den Sham-operierten Mäusen (3 Tage: Sham-WT 2,6 mmHg \pm 0,2 mmHg; Sham-KO 3,3 mmHg \pm 0,3 mmHg). Insgesamt blieben die Werte aller Gruppen im Verlauf annähernd konstant (Abb. 14). Zwischen den FHL-1-KO-Mäusen und den WT-Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

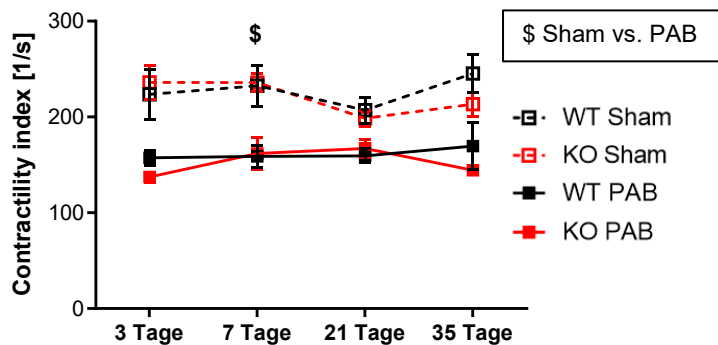


n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	10	10	9	8
7 Tage	10	10	10	10
21 Tage	10	10	10	10
35 Tage	8	9	9	9

Abbildung 14: Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (RVEDP)

Der FHL-1-Knockout beeinflusst nicht die PAB-induzierten Erhöhung des RVEDP. Die Daten wurden in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage) erhoben. n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (\$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielleres *banding*, Sham = schein-operiert.

Einen weiteren Parameter für die Funktionalität des Herzens stellt der Kontraktilitätsindex (*contractility index*) dar. Die Messwerte sind in Abbildung 15 zu sehen. Hierbei entwickelten sich nach einer Woche signifikant höhere Werte bei den Sham-operierten Mäusen (Sham-WT $233 \text{ 1/s} \pm 22 \text{ 1/s}$; Sham-KO $236 \text{ 1/s} \pm 10 \text{ 1/s}$) im Vergleich zu den PAB-operierten Mäusen (PAB-WT $159 \text{ 1/s} \pm 11 \text{ 1/s}$; PAB-KO $162 \text{ 1/s} \pm 17 \text{ 1/s}$). Auch nach drei Tagen, drei Wochen und fünf Wochen waren die Werte der Sham-operierten Mäuse tendenziell höher (Abb. 15). Zwischen den FHL-1-KO-Mäusen und den WT-Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	10	10	9	8
7 Tage	10	10	10	10
21 Tage	9	10	10	10
35 Tage	8	9	9	9

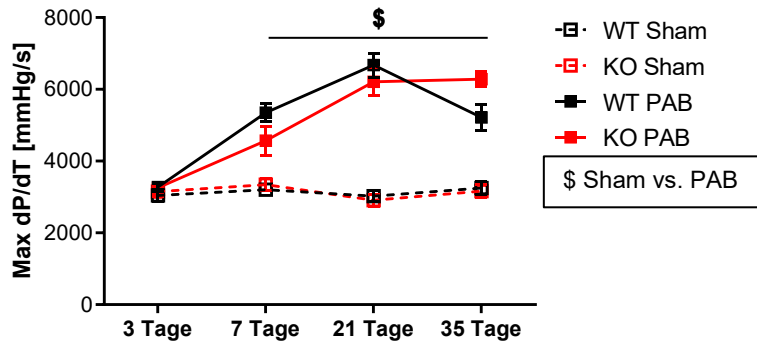
Abbildung 15: Kontraktilitätsindex (Contractility index)

Der FHL-1-Knockout zeigt keinen Einfluss auf den Kontraktilitätsindex. Die Daten wurden in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage) erhoben. n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (\$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = schein-operiert.

Die maximalen und minimalen Blutdruckveränderungen über die Zeit waren nach drei Tagen bei allen Gruppen sehr ähnlich (Abb. 16). Nach einer Woche zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Maximalwerte der PAB-operierten Mäuse (PAB-WT 5353 mmHg/s \pm 252 mmHg/s; PAB-KO 4568 mmHg/s \pm 399 mmHg/s) im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen (Sham-WT 3203 mmHg/s \pm 120 mmHg/s; Sham-KO 3344 mmHg/s \pm 162 mmHg/s). Die Minimalwerte waren tendenziell erniedrigt. Nach drei und fünf Wochen unterschieden sich die PAB-operierten Mäuse (Minimalwerte nach 3 Wochen: PAB-WT -5652 mmHg/s \pm 160 mmHg/s; PAB-KO 5276 mmHg/s \pm 349 mmHg/s) und Sham-operierten Mäuse (Minimalwerte nach 3 Wochen: Sham-WT -2744 mmHg/s \pm 78 mmHg/s; Sham-KO -2435 mmHg/s \pm 145 mmHg/s) signifikant in Hinblick auf die Minimal- und Maximalwerte. Dabei wiesen die PAB-operierten Mäuse höhere Maximalwerte und niedrige Minimalwerte als die Sham-operierten Mäuse auf. Die Maximalwerte stiegen bei den PAB-operierten Mäusen in den ersten drei Wochen an und die Minimalwerte sanken im selben Zeitraum (Abb. 16). Bei den Sham-operierten Mäusen blieben die Werte über den gesamten Zeitraum relativ konstant (Abb. 16). Bei den PAB-operierten FHL-1-KO-Mäusen konnten nach fünf Wochen signifikant

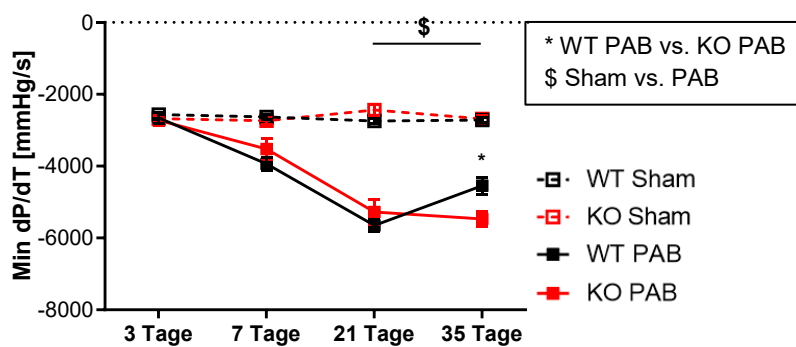
niedrigere Minimalwerte im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (PAB-KO $-5471 \text{ mmHg/s} \pm 199 \text{ mmHg/s}$; PAB-WT $-4543 \text{ mmHg/s} \pm 232 \text{ mmHg/s}$). Bei den Maximalwerten zeigten die FHL-1-KO-Mäuse zu diesem Zeitpunkt tendenziell höhere Maximalwerte (Abb. 16).

A



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	10	10	9	8
7 Tage	10	10	10	9
21 Tage	9	10	10	10
35 Tage	8	9	9	9

B

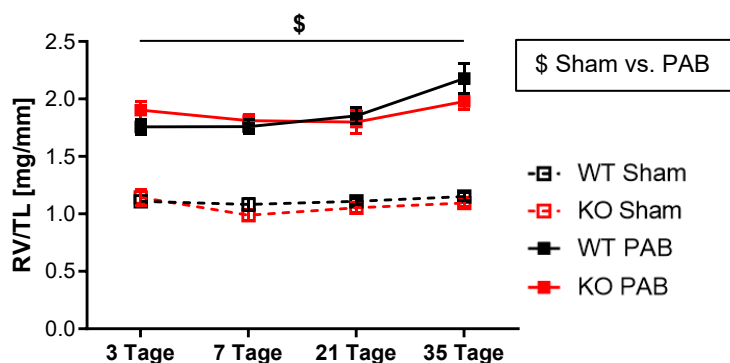


n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	10	10	9	8
7 Tage	10	10	10	10
21 Tage	10	10	10	10
35 Tage	8	9	9	9

Abbildung 16: Geschwindigkeit der Blutdruckerhöhung (A) bzw. -verringerung (B) während der isovolumetrischen Kontraktion

Der FHL-1-Knockout zeigt keinen Einfluss auf die PAB-induzierten Veränderungen in den Geschwindigkeiten der Blutdruckerhöhung bzw. -verringerung. Die Daten wurden in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage) erhoben. n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (* $p < 0,05$ WT-PAB vs. KO-PAB; \$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarteriell *banding*, Sham = schein-operiert.

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der Hypertrophie des rechten Ventrikels ist das Verhältnis von der Masse des rechten Ventrikels zur Tibia-Länge der jeweiligen Maus (RV/TL), welches in Abbildung 17 dargestellt ist. Hierbei bestanden bei den PAB-operierten Mäusen (3 Tage: PAB-WT 1,80 mg/mm \pm 0,06 mg/mm; PAB-KO 1,90 mg/mm \pm 0,08 mg/mm) über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant höhere Werte als bei den Sham-operierten Mäusen (3 Tage: Sham-WT 1,10 mg/mm \pm 0,05 mg/mm; Sham-KO 1,10 mg/mm \pm 0,07 mg/mm). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mäusetypen konnten nicht festgestellt werden.



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	10	10	9	9
7 Tage	10	10	10	10
21 Tage	10	10	10	10
35 Tage	10	10	10	10

Abbildung 17: Verhältnis von der Masse des rechten Ventrikels zur Länge der Tibia

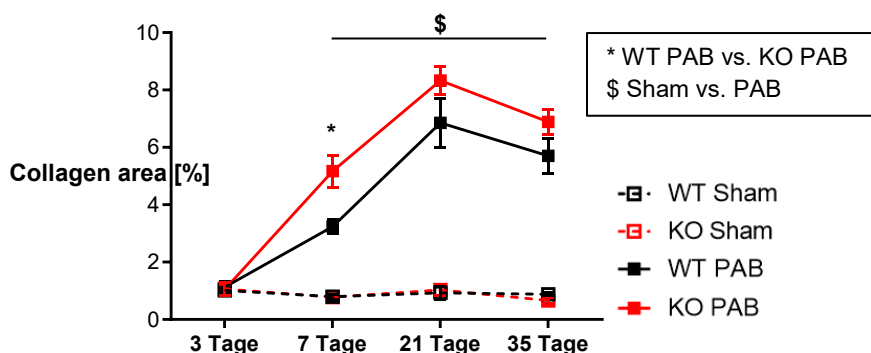
Der FHL-1-Knockout beeinflusst nicht die PAB-induzierte Vergrößerung des Verhältnisses von Masse des rechten Ventrikels zur Länge der Tibia. Die Daten wurden in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage) erhoben. n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (\$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarteriell *banding*, Sham = schein-operiert.

3.3 Histologische und immunhistologische Untersuchungen

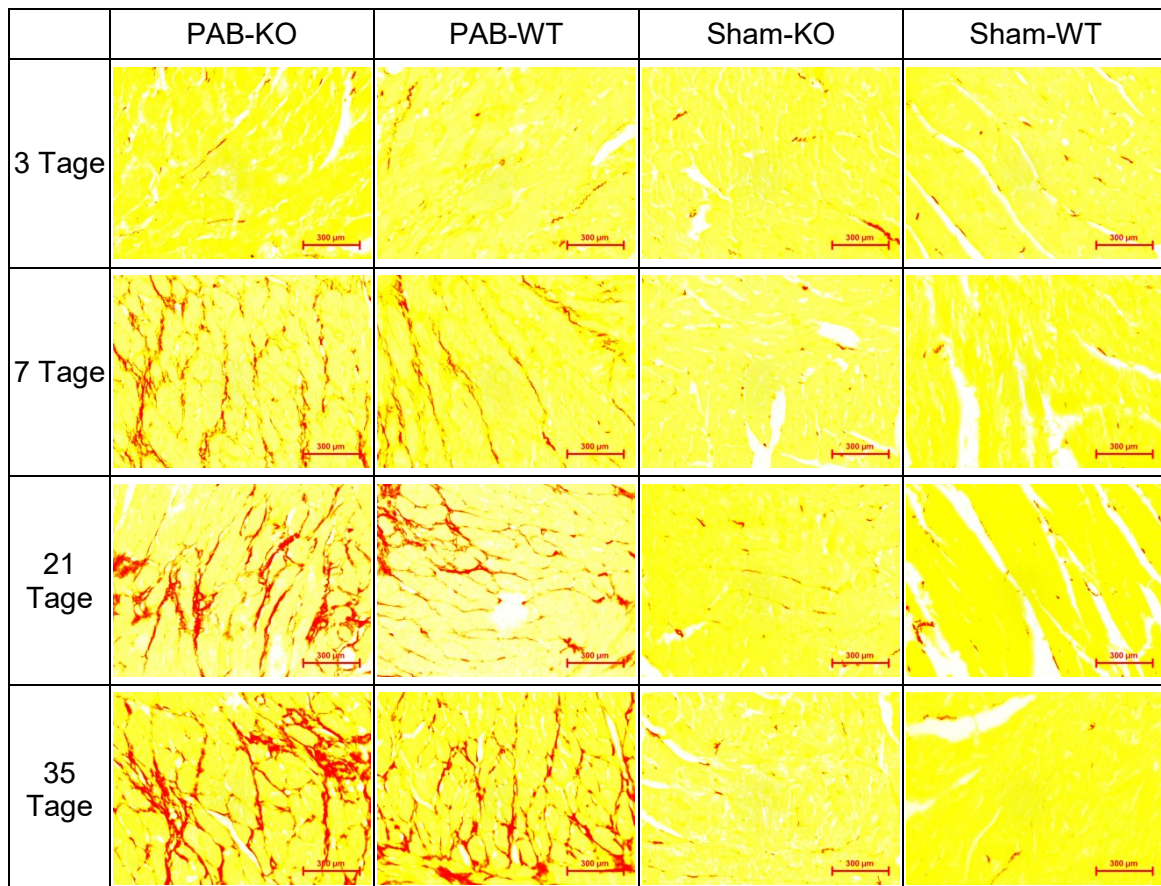
3.3.1 Kollagenanteil

Zur Beurteilung der Fibrosierung im rechten Ventrikel wurde der Kollagenanteil im Verhältnis zur Gesamtfläche bestimmt. Die erhobenen Messwerte sind in Abbildung 18 (A) dargestellt. Beim ersten Messzeitpunkt nach drei Tagen besaßen alle Gruppen einen ähnlichen Kollagenanteil um 1%. Nach einer Woche zeigten sich jedoch signifikant höhere Kollagenanteile bei den PAB-operierten Mäusen (PAB-KO $5,17\% \pm 0,56\%$; PAB-WT $3,24\% \pm 0,23\%$) im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen (Sham-KO $0,78\% \pm 0,04\%$; Sham-WT $0,80\% \pm 0,09\%$). Innerhalb der Gruppe der PAB-operierten Mäuse entwickelten sich zu diesem Zeitpunkt signifikant höhere Kollagenanteile bei den FHL-1-KO-Mäusen ($5,17\% \pm 0,56\%$) im Vergleich zu den WT-Mäusen (PAB-WT $3,24\% \pm 0,23\%$). Nach drei und fünf Wochen waren die Kollagenanteile der PAB-operierten Mäuse signifikant höher als die der Sham-operierten Mäuse. Die PAB-operierten FHL-1-KO-Mäuse wiesen zu diesen Zeitpunkten tendenziell höhere Kollagenanteile als die PAB-operierten WT-Mäuse auf. Insgesamt blieb der Kollagenanteil bei den Sham-operierten Mäusen im Verlauf annähernd konstant (Abb. 18A). Bei den PAB-operierten Mäusen stieg der Kollagenanteil in den ersten drei Wochen an und fiel daraufhin bis zur fünften Woche wieder etwas ab (Abb. 18A). Die Abbildung 18 (B) veranschaulicht mit Hilfe der histologischen Bilder die teils signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

A



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	5	5	5	4
7 Tage	5	5	5	5
21 Tage	4	5	5	5
35 Tage	5	5	4	5

B**Abbildung 18: Histologische Bestimmung des Kollagenanteils**

Das FHL-1-Knockout hat keinen signifikanten Einfluss auf den PAB-induzierten Anstieg des Kollagenanteils in den rechten Ventrikeln.

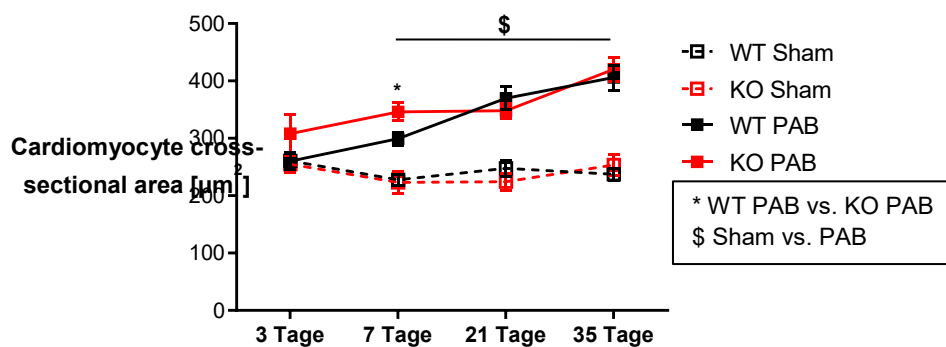
(A) Quantifizierung des prozentualen Kollagenanteils (*collagen area*) der rechten Ventrikel der einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage). n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (* $p < 0,05$ WT-PAB vs. KO-PAB, \$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = schein-operiert.

(B) Repräsentative Bilder der histologischen Schnitte zur Beurteilung des Kollagenanteils (*collagen area*) mittels Sirius-Red Färbung in den rechten Ventrikeln der einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten. 40x Vergrößerung. Rot = Kollagenfasern, Gelb = restliches Muskelgewebe, WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = schein-operiert.

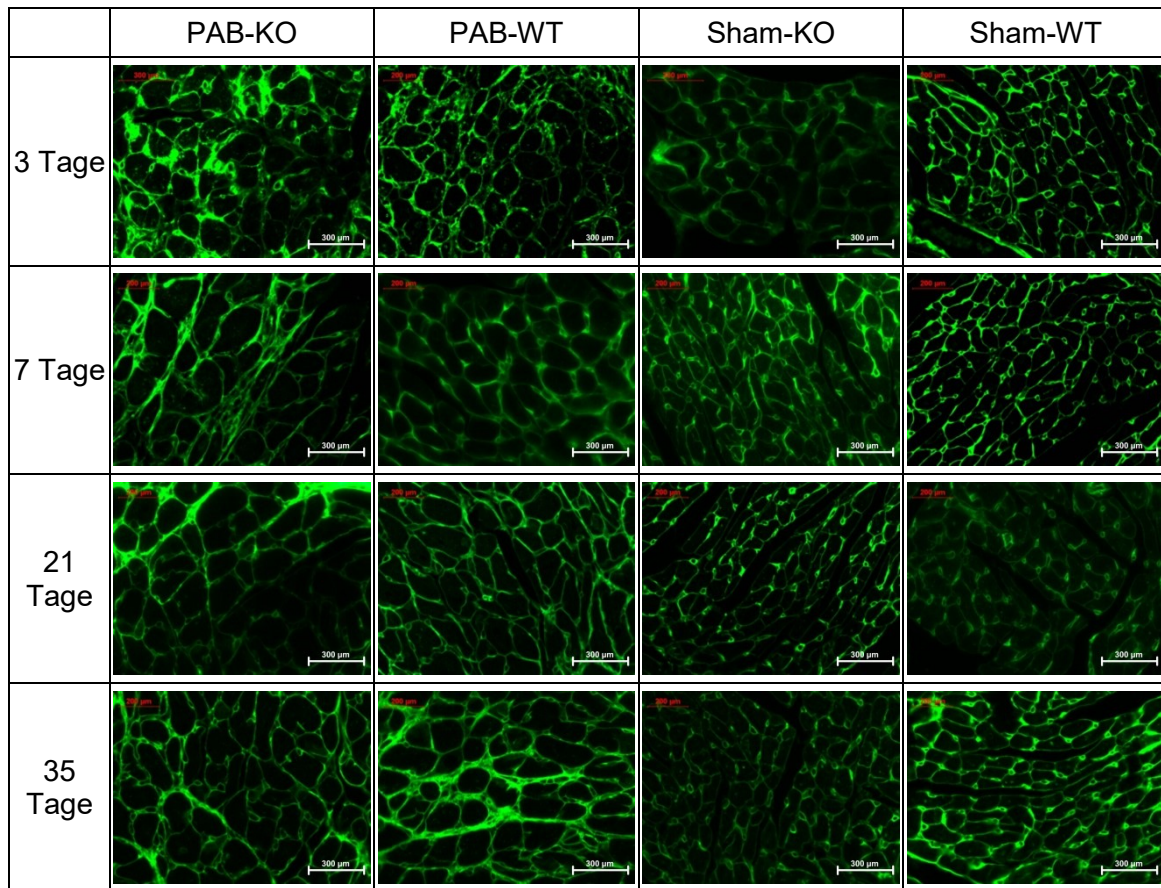
3.3.2 Kardiomyozyten-Größe

Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Hypertrophie des rechten Ventrikels ist die Größe der Kardiomyozyten. Die Fläche der querschnittenen Kardiomyozyten wird dabei als *cross sectional area* bezeichnet und dient als Maß für die Hypertrophie. Die erhobenen Messwerte sind in Abbildung 19 (A) dargestellt. Nach einer Woche zeigten die PAB-operierten Mäuse (PAB-WT $299,37 \mu\text{m}^2 \pm 11,06 \mu\text{m}^2$; PAB-KO $346,05 \mu\text{m}^2 \pm 15,97 \mu\text{m}^2$) eine signifikante Vergrößerung der Querschnittsfläche im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen (Sham-WT $227,83 \mu\text{m}^2 \pm 9,92 \mu\text{m}^2$; Sham-KO $222,93 \mu\text{m}^2 \pm 19,06 \mu\text{m}^2$). Innerhalb der Gruppe der PAB-operierten Mäuse wiesen zudem die FHL-1-KO Mäuse ($346,05 \mu\text{m}^2 \pm 15,97 \mu\text{m}^2$), verglichen mit den WT-Mäusen ($299,37 \mu\text{m}^2 \pm 11,06 \mu\text{m}^2$), nach einer Woche eine signifikant größere Querschnittsfläche auf. Im weiteren Verlauf näherten sich die Flächenmaße der FHL-1-KO Mäuse und WT-Mäuse jedoch wieder an. Der signifikante Unterschied zwischen PAB-operierten Mäusen und Sham-operierten Mäusen blieb hingegen auch nach drei bzw. fünf Wochen noch bestehen. In Abbildung 19 (B) werden die teils signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen anhand der immunhistologischen Aufnahmen bildlich dargestellt.

A



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	5	5	5	4
7 Tage	5	5	5	5
21 Tage	4	5	5	5
35 Tage	5	5	4	5

B**Abbildung 19: Histologische Bestimmung der Kardiomyozyten-Größe**

Das FHL-1-Knockout hat keinen signifikanten Einfluss auf den PAB-induzierten Anstieg der Kardiomyozyten-Größe in den rechten Ventrikeln.

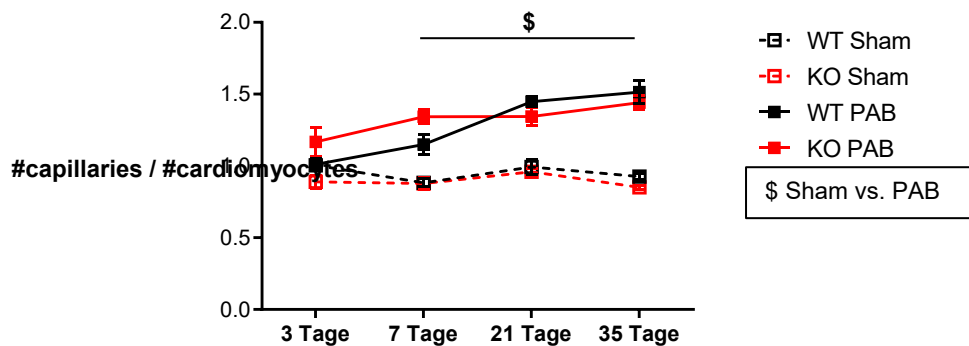
(A) Quantifizierung der Querschnittsfläche (*cross sectional area*) der Kardiomyozyten des rechten Ventrikels der einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage). n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (* $p < 0,05$ WT-PAB vs. KO-PAB, \$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = schein-operiert.

(B) Repräsentative Bilder der immunhistologischen Schnitte zur Beurteilung der Querschnittsfläche (*cross sectional area*) der Kardiomyozyten des rechten Ventrikels der einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 1 Woche, 3 Wochen, 5 Wochen). 63x Vergrößerung. Anfärbung der Zellmembran der Kardiomyozyten mittels WGA-FITC (grün). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = schein-operiert.

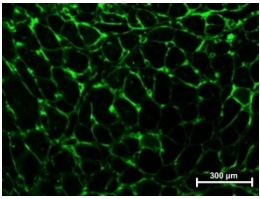
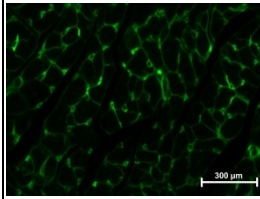
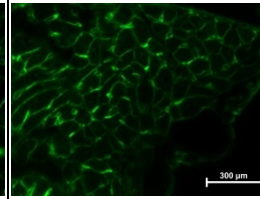
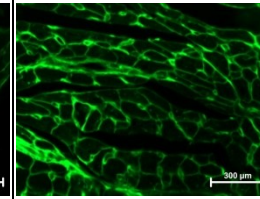
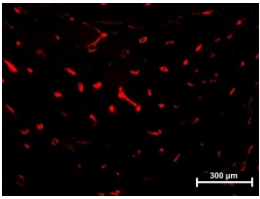
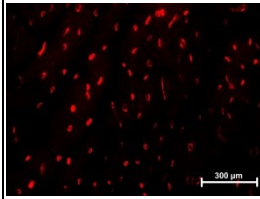
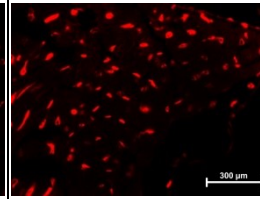
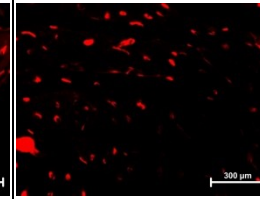
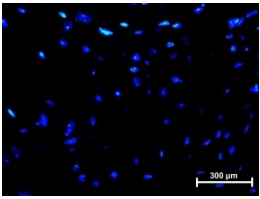
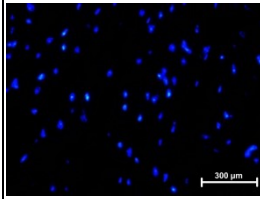
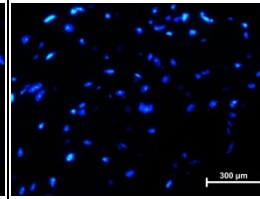
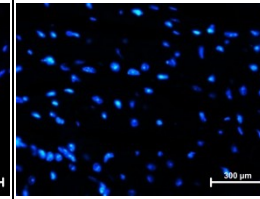
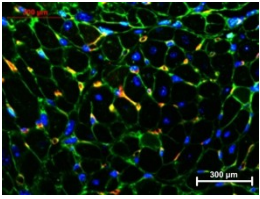
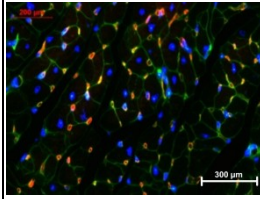
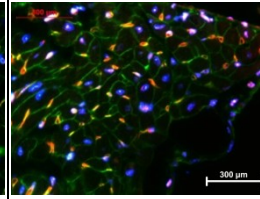
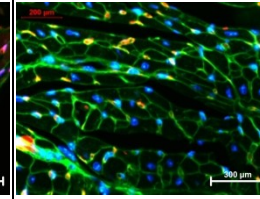
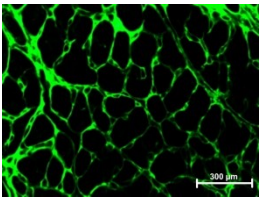
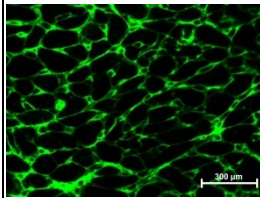
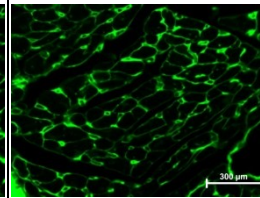
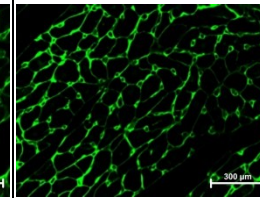
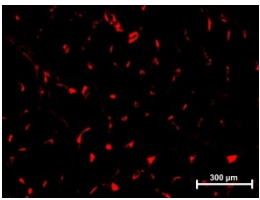
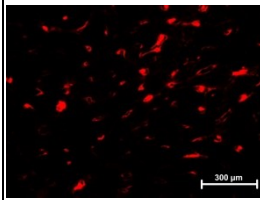
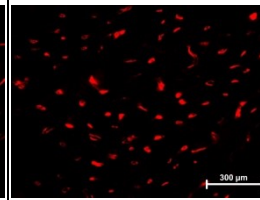
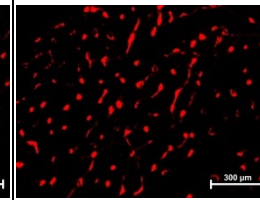
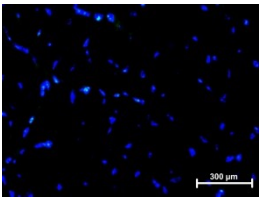
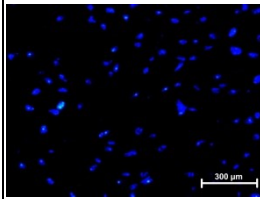
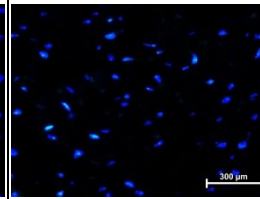
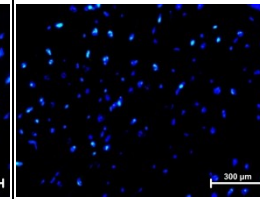
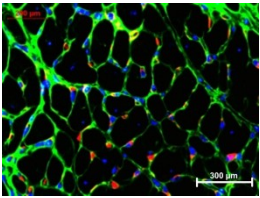
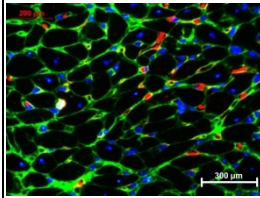
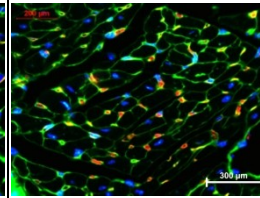
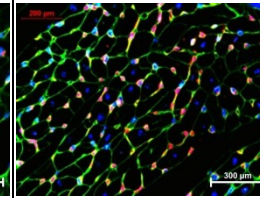
3.3.3 Kapillarisation

Ein wichtiger Faktor, um die *remodeling*-Prozesse im rechten Ventrikel zu charakterisieren, ist die Kapillarisation. Als Maßeinheit dient dabei das Verhältnis der Kapillarenanzahl zur Anzahl der Kardiomyozyten, welches in Abbildung 20 (A) dargestellt ist. Nach drei Tagen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. Nach einer Woche zeigten die PAB-operierten Mäuse (PAB-WT $1,15 \pm 0,07$; PAB-KO $1,34 \pm 0,05$) jedoch signifikant höhere Werte im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen (Sham-WT $0,88 \pm 0,03$; Sham-KO $0,88 \pm 0,04$). Auch nach drei und fünf Wochen blieb dieser signifikante Unterschied bestehen. Zwischen den FHL-1-KO Mäusen und den WT-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In den Abbildungen 20 (B) bis (E) sind die immunhistologischen Aufnahmen der einzelnen Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten dargestellt.

A



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	5	5	5	4
7 Tage	5	5	5	5
21 Tage	4	5	5	5
35 Tage	5	5	4	5

B		3 Tage			
		PAB-KO	PAB-WT	Sham-KO	Sham-WT
	WGA				
	IB4				
	DAPI				
	Merged				
C		7 Tage			
		PAB-KO	PAB-WT	Sham-KO	Sham-WT
	WGA				
	IB4				
	DAPI				
	Merged				

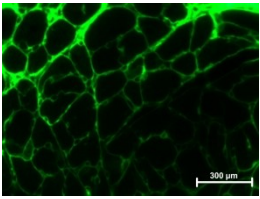
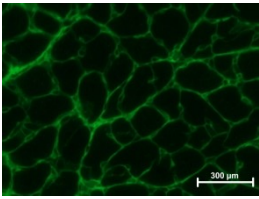
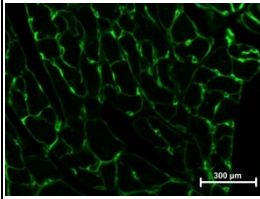
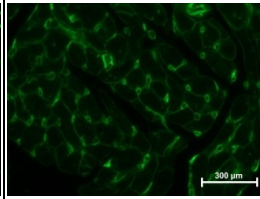
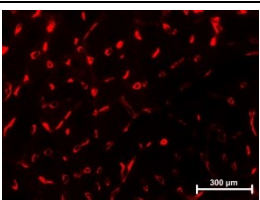
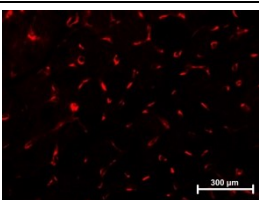
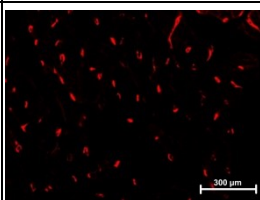
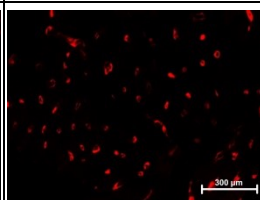
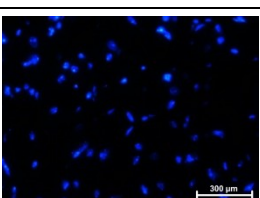
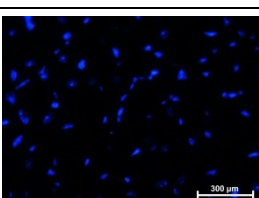
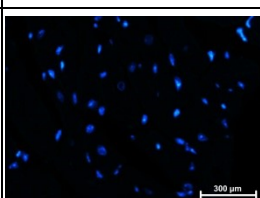
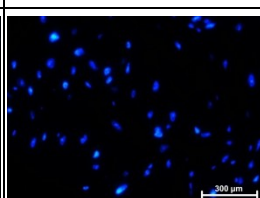
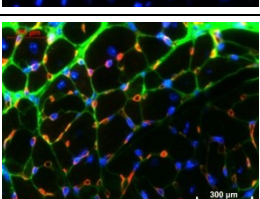
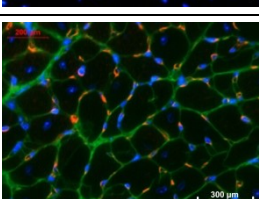
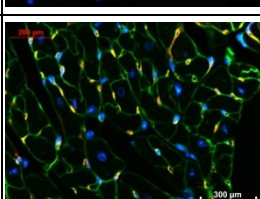
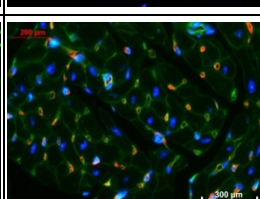
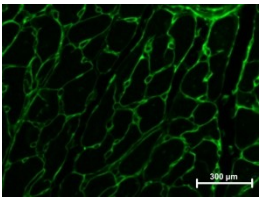
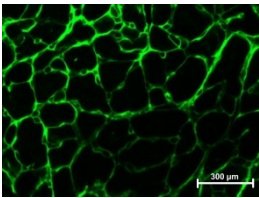
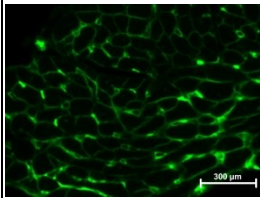
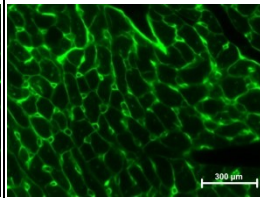
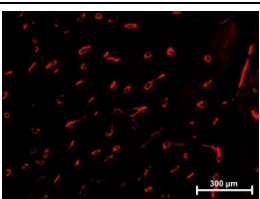
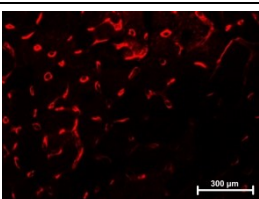
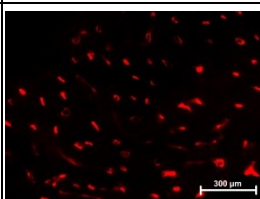
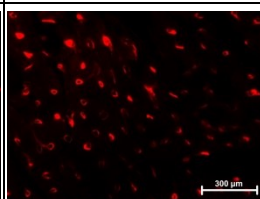
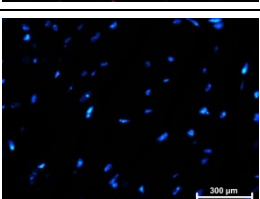
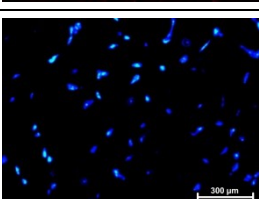
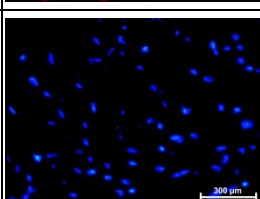
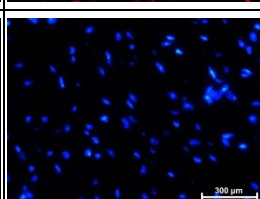
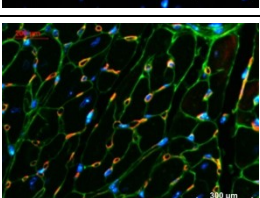
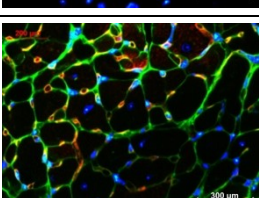
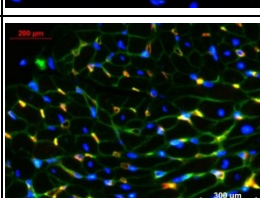
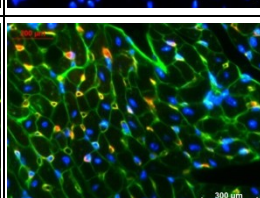
D 21 Tage		PAB-KO	PAB-WT	Sham-KO	Sham-WT
WGA					
IB4					
DAPI					
Merged					
E 35 Tage		PAB-KO	PAB-WT	Sham-KO	Sham-WT
WGA					
IB4					
DAPI					
Merged					

Abbildung 20: Histologische Bestimmung der Kapillarisation

Das FHL-1-Knockout hat keinen Einfluss auf den PAB-induzierten Anstieg der Kapillarisation in den rechten Ventrikeln.

(A) Verhältnis aus Kapillarenanzahl zu Anzahl der Kardiomyozyten im rechten Ventrikel in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage). n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (\$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = schein-operiert.

(B-E) Repräsentative Bilder der immunhistologischen Schnitte zur Beurteilung der Kapillaren- und Kardiomyozyten-Anzahl im rechten Ventrikel in den einzelnen Gruppen. Messzeitpunkte 3 Tage (**B**), 7 Tage (**C**), 3 Wochen (**D**) und 5 Wochen (**E**). 63x Vergrößerung. WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = schein-operiert, WGA = Wheat germ agglutinin-Fluorescein Isothiocyanat-Färbung, IB4 = Isolektin-B4-Färbung, DAPI = Diamidinphenylindol-Färbung.

3.4 Molekularbiologische Untersuchungen

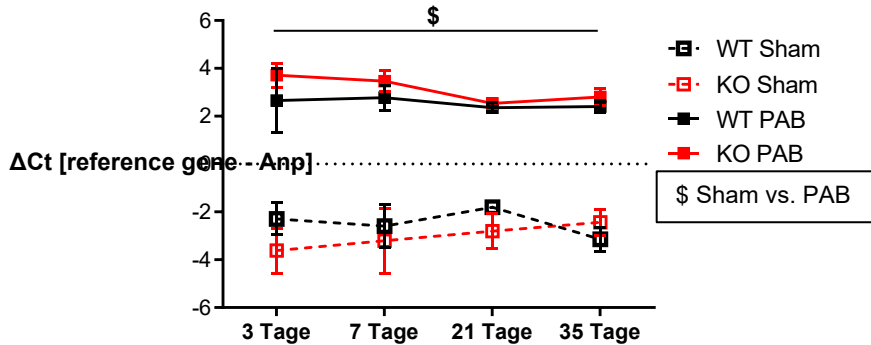
Im Rahmen einer Druckbelastung des rechten Ventrikels kommt es zur Expression verschiedener Gene, welche bei der Entstehung einer Hypertrophie von Bedeutung sein können (41). Die molekularbiologischen Untersuchungen mittels quantitativer real-time PCR Analyse (qRT-PCR) dienen dazu, potenzielle Genexpressionsveränderungen in Folge der Sham/PAB-OP und/oder des FHL-1-Knockouts nachzuweisen und zu quantifizieren. Als Referenzgen wurde bei den Untersuchungen das β_2 -Mikroglobulin-Gen (B2M-Gen) verwendet.

Zunächst wurde die Expression von sog. Hypertrophie-Markern, wie das atriale natriuretischen Peptid (ANP) und das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) untersucht. Beide werden bei erhöhter Wanddehnung, wie sie beispielsweise bei Druckbelastung auftritt, vermehrt exprimiert und die gebildeten Hormone ANP und BNP sorgen durch Steigerung der Natriuresis und periphere Vasodilatation für eine Verringerung des Blutdrucks (21). Zudem sollen sie auch die Hypertrophie und Fibrose im Myokard verringern (21).

Die Untersuchung der Genexpression von ANP ergab eine signifikante Erhöhung der Genexpression zu allen Messzeitpunkten, wenn man die PAB-operierten Mäuse (3 Tage: PAB-WT $2,7 \pm 1,3$; PAB-KO $3,7 \pm 0,5$) mit den Sham-operierten Mäusen (3 Tage: Sham-WT $-2,3 \pm 0,7$; Sham-KO $-3,6 \pm 0,9$) verglich (Abb. 21A). Zwischen den FHL-1-KO Mäusen und den WT-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 21A).

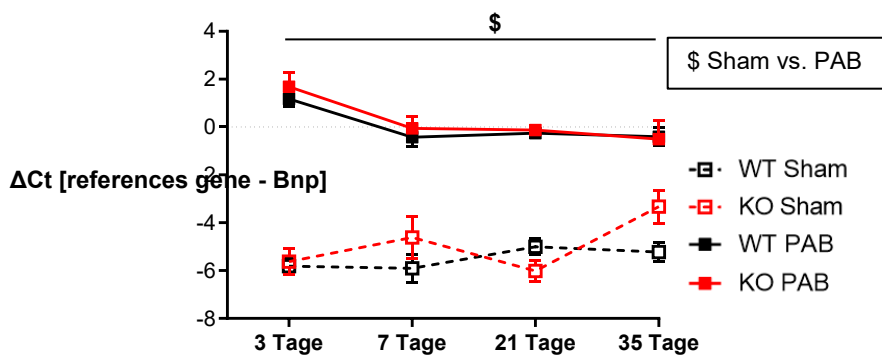
Auch die Untersuchung der Genexpression von BNP ergab eine signifikante Erhöhung der Genexpression zu allen Messzeitpunkten, wenn man die PAB-operierten Mäuse (3 Tage: PAB-WT $1,2 \pm 0,3$; PAB-KO $1,7 \pm 0,6$) mit den Sham-operierten Mäusen (3 Tage: Sham-WT $-5,8 \pm 0,4$; Sham-KO $-5,6 \pm 0,5$) verglich (Abb. 21B). Zwischen den FHL-1-KO Mäusen und den WT-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 21B).

A



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	5	5	5	4
7 Tage	5	5	5	5
21 Tage	4	5	5	5
35 Tage	5	5	4	5

B



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	5	5	5	4
7 Tage	5	5	5	5
21 Tage	4	5	5	5
35 Tage	5	5	4	5

Abbildung 21: qRT-PCR der Genexpression von ANP (A) und BNP (B)

Das FHL-1-Knockout beeinflusst nicht die PAB-induzierte Erhöhung der ANP- und BNP-Expression. Die Untersuchung der Genexpression in den rechten Ventrikeln von Sham oder PAB-operierten WT- bzw. FHL-1-Knockout-Mäusen erfolgte zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage). n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (\$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonaler arterielles *banding*, Sham = schein-operiert.

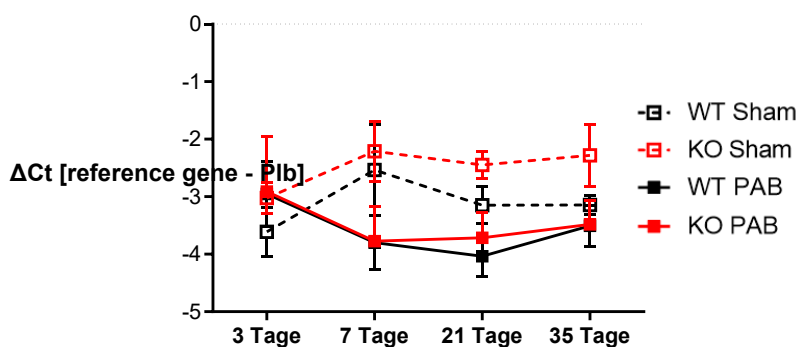
Als nächstes wurde die Genexpression von Ca^{2+} -sensitiven Proteinen wie Phospholamban (Plb), dem Ryanodin-Rezeptor Typ 2 (Ryr2) und der Kalzium-transportierenden ATPase Typ 2 (Atp2a2), auch SERCA2 genannt, untersucht. Die Ca^{2+} -sensitiven Proteine spielen im Rahmen der Hypertrophie eine wichtige Rolle, da sie für die Kalzium-Homöostase und Kontraktionskraft des Myokards von entscheidender Bedeutung sind (21).

Die Untersuchung der Genexpression von Phospholamban (Plb) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 22A). Nach einer Woche und nach drei Wochen zeigten sich bei den PAB-operierten Mäusen tendenziell niedrige Expressionswerte im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen (Abb. 22A).

Auch die Untersuchung der Genexpression des Ryanodin-Rezeptors Typ 2 (Ryr2) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 22B). Nach einer Woche, nach drei Wochen und nach fünf Wochen entwickelten sich bei den PAB-operierten Mäusen tendenziell niedrige Expressionswerte als bei den Sham-operierten Mäusen (Abb. 22B).

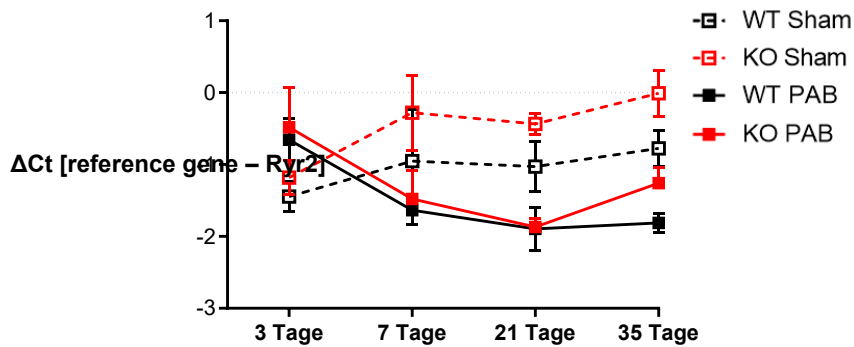
Die Untersuchung der Genexpression der Kalzium-transportierenden ATPase Typ 2 (Atp2a2), auch SERCA2 genannt, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 22C). Nach einer Woche, nach drei Wochen und nach fünf Wochen zeigten sich bei den PAB-operierten Mäusen tendenziell niedrige Expressionswerte im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen (Abb. 22C).

A



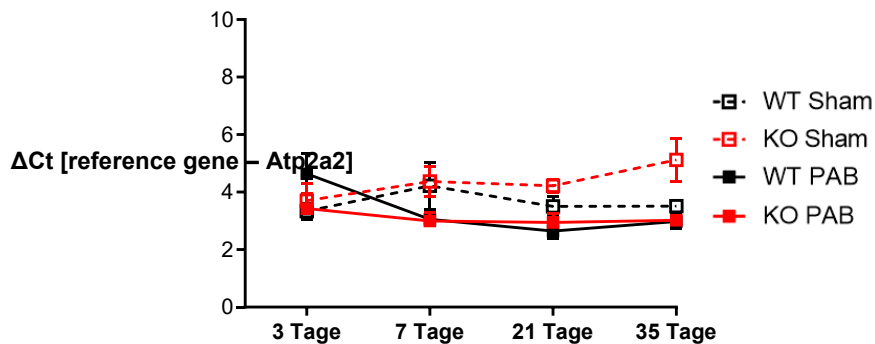
n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	5	5	5	4
7 Tage	5	5	5	5
21 Tage	4	5	5	5
35 Tage	5	5	3	5

B



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	5	5	5	4
7 Tage	5	5	5	5
21 Tage	4	5	5	5
35 Tage	5	5	3	5

C



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	5	5	5	4
7 Tage	5	5	5	5
21 Tage	4	5	5	5
35 Tage	5	5	4	5

Abbildung 22: qRT-PCR Analyse der Plb-(A), Ryr2-(B) und Atp2a2-Expression (C)

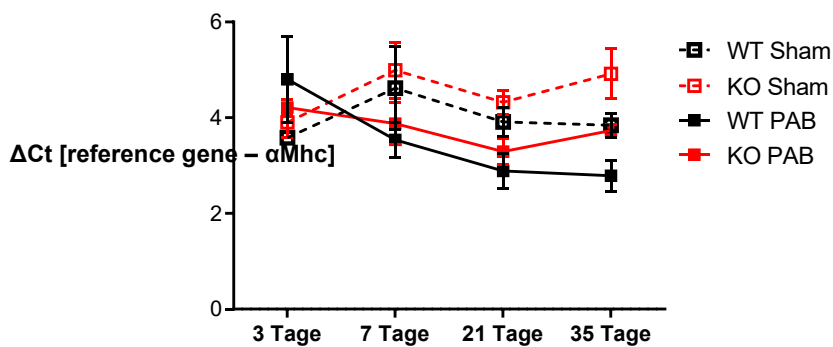
Das FHL-1-Knockout beeinflusst nicht die Plb-, Ryr2- und Atp2a2-Expression in den rechten Ventrikeln. Die Untersuchung der Genexpression in den rechten Ventrikeln von Sham oder PAB-operierten WT- bzw. FHL-1-Knockout-Mäusen erfolgte zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage). n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = scheinoperiert.

Anschließend wurde die Genexpression der Muskelproteine α -MHC und β -MHC analysiert. Sie spielen bei der Kontraktion der Kardiomyozyten eine wichtige Rolle und ihre Expression variiert je nach Belastungssituation und Entwicklungsstadium (25).

Die Untersuchung der Genexpression von α -MHC ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 23A). Nach einer Woche, nach drei Wochen und nach fünf Wochen zeigten sich bei den PAB-operierten Mäusen tendenziell niedrige Expressionswerte im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen (Abb. 23A).

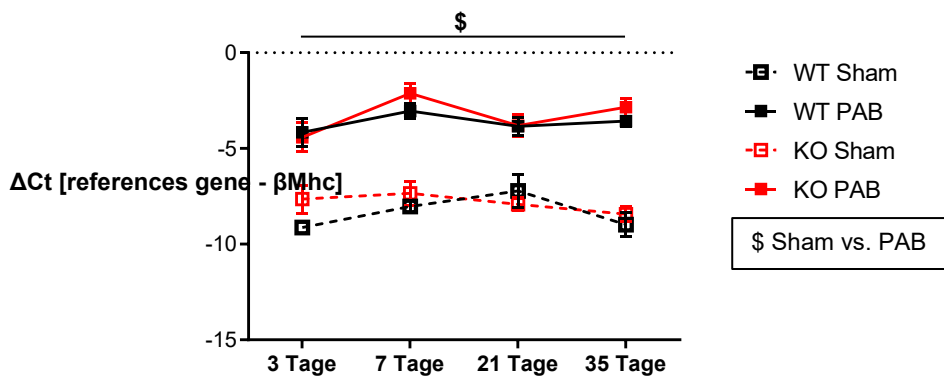
Die Untersuchung der Genexpression von β -MHC zeigte zu allen Messzeitpunkten eine signifikant erhöhte Expression bei den PAB-operierten Mäusen im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen (Abb. 23B). Ein Unterschied zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Mäusen der jeweiligen Gruppen konnte nicht festgestellt werden.

A



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	4	5	5	3
7 Tage	5	4	5	4
21 Tage	4	4	5	4
35 Tage	4	4	3	4

B



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	4	5	4	3
7 Tage	5	4	5	4
21 Tage	4	4	5	4
35 Tage	3	4	3	4

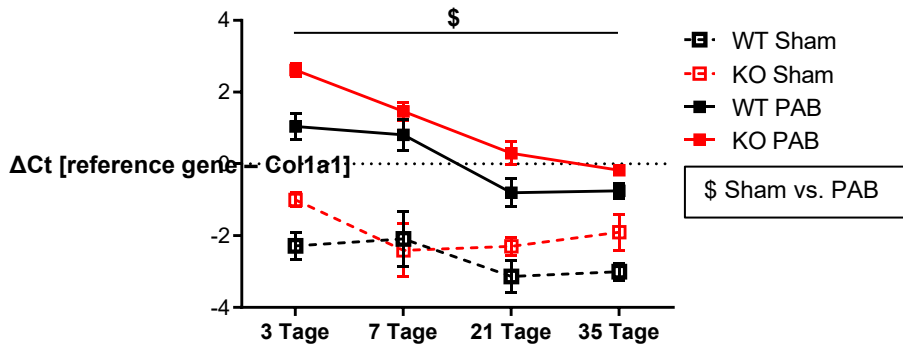
Abbildung 23: qRT-PCR Analyse der α -MHC-(A) und β -MHC-Expression (B)

Der FHL-1-Knockout hat keinen Einfluss auf die α -MHC-Expression und die PAB-induzierte Erhöhung der β -MHC-Expression. Die Untersuchung der Genexpression in den rechten Ventrikeln von Sham oder PAB-operierten WT- bzw. FHL-1-Knockout-Mäusen erfolgte zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage). n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (\$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = scheinoperiert.

Zum Schluss wurde die Genexpression der Kollagene Col1a1, Col1a2 und Col3a1 untersucht, welche bei der Fibrosierung, die in Folge der erhöhten Druckbelastung im rechten Ventrikel auftritt, eine wichtige Rolle spielen (38).

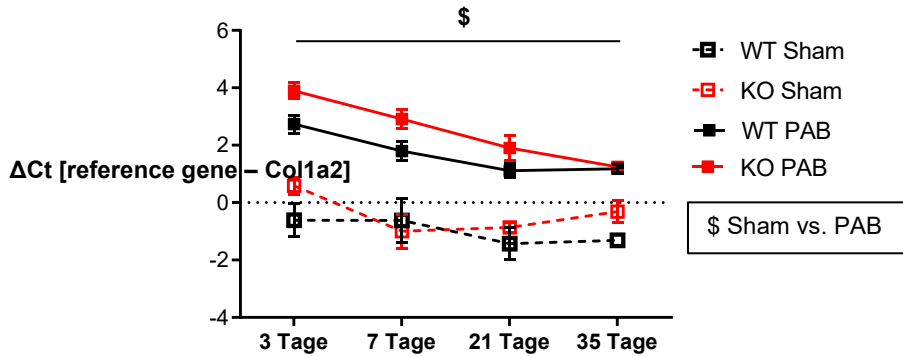
Die Ergebnisse der Untersuchung der Genexpression dieser Kollagene sind in den Abbildungen 24 A-C dargestellt. Dabei zeigten sich für Col1a1 und Col1a2 zu allen Messzeitpunkten eine signifikant höhere Expression bei den PAB-operierten Mäusen im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen (Abb. 24 A/B). Auch bei der Expression von Col3a1 wurde dieser signifikante Unterschied während der ersten drei Messpunkte deutlich (Abb. 24C). Insgesamt war die Expression der drei Kollagenformen bei den PAB-operierten Mäusen nach drei Tagen am stärksten und fiel im weiteren Verlauf ab (Abb. 24 A-C). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den FHL-1-Knockout-Mäusen und den WT-Mäusen festgestellt werden, auch wenn die Expressionswerte bei den PAB-operierten FHL-1-Knockout-Mäusen tendenziell höher lagen als im Vergleich zu den PAB-operierten WT-Mäusen (Abb. 24 A-C).

A



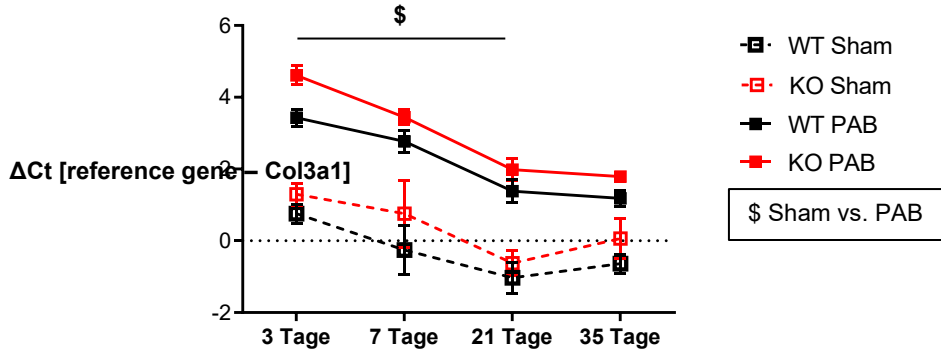
n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	5	5	5	3
7 Tage	4	4	5	4
21 Tage	4	4	5	4
35 Tage	5	5	3	4

B



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	5	5	5	3
7 Tage	4	5	5	4
21 Tage	4	4	5	4
35 Tage	5	4	3	4

C



n-Zahlen	WT Sham	WT PAB	KO Sham	KO PAB
3 Tage	4	4	5	3
7 Tage	5	4	5	4
21 Tage	4	4	5	4
35 Tage	4	4	3	4

Abbildung 24: qRT-PCR Analyse der Col1a1-(A), Col1a2-(B), Col3a1-Expression (C)

Der FHL-1-Knockout beeinflusst nicht die PAB-induzierte Erhöhung der Col1a1-, Col1a2- und Col3a1-Expression in den rechten Ventrikeln. Die Untersuchung der Genexpression in den rechten Ventrikeln von Sham oder PAB-operierten WT- bzw. FHL-1-Knockout-Mäusen erfolgte zu bestimmten Messzeitpunkten (3 Tage, 7 Tage, 21 Tage, 35 Tage). n-Zahlen wie in der Tabelle dargestellt. (\$ $p < 0,05$ Sham vs. PAB). WT = Wildtyp, KO = FHL-1-Knockout, PAB = pulmonalarterielle *banding*, Sham = scheinoperiert.

4 Diskussion

4.1 Limitierungen und Generalisierbarkeit der Studie

Die Methodik in dieser Studie unterliegt, wie in allen wissenschaftlichen Arbeiten, gewissen Limitierungen in Hinblick auf die Interpretierbarkeit und Generalisierbarkeit der Ergebnisse.

Zunächst bietet die Wahl des pulmonalarteriellen *bandings* bei Mäusen als Tiermodell viele Vorteile (siehe Abschnitt 1.3). Auch wenn die unerwünschten Nebenwirkungen eines medikamentösen Knockouts nicht zu erwarten sind, müssen bei einem gentechnischen Knockout immer die Gesamtauswirkungen auf den Organismus betrachtet werden. So zeigen die FHL-1-KO-Mäuse in ihrer Entwicklung und in ihrem Ess- und Trinkverhalten zwar keine Unterschiede zu den Wildtyp-Mäusen (siehe Abschnitt 2.1), dennoch können extrakardiale Auswirkungen des FHL-1-Knockouts nicht ausgeschlossen werden, da FHL-1 nicht nur im Herzmuskel lokalisiert ist, sondern auch in der Skelettmuskulatur, der Lunge, den Nieren und im Gehirn (80). Die Auswirkungen des FHL-1-Knockouts auf diese Organe wurden in dieser Studie nicht betrachtet und könnten auch indirekt Einfluss auf die Herzfunktion haben. Des Weiteren muss bei der Betrachtung der Ergebnisse beachtet werden, dass auch der genetische Hintergrund der Mäuse die Ergebnisse beeinflussen kann (106, 107). In dieser Studie wurde ein Auszucht-Stamm verwendet, welcher im Vergleich zu Inzucht-Stämmen zumeist eine größere genetische Variabilität innerhalb der Individuen aufweist. So kann es unter Umständen notwendig sein, die Anzahl der Versuchstiere zu erhöhen, um signifikante Ergebnisse zu bekommen (106). Auch Folgen für die Vergleichbarkeit mit anderen Studien sind zu beachten, da es je nach verwendetem Mausstamm zu unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen der Herzen auf die erhöhte Druckbelastung kommen kann (59, 108). Daher sollten die Versuche in dieser Studie auch noch mit anderen Mausstämmen durchgeführt werden, um die Ergebnisse zu validieren. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass im Rahmen des PAB ausschließlich die Auswirkungen einer isolierten Druckbelastung des rechten Ventrikels auf ansonsten gesunde Mäuse untersucht wurden. Dies hat den Vorteil, dass andere pulmonale und systemische Einflüsse keine Rolle spielen, jedoch sollte man bei der Übertragbarkeit auf den Menschen berücksichtigen, dass die meisten Patienten, die ein Cor pulmonale entwickeln, multimorbide sind. Somit haben bei diesen Patienten wahrscheinlich auch

Veränderungen in der Lunge und im restlichen Körper Einfluss auf die Funktion des rechten Ventrikels und die dortige Genexpression (41).

Auch die technischen Limitierungen in dieser Studie müssen beachtet werden. So ist es für die Replizierbarkeit der Versuche wichtig, dass bei allen Versuchstieren ein möglichst identischer Stenosegrad der Pulmonalarterie eingestellt wird, der nicht zu einem akuten Rechtsherzversagen führt, sondern zu *remodeling*-Prozessen mit stabiler kardialer Funktion. Es wurde versucht möglichst Mäuse mit gleichem Alter und Gewicht zu verwenden, damit die Pulmonalarterie eine vergleichbare Größe aufweist und letztlich ein vergleichbarer Stenosegrad entsteht. Es ist jedoch zu beachten, dass die FHL-1-Knockout-Mäuse tendenziell leichter sind als die Wildtyp-Mäuse (eigene Beobachtung). Die Verwendung von Titan-Clips in dieser Studie ermöglicht eine konstante Verengung des Durchmessers der Pulmonalarterie auf ca. 0,3 mm, welches einem Stenosegrad von ca. 75 % entspricht (109). Somit wird bei allen PAB-operierten Mäusen ein ähnlicher Stenosegrad erreicht, was zu mehr Homogenität bei den Ergebnissen beiträgt. Die Durchführung von Scheinoperationen an der Kontrollgruppe führt zudem dazu, dass sich die beiden Gruppen nur in der Verengung der Pulmonalarterie unterscheiden und der Einfluss des operativen Eingriffs bei allen Mäusen gleich ist. Insgesamt handelt es sich beim Herz um ein sehr komplexes Organ, welches aus vielen verschiedenen Zelltypen besteht. So gibt es nicht nur zwischen Atrium und Ventrikel funktionelle und strukturelle Unterschiede, sondern auch zwischen den Ventrikeln und innerhalb der verschiedenen Abschnitte eines jeden Ventrikels (Endokard, Myokard, Epikard) (110). Da in dieser Studie für die qRT-PCR Analysen nur jeweils ein kleiner Teil der rechten Ventrikel verwendet wurde, könnten dadurch Schwankungen in den Ergebnissen erklärt werden. Auch die Tatsache, dass die RNA aus Formalin-fixiertem in Paraffin-eingebettetem Gewebe isoliert wurde, kann zu einer gewissen Degradierung der RNA und damit zu Expressionsschwankungen u.a. auch innerhalb einer Gruppe führen. Um weitere Störfaktoren bei der Durchführung und Auswertung der Versuche zu minimieren, wurde stets nach standardisierten Versuchs- und Auswertungsprotokollen vorgegangen. Zudem erfolgte die Auswertung, wann immer möglich, geblindet. Die Unterschiede in den n-Zahlen zwischen den einzelnen Gruppen ergeben sich durch das Versterben einzelner Versuchstiere während der Beobachtungszeit bzw. während der Messungen und anderweitigen Gründen, wodurch eine Messung nicht möglich war. Beobachtungen während der Versuchsdurchführung deuteten darauf hin, dass die FHL-1-Knockout-Mäuse eine andere, fragilere Gefäßstruktur aufweisen könnten und auf Grund dessen möglicherweise anfälliger für

Komplikationen während der Messungen waren. In Hinblick auf die Generalisierbarkeit der Studienergebnisse muss darauf hingewiesen werden, dass auch das Geschlecht einen Einfluss auf die Studienergebnisse haben kann (111). Die Versuche in dieser Studie wurden nur an männlichen Mäusen durchgeführt. Diese bieten den Vorteil, dass sie, im Vergleich zu weiblichen Mäusen, schneller eine ausgeprägte Hypertrophie mit Dilatation und Dekompensation entwickeln, wodurch ein geringerer Beobachtungszeitraum mit homogeneren Ergebnissen möglich ist (112). Auch beim Menschen zeigen Frauen, insbesondere prämenopausal, bei Druckbelastung des Herzens eine insgesamt bessere Herzfunktion und geringere Apoptoseraten der Kardiomyozyten als Männer. Zudem sind einige hypertrophe Kardiomyopathien bei Männern stärker ausgeprägt als bei Frauen (113). Als Ursache für diese geschlechtsspezifischen Unterschiede werden unter anderem die Einflüsse der Sexualhormone, wie Testosteron und Östrogen, auf das Herz und die Gefäße vermutet (114). Auch die Lokalisation des FHL-1-Gens auf dem X-Chromosom könnte zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Genexpression führen (82). Weitere Studien, insbesondere auch solche, die weibliche Versuchstiere miteinbeziehen, sind also notwendig, um die genauen Mechanismen im Rahmen der Rechtsherzhypertrophie zu verstehen und neue Therapieansätze zu finden. Auch die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Mäusen auf den Menschen muss immer kritisch betrachtet werden. Selbst wenn davon auszugehen ist, dass grundlegende physiologische und pathologische Prozesse bei den Säugetieren sehr ähnlich sind, muss beachtet werden, dass Mäuseherzen unter Umständen anders auf genetische Veränderungen und pharmakologische Einwirkungen reagieren als menschliche Herzen. Auch die Herzkinetik und der Aufbau der Kardiomyozyten sind in Teilen unterschiedlich. So kommen in den Kardiomyozyten der Mäuse hauptsächlich die α -MHC Proteine vor, hingegen dominieren in menschlichen Kardiomyozyten die langsameren und energiesparenderen β -MHC Proteine (25). Auch in den N2B-Isoformen des Titins, welche großen Einfluss auf die Compliance der Sarkomere haben, unterscheiden sich Maus und Mensch (110). Daher ist es wichtig, dass weitere Versuche auch an größeren Säugetieren durchgeführt werden, um die Übertragbarkeit auf den Menschen weiter zu verbessern.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

4.2.1 Echokardiographische Parameter

Die Echokardiographie bietet als nicht-invasive Untersuchungsmethode viele Vorteile. Die technologischen Fortschritte der letzten Jahre ermöglichen es, diese Methodik auch bei Mäusen anzuwenden. Es konnten verlässliche Parameter bestimmt werden, die Aussagen über die systolische und diastolische Funktion des rechten Ventrikels erlauben (109).

Ein sehr wichtiger Parameter ist dabei die TAPSE (*tricuspid annular plane systolic excursion*), welche nicht nur die Kontraktilitätsfähigkeit des Ventrikels beschreibt, sondern auch Hinweise auf die systolische und diastolische Funktion gibt (109). Studien zum rechten Ventrikel zeigten, dass es im Rahmen des PAB zu einer Abnahme der TAPSE und somit der rechtsventrikulären Funktion kommt (28, 109). Auch in der eigenen Arbeit wiesen die PAB-operierten Mäuse im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen zu allen Zeitpunkten signifikant niedrigere TAPSE-Werte auf. Ein FHL-1-Knockout bei den PAB-operierten Mäusen führte in dieser Arbeit nach einer Woche zu niedrigeren TAPSE-Werten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Die Kontraktilität und Funktion des rechten Ventrikels könnte sich also eventuell durch den FHL-1-Knockout verschlechtern haben. Dieses Ergebnis steht in einem Gegensatz zu den bisherigen Erkenntnissen zum FHL-1-Knockout im linken Ventrikel, der dort zu einer besseren linksventrikulären Funktion im Rahmen einer TAC führte (99).

Auch die Dicke der freien Wand des rechten Ventrikels (RVWT) dient als Parameter für die Hypertrophie des rechten Ventrikels. Dabei korreliert er unter anderem mit der rechtsventrikulären Funktion (109). Wie auch in anderen Studien, die das PAB-Modell verwendet haben, zeigte sich in dieser Arbeit eine signifikante Verdickung der rechtsventrikulären freien Wand bei den PAB-operierten Mäusen im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen (59, 109). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den PAB-operierten FHL-1-KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen konnte zwar nach drei Wochen festgestellt werden, jedoch ist die biologische Relevanz dieses statistisch signifikanten Unterschieds kritisch zu hinterfragen. Insgesamt konnte kein relevanter Unterschied zwischen den FHL-1-KO- und den Wildtyp-Mäusen in Hinblick auf die Dicke der rechtsventrikulären freien Wand nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führte im linken Ventrikel ein FHL-1-Knockout zu einer verminderten Hypertrophie im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (99). Dies lässt darauf schließen, dass FHL-1 womöglich unterschiedliche Rollen in den jeweiligen Ventrikeln spielt und sich daher

die Erkenntnisse des linken Ventrikels nicht einfach auf den rechten Ventrikel übertragen lassen.

Um die Dilatation des rechten Ventrikels zu erfassen, wurde der rechtsventrikuläre Innendurchmesser (RVID) bestimmt. Eine zunehmende Dilatation des Ventrikels ist Zeichen des Übergangs von der konzentrischen zur exzentrischen Hypertrophie, was im weiteren Verlauf zu einer Dekompensation führen kann (1). Durch das PAB kam es im Rahmen der Versuche in dieser Arbeit, wie auch schon in anderen Studien gezeigt werden konnte, zu einer signifikanten Vergrößerung des RVID im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen (109). Der Vergleich von PAB-operierten FHL-1-KO-Mäusen mit PAB-operierten Wildtyp-Mäusen machte eine signifikant größere Dilatation des rechten Ventrikels bei den FHL-1-KO-Mäusen nach drei Wochen deutlich. Auch zu den anderen Zeitpunkten waren die rechten Ventrikel der FHL-1-KO-Mäuse tendenziell stärker dilatiert als die der Wildtyp-Mäuse. Dies lässt vermuten, dass der FHL-1-Knockout im rechten Ventrikel möglicherweise früher zur Entwicklung einer exzentrischen Hypertrophie beitragen könnte und der Ventrikel somit schneller Gefahr läuft zu dekomensieren. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zu den Beobachtungen im linken Ventrikel, wo ein FHL-1-Knockout zu einer geringeren Dilatation des linken Ventrikels im Rahmen einer TAC führte (99). Welche Mechanismen diesen Unterschieden zwischen rechtem und linkem Ventrikel zugrunde liegen, ist noch unklar. Somit werden weitere Forschungen in dieser Hinsicht benötigt.

4.2.2 Hämodynamische Parameter

Die Messung der hämodynamischen Parameter mittels Rechtsherzkatheter bieten mehrere Vorteile. Zum einen kann die korrekte Obstruktion durch das PAB kontrolliert und zwischen den einzelnen Gruppen verglichen werden, zum anderen geben die erhobenen Werte sehr gut Aufschluss über die Funktionalität des rechten Ventrikels (59, 109).

Die systolischen Blutdruckwerte im rechten Ventrikel (RVSP) waren wie zu erwarten bei den PAB-operierten Mäusen deutlich höher als bei den scheinoperierten Mäusen. Der Druckunterschied von 30-50 mmHg nach drei Wochen zwischen den beiden Versuchsgruppen war dabei ähnlich ausgeprägt wie in vorherigen Studien (59). Zwischen den FHL-1-KO-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen waren keine signifikanten Druckunterschiede festzustellen. Die Tatsache, dass der SAP in allen Gruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum ähnlich war, weist darauf hin, dass das PAB keinen Einfluss auf den systemischen Kreislauf hatte. Somit konnten die spezifischen

Auswirkungen einer isolierten Druckbelastung des rechten Ventrikels untersucht werden.

Ein wichtiger Parameter für die diastolische Funktion des rechten Ventrikels ist der rechtsventrikuläre enddiastolische Druck (RVEDP). Er gibt Hinweise auf die Compliance des rechten Ventrikels. Umso weniger dehnbar der rechte Ventrikel ist, desto höher ist der Druck am Ende der Füllungsphase in der Diastole. Vor allem der Grad der Fibrosierung und die molekularen Veränderungen in den Sarkomeren haben großen Einfluss auf die Compliance des Ventrikels (siehe Kapitel 1.4). In der eigenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass das PAB zu einer signifikanten Erhöhung des RVEDP führte. Dies konnte auch schon in einer anderen Studie aufgezeigt werden (59). Ein Unterschied zwischen den FHL-1-KO-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen konnte hingegen nicht festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass FHL-1 im rechten Ventrikel keinen Einfluss auf den RVEDP hat. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen im linken Ventrikel. Dort zeigten FHL-1-KO-Mäuse im Rahmen einer TAC nach fünf Wochen deutlich niedrigere enddiastolische Drücke als die Wildtyp-Mäuse, sodass zu vermuten ist, dass FHL-1 im linken Ventrikel einen Compliance-verringernenden Einfluss hat (99). Welche molekularen Signalwege Grundlage dieser Unterschiede zwischen rechtem und linkem Ventrikel in Hinblick auf die Rolle des FHL-1 sind, ist bislang unklar und erfordert weitere Untersuchungen.

Um die systolische Funktionalität des rechten Ventrikels genauer zu beurteilen, wurde zudem der Kontraktilitätsindex bestimmt. Dabei wiesen die PAB-operierten Mäuse insgesamt schlechtere Werte auf als die scheinoperierten Mäuse, welches auf die deutlich höhere Druckbelastung zurückzuführen war. Zwischen den FHL-1-KO-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. FHL-1 scheint somit keinen Einfluss auf den Kontraktilitätsindex des rechten Ventrikels zu besitzen.

Des Weiteren wurden die Geschwindigkeit der Blutdruckzunahme (Max dP/dt) und die Geschwindigkeit der Blutdruckverringerng (Min dP/dt) bestimmt, welche Aufschluss über die systolische bzw. die diastolische Funktion des rechten Ventrikels geben. Der starke Anstieg bzw. Abfall dieser Werte bei den PAB-operierten Mäusen im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen ist darauf zurückzuführen, dass beide Parameter von der Höhe der Nachlast abhängig sind und bei steigender Nachlast somit auch ansteigen bzw. abfallen. Beim Vergleich der FHL-1-KO-Mäuse mit den Wildtyp-Mäusen ließen sich keine signifikanten bzw. biologisch relevanten Unterschiede feststellen.

Zur Quantifizierung der Hypertrophie wurde schließlich das Gewicht des rechten Ventrikels in Relation zur Tibialänge gesetzt. Der Vergleich mit der Tibialänge hat den Vorteil, dass Aussagen zur Hypertrophie-Entwicklung gemacht werden können, die unabhängig von der Zunahme des Körpergewichtes sind. Insgesamt entwickelten die PAB-operierten Mäuse eine signifikant stärkere rechtsventrikuläre Hypertrophie als die scheinoperierten Mäuse. Auch in einer anderen Studie konnte diese Auswirkung des PAB gezeigt werden (59). Zwischen den FHL-1-KO-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen konnten hingegen keine Unterschiede festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass FHL-1 keinen entscheidenden Einfluss auf das Gewicht der rechten Ventrikel besitzt. Diese Beobachtung steht wiederum im Gegensatz zu den Erkenntnissen des linken Ventrikels, wo die TAC-operierten FHL-1-KO-Mäuse signifikant niedrigere Werte im Verhältnis von linksventrikulärer Masse zu Körpergewicht aufwiesen als die Wildtyp-Mäuse (99).

4.2.3 Histologische Parameter

Im Rahmen der pathologischen Hypertrophie-Prozesse kommt es durch vermehrte Kollagenbildung zur Fibrosierung des Herzmuskels, was einen negativen Einfluss auf dessen passive Dehnbarkeit und somit auf die diastolische Funktion hat (21, 25). Zudem verliert das Muskelgewebe durch die Fibrosierung an Homogenität und neigt schneller zu Arrhythmien (25). In der eigenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in Folge einer chronischen Druckbelastung des rechten Ventrikels zu einer signifikant vermehrten Fibrosierung des Muskelgewebes kam. Auch andere Studien konnten diesen Effekt des PAB nachweisen (28, 59). Verantwortlich für die Kollagenbildung sind die Fibroblasten, die verteilt zwischen den Kardiomyozyten liegen und die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (EZM) beeinflussen (38). Sie sorgen im gesunden Herzen für ein Gleichgewicht zwischen Kollagenaufbau und -abbau und der Sekretion von MMPs, Zytokinen und Wachstumsfaktoren (115). Dabei werden sie von vielen verschiedenen Zellen, wie beispielsweise Kardiomyozyten, Makrophagen, Mastzellen und Endothelzellen, beeinflusst (115). Es konnte gezeigt werden, dass es im Laufe einer chronischen Druckbelastung zu einer Umwandlung der Fibroblasten zu Myofibroblasten kommen kann, welches zu einer erhöhten Kollagenproduktion führt (115). Inwieweit dies auch im rechten Ventrikel geschieht, ist bislang unklar. Auch der Zusammenhang zwischen FHL-1 und der Fibrosierung ist noch nicht eindeutig geklärt. Im linken Ventrikel beeinflusste ein FHL-1-KO nicht den Fibrosierungsgrad des Herzmuskels im Rahmen einer TAC (99). Hingegen konnte in der eigenen Arbeit

gezeigt werden, dass nach einer Woche der Kollagenanteil bei den PAB-operierten FHL-1-KO-Mäusen höher lag als bei den PAB-operierten Wildtyp-Mäusen. Auch nach drei bzw. fünf Wochen waren die Kollagenanteile bei den FHL-1-KO-Mäusen tendenziell höher. Nach drei Tagen waren noch keine Unterschiede im Fibrosierungsgrad zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festzustellen, was daran liegen könnte, dass es eine gewisse Zeit dauert, bis die Kollagen-bildenden Prozesse anlaufen und sich das Kollagen in der EZM formiert. Diese Verzögerung zeigte sich auch schon in einer ähnlichen Studie, bei der unter anderem die Auswirkungen des PAB auf den rechten Ventrikel untersucht wurden (116). Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass FHL-1 womöglich einen protektiven Effekt in Hinblick auf die Fibrosierung im rechten Ventrikel bei chronischer Druckbelastung besitzt. Wie diese protektive Wirkung des FHL-1 zustande kommt, ist jedoch noch unklar und benötigt weitere Forschungen.

Eine zentrale Rolle in der Reaktion des Herzens auf eine chronische Druckbelastung spielen die Kardiomyozyten. Sie verlieren in der neonatalen Phase die Fähigkeit zur Mitose und können daher nur mit Hypertrophie auf eine erhöhte Druckbelastung reagieren (22). In der eigenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass das PAB gut geeignet ist eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zu induzieren. Auch in anderen Studien führte das PAB durch die chronische Druckbelastung zu einer solchen Hypertrophie im rechten Ventrikel (28, 59). Die Wahrnehmung der erhöhten Druckbelastung läuft über verschiedenen Sensoren für biomechanischen Stress, welche im Kapitel 1.4 beschrieben wurden. Sie initiieren Signalwege, welche letztlich dazu führen, dass die Kardiomyozyten hypertrophieren. Die Rolle von FHL-1 in diesen Signalwegen ist noch nicht ausreichend geklärt. Untersuchungen am linken Ventrikel konnten zeigen, dass FHL-1 mit der N2B-Region des Titins in den Sarkomeren assoziiert und somit Teil eines Sensors für biomechanischen Stress ist. Dabei interagiert es mit den Gq- und Raf-1/MEK/ERK-Signalwegen. Ein FHL-1-Knockout führte bei diesen Untersuchungen zu einer geringeren Hypertrophie der Kardiomyozyten des linken Ventrikels im Rahmen einer TAC im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (99). In der eigenen Arbeit konnte der Hypertrophie-verringende Effekt eines FHL-1-Knockouts nicht gezeigt werden. Eventuell entwickelten die PAB-operierten FHL-1-KO-Mäuse nach einer Woche sogar eine größere Hypertrophie als die PAB-operierten Wildtyp-Mäuse. Der FHL-1-Knockout hatte also im rechten Ventrikel in dieser Hinsicht keinen protektiven Effekt. Dass sich die Kardiomyozyten-Größen der PAB-operierten FHL-1-KO-Mäuse und Wildtyp-Mäuse im weiteren Verlauf

immer mehr annäherten, kann ein Hinweis darauf sein, dass es weitere Hypertrophie-induzierende Signalwege gibt, die unabhängig von FHL-1 ablaufen. Es ist wichtig, diese Signalwege weiter zu untersuchen, um ein mögliches Schlüsselmolekül als neues therapeutisches Angriffsziel zu finden, welches allen Signalwegen gemeinsam ist.

Ein weiterer wichtiger Faktor im Rahmen der Reaktion auf eine chronische Druckbelastung des Herzens ist die Kapillarisation des Myokards. Durch die Hypertrophie der Kardiomyozyten steigt deren Sauerstoff- und Nährstoffbedarf (30). Im Rahmen einer physiologischen adaptiven Hypertrophie, beispielsweise in Folge von Ausdauertraining, kommt es auch zu einer Zunahme der Kapillarenanzahl, sodass die Sauerstoffversorgung der Kardiomyozyten gewährleistet ist (115). Die pathologische maladaptive Hypertrophie geht hingegen nicht mit einer Erhöhung der Kapillarenanzahl einher, sodass es zur Abnahme der Kapillarendichte kommt. Die Versorgung der Kardiomyozyten mit Nährstoffen und Sauerstoff wird somit also immer schlechter und die Vulnerabilität für ischämische Insulte steigt (30). Welche Mechanismen die adaptive und maladaptive Hypertrophie unterscheiden, ist momentan Gegenstand der Forschung und hat als Ziel, neue therapeutische Möglichkeiten aufzudecken (112, 115). Der Einfluss von FHL-1 auf die Angiogenese ist noch nicht ausreichend geklärt. Im linken Ventrikel entwickelten die FHL-1-KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verstärkte Angiogenese (78). In der eigenen Arbeit konnte hingegen kein Einfluss eines FHL-1-Knockouts auf die Kapillarisation nachgewiesen werden. Die signifikant höheren Quotienten bei den PAB-operierten Mäusen im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen lassen vermuten, dass es im Rahmen des PAB zu einer Induktion der Angiogenese kommt. Es kam nämlich zu einem Anstieg des Quotienten aus Kapillarenanzahl zu Kardiomyozytenanzahl. Insgesamt konnte jedoch kein Einfluss von FHL-1 auf die Kapillarisation im rechten Ventrikel gezeigt werden. Erneut wurde deutlich, dass sich Erkenntnisse über den linken Ventrikel nicht ohne weiteres auf den rechten Ventrikel übertragen lassen.

4.2.4 Molekularbiologische Parameter

Um die Rolle von FHL-1 auf die molekularen Prozesse in den Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Genexpression verschiedener Hypertrophiemarker untersucht. Zunächst konnte gezeigt werden, dass durch die chronische Druckbelastung des rechten Ventrikels im Rahmen des PAB die Expression

des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP) signifikant anstieg. Dies konnte auch schon in anderen Studien mit PAB beobachtet werden (59, 109). ANP und BNP werden, in Folge der erhöhten Wanddehnung durch die Druckbelastung, in den Kardiomyozyten vermehrt gebildet und sezerniert (21). Sie sorgen über eine Aktivierung der membranständigen Guanylylcyclase für eine Erhöhung der cGMP-Konzentration in den glatten Muskelzellen und bewirken somit eine Vasodilatation, sodass die Druckbelastung für das Herz sinkt (1, 17, 21). Die Beziehung zwischen FHL-1 und BNP bzw. ANP im rechten Herzen ist bislang noch unklar. In der eigenen Arbeit konnte kein Einfluss eines FHL-1-Knockouts auf die BNP- bzw. ANP-Expression gezeigt werden. Dies lässt vermuten, dass es mehrere Sensoren in den Kardiomyozyten gibt, die die erhöhte Druckbelastung wahrnehmen und Signalwege aktivieren, die, unabhängig von FHL-1, zu einer Expression von ANP und BNP führen (21, 76).

Des Weiteren wurde die Expression von Phospholamban (Plb), des Ryanodin-Rezeptors Typ 2 (Ryr2) und der Kalzium-transportierenden ATPase Typ 2 (ATP2A2) untersucht, welche vor allem für den Kalzium-Haushalt in den Kardiomyozyten von Bedeutung sind. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen des PAB zu einer Runterregulation der Expression von ATP2A2 und Phospholamban kommen kann, welches womöglich durch die Störung der Kalzium-Homöostase zu einer diastolischen Dysfunktion beiträgt (109). In der eigenen Arbeit konnte beim Vergleich der PAB-operierten Mäuse mit den scheinoperierten Mäusen nur eine tendenzielle Verminderung der Expression von Phospholamban, Ryr2 und ATP2A2 festgestellt werden. Ein Einfluss von FHL-1 auf die Expression dieser Gene konnte nicht gezeigt werden.

Bei der Untersuchung der Genexpression der Muskelproteine α -MHC und β -MHC konnte in dieser Studie eine tendenzielle Verringerung der α -MHC-Expression bei gleichzeitig signifikanter Hochregulierung der β -MHC-Expression in den PAB-operierten Mäusen beobachtet werden. Diese sog. Aktivierung des fetalen Genprogramms durch das PAB konnte auch schon in anderen Studien gezeigt werden (30, 109). Dabei kommt es zu einem Wechsel von der α -MHC mit schneller ATPase-Aktivität zu der β -MHC mit langsamer ATPase-Aktivität, wodurch langfristig der Energieverbrauch der Zelle gesenkt werden soll (17, 25, 55, 56). Auch beim Menschen konnten Veränderungen in der Expression der Mhc-Proteine bei Patienten mit Herzinsuffizienz gezeigt werden (56). In wie weit diese Veränderungen jedoch auch Auswirkungen auf die Funktion des menschlichen Herzens haben, ist bislang noch

unklar, da in menschlichen Herzen auch unter physiologischen Bedingungen mehr β -MHC als α -MHC exprimiert wird (56, 117). Im linken Ventrikel führte ein FHL-1-Knockout bei TAC-operierten Mäusen zu einer geringeren Expression von β -MHC als im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (99). Ein solcher Einfluss von FHL-1 auf die β -MHC-Expression konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden. Auch die α -MHC-Expression wurde durch den FHL-1-Knockout nicht beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass FHL-1 im rechten Ventrikel wahrscheinlich nicht in den Signalwegen, die die Expression der Mhc-Gene regulieren, involviert ist.

In Hinblick auf die Expression der Kollagen-Gene Col1a1, Col1a2 und Col3a1 konnte in dieser Studie eine signifikant stärkere Expression bei den PAB-operierten Mäusen im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen festgestellt werden. Auch in anderen Studien konnten ähnliche Effekte des PAB auf Expression der Kollagen-Gene nachgewiesen werden (59, 109, 109). Vor allem die Kollagene I und III spielen bei der Fibrosierung, die in Folge der erhöhten Druckbelastung im rechten Ventrikel auftritt, eine wichtige Rolle und beeinflussen die Funktion des Ventrikels (25, 38). Die Maxima der Expressionswerte waren schon nach drei Tagen erreicht, welches für eine sehr schnelle Aktivierung der für die Fibrosierung verantwortlichen Gene durch das PAB spricht. In einer anderen Studie wurden diese Maxima erst nach einer Woche erreicht (59). Ursache für diesen zeitlichen Unterschied könnten unter anderem die unterschiedlichen Mausstämme sein, die verwendet wurden. Wie bereits in Kapitel 4.1 erwähnt kann es je nach verwendetem Mausstamm zu unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen der Herzen auf die erhöhte Druckbelastung kommen (59, 108). Es ist zu beachten, dass Black Swiss Mäuse als Auszuchtstamm eine größere genetische Heterogenität aufweisen als Inzuchtstämme, welches Expressionsschwankungen innerhalb der Gruppe erklären könnte (106). Es ist zu vermuten, dass die rechten Ventrikel der in der eigenen Arbeit verwendeten Black Swiss Mäuse schneller mit einer Fibrosierung auf eine Druckbelastung reagieren als andere Mausstämme. Die in dieser Studie beobachteten abfallenden Expressionswerte der Kollagen-Gene im weiteren Verlaufe wurden auch in einer anderen Studie sichtbar (59). Die Ursachen für diesen Abfall sind jedoch noch unklar. Signifikante Unterschiede zwischen den FHL-1-Knockout-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen in Hinblick auf die Expression der Kollagen-Gene konnten in der eigenen Arbeit nicht beobachtet werden. Jedoch zeigten die PAB-operierten FHL-1-KO Mäuse tendenziell eine stärkere Expression der Kollagen-Gene als die PAB-operierten Wildtyp-Mäuse. Diese Tendenz steht auch im Einklang mit den Beobachtungen aus den histologischen

Untersuchungen der Fibrosierung in den rechten Ventrikel, bei denen die PAB-operierten FHL-1-KO Mäusen nach drei Tagen signifikant höhere Fibrosierungsgrade aufwiesen als die PAB-operierten Wildtyp-Mäuse (siehe Kapitel 3.3.1 und 4.2.3). Dies lässt vermuten, dass FHL-1 im rechten Ventrikel bei Druckbelastung eher einen protektiven Effekt hinsichtlich der Fibrosierung hat. Im linken Ventrikel zeigte FHL-1 hingegen keine Effekte auf die Fibrosierung bei Druckbelastung (99). FHL-1 scheint also auch in Hinblick auf die Regulation der Kollagenbildung in den jeweiligen Ventrikeln eine unterschiedliche Rolle zu spielen.

4.3 Fazit

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die in der Arbeitshypothese formulierte Vermutung, ein FHL-1-Knockout würde sich positiv auf die Funktion des rechten Ventrikels bei chronischer Druckbelastung auswirken, nicht belegt werden konnte. Es zeigte sich vielmehr tendenziell ein gegenteiliges Ergebnis. Die Erkenntnisse über die Rolle von FHL-1 im linken Ventrikel hinsichtlich der Hypertrophie-Entwicklung, der Dilatation des Ventrikels, der ventrikulären Funktion sowie der Fibrosierung und der Angiogenese konnten in dieser Studie nicht für den rechten Ventrikel aufgezeigt werden. Es wurde sehr deutlich, dass Ergebnisse des linken Ventrikels nicht ohne weiteres auf den rechten Ventrikel übertragen werden können. Dies ist möglicherweise auf die unterschiedliche embryonale Herkunft der Ventrikel zurückzuführen (32, 35). Dadurch kommt es in den beiden Ventrikeln zur Expression unterschiedlicher Gene, und auch der Expressionsgrad identischer Gene ist unter Umständen im linken Ventrikel in einem anderen Maße ausgeprägt als im rechten Ventrikel (41, 43). Schon in anderen Studien zeigte der rechte Ventrikel im Vergleich zum linken Ventrikel unterschiedliche Reaktionen auf beispielsweise Norepinephrin oder eine Stimulierung der alpha-1-adrenergen Rezeptoren (44, 45). Auch eine Volumenbelastung führt in den jeweiligen Ventrikeln zu unterschiedlichen Anpassungsvorgängen (48). Die Bestimmung der basalen FHL-1-Expression in beiden Ventrikeln könnte demnach hilfreich sein, die unterschiedliche Rolle von FHL-1 in den beiden Ventrikeln genauer zu verstehen. Die Erforschung dieser möglichen Unterschiede könnte in Zukunft dabei helfen, neue Herzkammer-spezifische Therapeutika zu entwickeln.

In Hinblick auf die Rolle von FHL-1 im rechten Ventrikel wäre es sinnvoll, im weiteren Verlauf nach neuen Interaktionspartnern zu suchen, um besser verstehen zu können, in welche Signalwege FHL-1 involviert ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nämlich vermuten, dass es im rechten Ventrikel mehrere Sensoren für biomechanischen Stress

gibt, deren Signalkaskaden teilweise unabhängig voneinander ablaufen. Zudem hat auch die Art des biomechanischen Stresses Einfluss auf die Reaktion des Herzens (118). So kommt es bei Druckbelastung des rechten Ventrikels zu anderen Anpassungsvorgängen als bei Volumenbelastung (119). Daher könnten auch Untersuchungen zur Rolle von FHL-1 bei Volumenbelastung zu neuen Erkenntnissen über dessen Funktion führen.

5 Zusammenfassung

Bei der pulmonalen Hypertonie ist die Kompensationsfähigkeit des rechten Ventrikels der lebenslimitierende Faktor. Daher ist dieser und die in ihm ablaufenden Anpassungsvorgänge bei erhöhter Druckbelastung Gegenstand intensiver Forschung. Insbesondere die Wahrnehmung der erhöhten Druckbelastung im rechten Ventrikel und die daraus resultierenden Umbauprozesse sind wichtige Aspekte, um die Pathophysiologie genauer zu verstehen und neue spezifische Therapieansätze zu entwickeln.

Das zytoskelettale Signalprotein FHL-1 könnte eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielen. Untersuchungen am linken Ventrikel konnten nachweisen, dass FHL-1-Knockout-Mäuse eine abgeschwächte Reaktion auf eine chronische Druckbelastung zeigten und somit gegenüber einer Linksherzhypertrophie geschützt waren.

Über die Rolle von FHL-1 im rechten Ventrikel ist bisher nur sehr wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob ein FHL-1-Knockout auch im rechten Ventrikel einen protektiven Faktor bei chronischer Druckbelastung darstellt. Dazu wurde mittels pulmonalarteriellen *banding* (PAB) eine chronische Druckbelastung in den rechten Ventrikeln generiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten echokardiographische und hämodynamische Funktionsparameter sowie histologische und biomolekulare Veränderungen zwischen Wildtyp- und FHL-1-Knockout-Mäusen verglichen. In den Ergebnissen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den FHL-1-Knockout- und den Wildtyp-Mäusen. Das PAB führte zu einem erhöhten rechtsventrikulären Druck, einer vergrößerten rechtsventrikulären Wandstärke und einer Kammerdilatation sowie zu einer verschlechterten rechtsventrikulären Funktion. Auch in den histologischen Untersuchungen zeigte sich eine Rechtsherzhypertrophie infolge des PAB in Form von vergrößerten Kardiomyozyten. Des Weiteren fielen eine verstärkte Fibrosierung und eine erhöhte Kapillarenanzahl auf. Auf biomolekularer Ebene kam es zu einem Anstieg in der Expression von Hypertrophie- und Kollagen-Genen. Die Expression von Genen der Kalzium-Homöostase blieb durch das PAB unverändert. Insgesamt zeigte sich in keinem der erfassten Parameter einen Einfluss durch den FHL-1-Knockout. Somit wurde deutlich, dass sich die pathophysiologischen Signalwege im Rahmen einer chronischen Druckbelastung im linken und rechten Ventrikel unterscheiden.

6 Summary

The ability of the right ventricle to compensate the pressure overload is the life-limiting factor in pulmonary hypertension. Therefore the right ventricle and its adaptation processes to pressure overload are subjects of intensive research. Especially the perception of elevated pressure and the following remodeling processes are important to understand the underlying pathophysiology and to develop new specific therapies.

The cytoskeletal signalling protein FHL-1 could play an important role in these processes. Studies on the left ventricle revealed that FHL-1 knockout mice possessed an attenuated reaction to chronic pressure overload and seem to be protected against left heart hypertrophy.

So far, the role of FHL-1 in right heart hypertrophy has not been addressed. The aim of the present study was to examine whether a FHL-1 knockout is also a protective factor in the right ventricle in case of chronic pressure overload. For this purpose a chronic right ventricle pressure overload was generated by pulmonary arterial banding (PAB). Echocardiographic and haemodynamic parameters as well as potential histological and biomolecular alterations were assessed at different time point post banding experiments and compared between FHL-1 knockout and wildtype mice. The results demonstrated no significant differences between the FHL-1 knockout and wildtype mice. PAB induced an increase in right ventricular pressure, increased right ventricular wall thickness and chamber dilation and impaired right ventricular function. Histological examinations revealed an increase in cardiomyocyte size and thus confirmed right heart hypertrophy following PAB. Furthermore an enhanced fibrosis and increased number of capillaries could be found. Biomolecular examinations showed an increase in the expression of hypertrophic and collagen genes. The expressions of genes of the calcium homeostasis were not changed after PAB. Finally, none of the parameters assessed was influenced by FHL-1 knockout. In conclusion, the present study shows that pathophysiological pathways activated following chronic pressure overload might differ in left and right heart.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Aufbau der quergestreiften Muskulatur (1)	11
Abbildung 2: Doppel-Zink-Finger-Struktur der LIM-Proteine (77)	21
Abbildung 3: Versuchsablauf der einzelnen Gruppen	33
Abbildung 4: Bestimmung des Kollagenanteils in den rechten Ventrikeln	37
Abbildung 5: Kardiomyozyten-/Kapillaren-Färbung (63x)	38
Abbildung 6: Bestimmung der Kardiomyozyten-Anzahl	39
Abbildung 7: Bestimmung der Kardiomyozyten-Größe	40
Abbildung 8: Bestimmung der Kapillaren-Anzahl	40
Abbildung 9: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE)	45
Abbildung 10: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT)	46
Abbildung 11: Rechtsventrikulärer Innendurchmesser (RVID)	47
Abbildung 12: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP)	48
Abbildung 13: Systemischer arterieller Blutdruck (SAP)	49
Abbildung 14: Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (RVEDP)	50
Abbildung 15: Kontraktilitätsindex (Contractility index)	51
Abbildung 16: Geschwindigkeit der Blutdruckerhöhung (A) bzw. -verringern (B) während der isovolumetrischen Kontraktion	53
Abbildung 17: Verhältnis von der Masse des rechten Ventrikels zur Länge der Tibia	53
Abbildung 18: Histologische Bestimmung des Kollagenanteils	55
Abbildung 19: Histologische Bestimmung der Kardiomyozyten-Größe	57
Abbildung 20: Histologische Bestimmung der Kapillarisation	61
Abbildung 21: qRT-PCR der Genexpression von ANP (A) und BNP (B)	63
Abbildung 22: qRT-PCR Analyse der Plb-(A), Ryr2-(B) und Atp2a2-Expression (C)	65
Abbildung 23: qRT-PCR Analyse der α -MHC-(A) und β -MHC-Expression (B)	67
Abbildung 24: qRT-PCR Analyse der Col1a1-(A), Col1a2-(B), Col3a1-Expression (C)	69

Tabellen:

Tabelle 1: Einteilung der pulmonalen Hypertonie nach der Konferenz von Nizza 2013.	1
Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer	30
Tabelle 3: Übersicht über die Gruppeneinteilung	32
Tabelle 4: Färbeprotokoll der Sirius-Red Färbung	36
Tabelle 5: Färbeprotokoll der Kardiomyozyten-/Kapillaren-Färbung	37

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A-Bande	Anisotrope Bande
AC6	Adenylyl Cyclase 6
ACE	Angiotensin converting enzyme
ALK1	Activin receptor-like kinase 1
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APAH	Assoziierte pulmonalarterielle Hypertonie
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
ATP	Adenosintriphosphat
Atp2a2	ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ Transporting 2
ATPase	Adenosintriphosphatase
B2M	β ₂ -Mikroglobulin
B2M	β ₂ -Mikroglobulin
BMP	bone morphogenic protein
BMPR2	Bone morphogenic protein receptor type 2
BNP	Brain natriuretic Peptide
BSA	Bovine serum albumin
Bw	Body weight
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAV1	Caveolin 1
cDNA	complementary DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CI	Cardiac Index
cm	Zentimeter
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPFE	combined pulmonary fibrosis and emphysema
CT	Computertomographie
CTEPH	Chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> Wert
d	Durchmesser
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dPAP	diastolischer pulmonalarterieller Druck (diastolic pulmonary arterial pressure)
EGR1	Early growth response protein 1
EKG	Echokardiographie
ENG	Endoglin
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
F-Aktin	filamentäres Aktin

FGF	Fibroblast Growth Factor
FHL-1	Four-and-a-half LIM domain protein 1
g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin
Gq	Phospholipase C gekoppeltes Guanosintriphosphat-bindendes Protein
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HIF-1 α	Hypoxia-inducible Factor-1 α
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPAH	Hereditäre pulmonalerterielle Hypertonie
HR-CT	High resolution Computertomographie
H-Zone	Hensen-Zone
IB4-TRITC	Isolektin B4-Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat
I-Bande	Isotrope Bande
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPAH	Idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
K	Wandspannung
K ⁺	Kalium-Ion
KCNK3	Potassium channel subfamily K member 3
kDa	Kilodalton
KDM4A	Lysin-spezifische Demethylase 4A
kg	Kilogramm
l	Liter
LOT	Langzeitsauerstofftherapie (long-term oxygen therapy)
LV	Linker Ventrikel
m	Meter
MAP	Mean arterial pressure (mittlerer arterieller Druck)
MAP2-Kinase	Mitogen-activated protein kinase 2
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase (auch MAP2K genannt)
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MHC	Myosin heavy chain
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
M-Linie	Mittel-Linie
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mPAP	mittlerer Pulmonalarteriendruck (mean pulmonary arterial pressure)
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
MyBP-C	Myosin-bindenden Protein-C
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NT-proBNP	N-terminales Propeptid des Brain natriuretic Peptide
P	Druck
PAB	Pulmonalarterielle <i>banding</i>
PAWP	pulmonal arterieller Verschlussdruck (<i>pulmonary arterial wedge pressure</i>)
PCH	pulmonalkapilläre Hämangiomatose
PCR	Polymerase chain reaction
PDE5	Phosphodiesterase-5
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEA	pulmonale Enderarteriektomie
PEVK-Segment/Region	Prolin (P)-Glutamat (E)-Valin (V)- Lysin (K)-reiches Segment
PHF	Primäres Herzfeld
PKA	Protein-Kinase-A
Plb	Phospholamban
PPAR α/β	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor α/β
PPHN	Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen
PVOD	Pulmonale venookklusive Erkrankung (<i>pulmonary venoocclusive disease</i>)
PVR	pulmonalvaskuläre Widerstand (<i>pulmonary vascular resistance</i>)
qRT-PCR	Quantitative real time PCR
r	Radius
RAAS-System	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raf-Protein	rapidly accelerated fibrosarcoma protein
RBO-Jk	Recombining binding protein for immunoglobulin kappa J region
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RV	Rechter Ventrikel
RVEDP	Right ventricular enddiastolic pressure
RVID	Right ventricular internal diameter
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Druck
RVWT	Right ventricular free wall thickness
Ryr2	Ryanodin Rezeptor Typ 2
s	Sekunde
S	Septum
SAP	systemischer arterieller Druck
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
sGC	Lösliche (<i>soluble</i>) Guanylatcyclase
SHF	Sekundäres Herzfeld
SMAD9	SMAD Family Member 9
sPAP	systolische pulmonalarterielle Druck (<i>systolic pulmonary arterial pressure</i>)
TAC	Transverse aortic constriction
TAPSE	Tricuspid annular plane systolic excursion
TBS	Tris-buffered saline
Tei-Index	Myocardial performance index (MPI)
TGF- α	Transforming growth factor α

TL	Tibia-Länge
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethane
USP15	Ubiquitin-spezifische Protease 15
v/v	Volumen/Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WGA-FITC	Wheat germ agglutinin-Fluorescein Isothiocyanat
Z-Scheibe	Zwischen-Scheibe

9 Literaturverzeichnis

1. Pape H-C, Klink R, Brenner B, Silbernagl S, editors. Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG; 2014. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-98019>.
2. Hoepfer MM, Ghofrani H-A, Grunig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S. Pulmonary Hypertension. *Dtsch Arztebl Int* 2017; 114(5):73–84.
3. Herold G, editor. Innere Medizin 2016: Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Selbstverl.; 2016.
4. Opitz C, Rosenkranz S, Ghofrani HA, Grunig E, Klose H, Olschewski H et al. ESC-Leitlinie 2015: Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie. *Dtsch Med Wochenschr* 2016; 141(24):1764–9.
5. Hoepfer MM, Huscher D, Pittrow D. Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *Int J Cardiol* 2016; 203:612–3.
6. Chin KM, Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(16):1527–38.
7. Hoepfer MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K et al. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med* 2016; 4(4):306–22.
8. Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 2001; 92(1):1–20.
9. Dietel M, Suttorp N, Zeitz M. *Harrisons Innere Medizin: Deutsche Ausgabe*. 18. Aufl.: ABW Wissenschaftsverlag. (vol 2).
10. Rosenkranz S, Ghofrani HA, Grunig E, Klose H, Olschewski H, Opitz C et al. Pulmonale Hypertonie: Kolner Konsensus-Konferenz 2016. *Dtsch Med Wochenschr* 2016; 141(24):1778–82.
11. Rosenkranz S. Pulmonary hypertension 2015: current definitions, terminology, and novel treatment options. *Clin Res Cardiol* 2015; 104(3):197–207.
12. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991; 115(5):343–9.
13. Sandoval J, Bauerle O, Palomar A, Gomez A, Martinez-Guerra ML, Beltran M et al. Survival in primary pulmonary hypertension. Validation of a prognostic equation. *Circulation* 1994; 89(4):1733–44.
14. Steiner S, Strauer BE. Pathophysiology of the right ventricle in lung diseases. *Internist (Berl)* 2009; 50(9):1054, 1056-8, 1060, passim.
15. Leschke M, Wadlich A. Rechtsherzinsuffizienz und Cor pulmonale. *Internist (Berl)* 2007; 48(9):948–60.

16. Vizza CD, Lynch JP, Ochoa LL, Richardson G, Trulock EP. Right and left ventricular dysfunction in patients with severe pulmonary disease. *Chest* 1998; 113(3):576–83.
17. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(25 Suppl):D22–33.
18. Incalzi RA, Fuso L, Rosa M de, Di Napoli A, Basso S, Pagliari G et al. Electrocardiographic signs of chronic cor pulmonale: A negative prognostic finding in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 1999; 99(12):1600–5.
19. Tei C, Dujardin KS, Hodge DO, Bailey KR, McGoon MD, Tajik AJ et al. Doppler echocardiographic index for assessment of global right ventricular function. *J Am Soc Echocardiogr* 1996; 9(6):838–47.
20. Park SY, Lee CY, Kim C, Jang SH, Park YB, Park S et al. One-year prognosis and the role of brain natriuretic peptide levels in patients with chronic cor pulmonale. *J Korean Med Sci* 2015; 30(4):442–9.
21. Haworth SG. The cell and molecular biology of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *European Heart Journal Supplements* 2007; 9(Suppl H):H10–H16.
22. Till U. Pathophysiologie, Pathobiochemie systematisch. 1. Aufl. Bremen: UNI-MED-Verl.; 1999. (Klinische Lehrbuchreihe).
23. Handoko ML, Man FS de, Allaart CP, Paulus WJ, Westerhof N, Vonk-Noordegraaf A. Perspectives on novel therapeutic strategies for right heart failure in pulmonary arterial hypertension: lessons from the left heart. *Eur Respir Rev* 2010; 19(115):72–82.
24. Vonk Noordegraaf A, Galie N. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* 2011; 20(122):243–53.
25. Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* 2009; 135(3):794–804.
26. Haddad F, Ashley E, Michelakis ED. New insights for the diagnosis and management of right ventricular failure, from molecular imaging to targeted right ventricular therapy. *Curr Opin Cardiol* 2010; 25(2):131–40.
27. Nagendran J, Michelakis ED. Mitochondrial NOS is upregulated in the hypoxic heart: implications for the function of the hypertrophied right ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296(6):H1723–6.
28. Kojonazarov B, Luitel H, Sydykov A, Dahal BK, Paul-Clark MJ, Bonvini S et al. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist GW0742 has direct protective effects on right heart hypertrophy. *Pulm Circ* 2013; 3(4):926–35.
29. Nagendran J, Archer SL, Soliman D, Gurtu V, Moudgil R, Haromy A et al. Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right

- ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* 2007; 116(3):238–48.
30. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Ninth edition. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2015. (Student Consult).
31. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 2006; 313(5795):1922–7.
32. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 2005; 6(11):826–35.
33. Drake JI, Bogaard HJ, Mizuno S, Clifton B, Xie B, Gao Y et al. Molecular signature of a right heart failure program in chronic severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45(6):1239–47.
34. Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR et al. 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* 2006; 114(17):1883–91.
35. Chien KR, Domian IJ, Parker KK. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science* 2008; 322(5907):1494–7.
36. Gautel M. The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Curr Opin Cell Biol* 2011; 23(1):39–46.
37. Gautel M, Djinovic-Carugo K. The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion. *J Exp Biol* 2016; 219(Pt 2):135–45.
38. Schmidt RF, Lang F, editors. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*. 30., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007. (Springer-Lehrbuch). Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-32910-7>.
39. Kho AL, Perera S, Alexandrovich A, Gautel M. The sarcomeric cytoskeleton as a target for pharmacological intervention. *Curr Opin Pharmacol* 2012; 12(3):347–54.
40. Han MK, McLaughlin VV, Criner GJ, Martinez FJ. Pulmonary diseases and the heart. *Circulation* 2007; 116(25):2992–3005.
41. Urashima T, Zhao M, Wagner R, Fajardo G, Farahani S, Quertermous T et al. Molecular and physiological characterization of RV remodeling in a murine model of pulmonary stenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295(3):H1351–H1368.
42. Reddy S, Zhao M, Hu D-Q, Fajardo G, Hu S, Ghosh Z et al. Dynamic microRNA expression during the transition from right ventricular hypertrophy to failure. *Physiol Genomics* 2012; 44(10):562–75.
43. Kreymborg Kg, Uchida S, Gellert P, Schneider A, Boettger T, Voswinckel R et al. Identification of right heart-enriched genes in a murine model of chronic outflow tract obstruction. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49(4):598–605.
44. Irlbeck M, Muhling O, Iwai T, Zimmer HG. Different response of the rat left and right heart to norepinephrine. *Cardiovasc Res* 1996; 31(1):157–62.

45. Wang G-Y, McCloskey DT, Turcato S, Swigart PM, Simpson PC, Baker AJ. Contrasting inotropic responses to alpha1-adrenergic receptor stimulation in left versus right ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(4):H2013-7.
46. Kasimir M-T, Seebacher G, Jaksch P, Winkler G, Schmid K, Marta GM et al. Reverse cardiac remodelling in patients with primary pulmonary hypertension after isolated lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 26(4):776–81.
47. Hwang DM, Dempsey AA, Lee CY, Liew CC. Identification of differentially expressed genes in cardiac hypertrophy by analysis of expressed sequence tags. *Genomics* 2000; 66(1):1–14.
48. Modesti PA, Vanni S, Bertolozzi I, Cecioni I, Lumachi C, Perna AM et al. Different growth factor activation in the right and left ventricles in experimental volume overload. *Hypertension* 2004; 43(1):101–8.
49. Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S et al. Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31(1):202–8.
50. King L, Wilkins MR. Natriuretic peptide receptors and the heart. *Heart* 2002; 87(4):314–5.
51. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M et al. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(8):4239–44.
52. Buermans HPJ, Redout EM, Schiel AE, Musters RJP, Zuidwijk M, Eijk PP et al. Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure. *Physiol Genomics* 2005; 21(3):314–23.
53. Pokreisz P, Marsboom G, Janssens S. Pressure overload-induced right ventricular dysfunction and remodelling in experimental pulmonary hypertension: The right heart revisited. *European Heart Journal Supplements* 2007; 9(Suppl H):H75-H84.
54. Bar H, Kreuzer J, Cojoc A, Jahn L. Upregulation of embryonic transcription factors in right ventricular hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 2003; 98(5):285–94.
55. Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van-Bilsen M, O'Brien TX et al. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol* 1993; 55:77–95.
56. Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaife RA et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 1997; 100(9):2315–24.
57. Oikawa M, Kagaya Y, Otani H, Sakuma M, Demachi J, Suzuki J et al. Increased 18Ffluorodeoxyglucose accumulation in right ventricular free wall in patients with pulmonary hypertension and the effect of epoprostenol. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(11):1849–55.

58. Chaponnier C, Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* 2004; 204(4):386–95.
59. Luitel H, Sydykov A, Schymura Y, Mamazhakypov A, Janssen W, Pradhan K et al. Pressure overload leads to an increased accumulation and activity of mast cells in the right ventricle. *Physiol Rep* 2017; 5(6).
60. van Wolferen SA, Marcus JT, Westerhof N, Spreeuwenberg MD, Marques KMJ, Bronzwaer JGF et al. Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 2008; 29(1):120–7.
61. Gomez A, Bialostozky D, Zajarias A, Santos E, Palomar A, Martinez ML et al. Right ventricular ischemia in patients with primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(4):1137–42.
62. Gan CT-J, Lankhaar J-W, Marcus JT, Westerhof N, Marques KM, Bronzwaer JGF et al. Impaired left ventricular filling due to right-to-left ventricular interaction in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(4):H1528-33.
63. Vonk-Noordegraaf A, Marcus JT, Gan CT, Boonstra A, Postmus PE. Interventricular mechanical asynchrony due to right ventricular pressure overload in pulmonary hypertension plays an important role in impaired left ventricular filling. *Chest* 2005; 128(6 Suppl):628S-630S.
64. Marcus JT, Gan CT-J, Zwanenburg JJM, Boonstra A, Allaart CP, Gotte MJW et al. Interventricular mechanical asynchrony in pulmonary arterial hypertension: left-to-right delay in peak shortening is related to right ventricular overload and left ventricular underfilling. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(7):750–7.
65. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004; 16(3):349–60.
66. Tarnavski O. Mouse surgical models in cardiovascular research. *Methods Mol Biol* 2009; 573:115–37.
67. Bogoyevitch MA. Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2000; 45(4):826–42.
68. Hoshijima M. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(4):H1313-25.
69. Chien KR. Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases. *Nature* 2000; 407(6801):227–32.
70. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang M-L et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 2002; 111(7):943–55.

71. Franchini KG, Torsoni AS, Soares PH, Saad MJ. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res* 2000; 87(7):558–65.
72. Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19:677–95.
73. Martinac B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 12):2449–60.
74. Granzier HL, Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* 2004; 94(3):284–95.
75. Raskin A, Lange S, Banares K, Lyon RC, Zieseniss A, Lee LK et al. A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem* 2012; 287(35):29273–84.
76. Miller MK, Granzier H, Ehler E, Gregorio CC. The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. *Trends Cell Biol* 2004; 14(3):119–26.
77. Zheng Q, Zhao Y. The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction. *Biol Cell* 2007; 99(9):489–502.
78. Chu P-H, Chen J. The novel roles of four and a half LIM proteins 1 and 2 in the cardiovascular system. *Chang Gung Med J* 2011; 34(2):127–34.
79. Khurana T, Khurana B, Noegel AA. LIM proteins: association with the actin cytoskeleton. *Protoplasma* 2002; 219(1-2):1–12.
80. Chu PH, Ruiz-Lozano P, Zhou Q, Cai C, Chen J. Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system. *Mech Dev* 2000; 95(1-2):259–65.
81. Hwang DM, Dempsey AA, Wang RX, Rezvani M, Barrans JD, Dai KS et al. A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: toward a compendium of cardiovascular genes. *Circulation* 1997; 96(12):4146–203.
82. Cowling BS, Cottle DL, Wilding BR, D'Arcy CE, Mitchell CA, McGrath MJ. Four and a half LIM protein 1 gene mutations cause four distinct human myopathies: a comprehensive review of the clinical, histological and pathological features. *Neuromuscul Disord* 2011; 21(4):237–51.
83. Robinson PA, Brown S, McGrath MJ, Coghill ID, Gurung R, Mitchell CA. Skeletal muscle LIM protein 1 regulates integrin-mediated myoblast adhesion, spreading, and migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284(3):C681-95.
84. Shathasivam T, Kislinger T, Gramolini AO. Genes, proteins and complexes: the multifaceted nature of FHL family proteins in diverse tissues. *J Cell Mol Med* 2010; 14(12):2702–20.
85. Bertrand AT, Bonnemann CG, Bonne G. 199th ENMC international workshop: FHL1 related myopathies, June 7-9, 2013, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2014; 24(5):453–62.

86. San Roman I, Navarro M, Martinez F, Albert L, Polo L, Guardiola J et al. Unclassifiable arrhythmic cardiomyopathy associated with Emery-Dreifuss caused by a mutation in FHL1. *Clin Genet* 2016; 90(2):171–6.
87. Sharma P, Shathasivam T, Ignatchenko V, Kislinger T, Gramolini AO. Identification of an FHL1 protein complex containing ACTN1, ACTN4, and PDLIM1 using affinity purifications and MS-based protein-protein interaction analysis. *Mol Biosyst* 2011; 7(4):1185–96.
88. McGrath MJ, Cottle DL, Nguyen M-A, Dyson JM, Coghill ID, Robinson PA et al. Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *J Biol Chem* 2006; 281(11):7666–83.
89. McGrath MJ, Mitchell CA, Coghill ID, Robinson PA, Brown S. Skeletal muscle LIM protein 1 (SLIM1/FHL1) induces alpha 5 beta 1-integrin-dependent myocyte elongation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285(6):C1513-26.
90. Cowling BS, McGrath MJ, Nguyen M-A, Cottle DL, Kee AJ, Brown S et al. Identification of FHL1 as a regulator of skeletal muscle mass: implications for human myopathy. *J Cell Biol* 2008; 183(6):1033–48.
91. Feeney SJ, McGrath MJ, Sriratana A, Gehrig SM, Lynch GS, D'Arcy CE et al. FHL1 reduces dystrophy in transgenic mice overexpressing FSHD muscular dystrophy region gene 1 (FRG1). *PLoS One* 2015; 10(2):e0117665.
92. D'Arcy CE, Feeney SJ, McLean CA, Gehrig SM, Lynch GS, Smith JE et al. Identification of FHL1 as a therapeutic target for Duchenne muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 2014; 23(3):618–36.
93. Kwapiszewska G, Wygrecka M, Marsh LM, Schmitt S, Trosser R, Wilhelm J et al. Fhl-1, a new key protein in pulmonary hypertension. *Circulation* 2008; 118(11):1183–94.
94. Friedrich FW, Wilding BR, Reischmann S, Crocini C, Lang P, Charron P et al. Evidence for FHL1 as a novel disease gene for isolated hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics* 2012; 21(14):3237–54.
95. Gallego-Delgado M, Gonzalez-Lopez E, Garcia-Guereta L, Ortega-Molina M, Gonzalez-Vioque E, Cobo-Marcos M et al. Adverse clinical course and poor prognosis of hypertrophic cardiomyopathy due to mutations in FHL1. *Int J Cardiol* 2015; 191:194–7.
96. Lim DS, Roberts R, Marian AJ. Expression profiling of cardiac genes in human hypertrophic cardiomyopathy: insight into the pathogenesis of phenotypes. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(4):1175–80.
97. Christodoulou DC, Wakimoto H, Onoue K, Eminaga S, Gorham JM, DePalma SR et al. 5'RNA-Seq identifies Fhl1 as a genetic modifier in cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2014; 124(3):1364–70.
98. Gaussin V, Tomlinson JE, Depre C, Engelhardt S, Antos CL, Takagi G et al. Common genomic response in different mouse models of beta-adrenergic-induced cardiomyopathy. *Circulation* 2003; 108(23):2926–33.

99. Sheikh F, Raskin A, Chu P-H, Lange S, Domenighetti AA, Zheng M et al. An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(12):3870–80.
100. Tang T, Lai NC, Hammond HK, Roth DM, Yang Y, Guo T et al. Adenylyl cyclase 6 deletion reduces left ventricular hypertrophy, dilation, dysfunction, and fibrosis in pressure-overloaded female mice. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(14):1476–86.
101. Zhang Q-J, Chen H-Z, Wang L, Liu D-P, Hill JA, Liu Z-P. The histone trimethyllysine demethylase JMJD2A promotes cardiac hypertrophy in response to hypertrophic stimuli in mice. *J. Clin. Invest.* 2011; 121(6):2447–56.
102. Manso AM, Li R, Monkley SJ, Cruz NM, Ong S, Lao DH et al. Talin1 has unique expression versus talin 2 in the heart and modifies the hypertrophic response to pressure overload. *J Biol Chem* 2013; 288(6):4252–64.
103. Isumi Y, Hirata T, Saitoh H, Miyakawa T, Murakami K, Kudoh G et al. Transgenic overexpression of USP15 in the heart induces cardiac remodeling in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 405(2):216–21.
104. Vignier N, Le Corvoisier P, Blard C, Sambin L, Azibani F, Schlossarek S et al. AT1 blockade abolishes left ventricular hypertrophy in heterozygous cMyBP-C null mice: role of FHL1. *Fundam Clin Pharmacol* 2014; 28(3):249–56.
105. Yang Z, Browning CF, Hallaq H, Yermalitskaya L, Esker J, Hall MR et al. Four and a half LIM protein 1: a partner for KCNA5 in human atrium. *Cardiovasc Res* 2008; 78(3):449–57.
106. Barrick CJ, Rojas M, Schoonhoven R, Smyth SS, Threadgill DW. Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(5):H2119-30.
107. Barnabei MS, Palpant NJ, Metzger JM. Influence of genetic background on ex vivo and in vivo cardiac function in several commonly used inbred mouse strains. *Physiol Genomics* 2010; 42A(2):103–13.
108. van den Borne SWM, van de Schans VAM, Strzelecka AE, Vervoort-Peters HTM, Lijnen PM, Cleutjens JPM et al. Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2009; 84(2):273–82.
109. Egemnazarov B, Schmidt A, Crnkovic S, Sydykov A, Nagy BM, Kovacs G et al. Pressure Overload Creates Right Ventricular Diastolic Dysfunction in a Mouse Model: Assessment by Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2015; 28(7):828–43.
110. Milani-Nejad N, Janssen PML. Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. *Pharmacol Ther* 2014; 141(3):235–49.
111. Barrick CJ, Dong A, Waikel R, Corn D, Yang F, Threadgill DW et al. Parent-of-origin effects on cardiac response to pressure overload in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297(3):H1003-9.

-
112. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 2010; 128(1):191–227.
113. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005; 308(5728):1583–7.
114. Vitale C, Mendelsohn ME, Rosano GMC. Gender differences in the cardiovascular effect of sex hormones. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6(8):532–42.
115. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol* 2015; 89(9):1401–38.
116. Luitel H. Mast cells in pressure overload induced right ventricular remodeling [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2012.
117. Mercadier JJ, Bouveret P, Gorza L, Schiaffino S, Clark WA, Zak R et al. Myosin isoenzymes in normal and hypertrophied human ventricular myocardium. *Circ Res* 1983; 53(1):52–62.
118. Borgdorff MAJ, Bartelds B, Dickinson MG, Steendijk P, Vroomen M de, Berger RMF. Distinct loading conditions reveal various patterns of right ventricular adaptation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305(3):H354-64.
119. Bartelds B, Borgdorff MA, Smit-van Oosten A, Takens J, Boersma B, Nederhoff MG et al. Differential responses of the right ventricle to abnormal loading conditions in mice: pressure vs. volume load. *Eur J Heart Fail* 2011; 13(12):1275–82.

10 Publikationsverzeichnis

Poster:

D. Neghabian, A. Sydykov, H. Luitel, J. Wilhelm, L. Fink, B. Egemnazarov, G. Kwapiszewska, N. Weissmann and C. Veith. Unchanged right heart hypertrophy in four and-a-half LIM domain protein 1 (FHL-1) knockout mice: different role of FHL-1 in the left and right heart. 96th Annual Meeting of the German Physiological Society, 16.03.2017 bis 18.03.2017 in Greifswald.

C. Veith, D. Neghabian, A. Sydykov, H. Luitel, J. Wilhelm, L. Fink, B. Egemnazarov, G. Kwapiszewska, N. Weissmann. Four and-a-half LIM domain protein 1 (FHL-1) knockout mice possess a different response to hypertrophic biomechanical stress in the right than in the left heart. ECCPS Symposium 2017 - New Perspectives in Cardio-Pulmonary Research 07.06.2017 bis 08.06.2017 in Bad Nauheim.

11 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich gerne bei den Menschen bedanken, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Bei Prof. Dr. Norbert Weißmann möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, an so einem spannenden Projekt mitarbeiten zu dürfen, bedanken. Ich habe einen sehr guten Einblick in die wissenschaftliche Arbeitswelt und die Forschung bekommen und konnte viel für meine weitere Zukunft lernen. Auch für die Teilnahmemöglichkeit am Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft bin ich sehr dankbar.

Dr. Christine Veith-Berger danke ich für die ausgezeichnete Betreuung und hervorragende Zusammenarbeit. Zu jeder Zeit konnte ich mich auf ihre Hilfe und Unterstützung verlassen, was ich sehr zu schätzen weiß.

Dr. Akylbek Sydykov danke ich für seine umfangreiche Mitarbeit an diesem Projekt und für seine Hilfe und seinen fachlichen Rat bei vielerlei Fragen, die während der Projektarbeit aufgekommen sind.

Auch bei Dr. Himal Luitel möchte ich mich für das Präparieren und Einbetten der Mäuseherzen bedanken.

Bei Ingrid Breitenborn-Müller möchte ich mich für ihre Hilfe bei den molekularbiologischen Untersuchungen und für die äußerst nette Zusammenarbeit bedanken.

Lisa Fröhlich, Tanja Heitmeier und Ewa Bieniek danke ich für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die histologischen Untersuchungsmethoden und für die interessanten Gespräche während der langen Inkubationszeiten.

Ein großes Dankeschön geht an auch an Jochen Wilhelm für die statistische Betreuung dieser Arbeit und seiner Hilfe bei allerlei statistischen Fragestellungen.

Karin Quanz danke ich für die Hilfe bei allen organisatorischen Fragen und die nette Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen, die während meiner Doktorandenzeit zusammen mit mir Mitglied der AG Weißmann waren, bedanken. Ihr habt mich sofort in euer Team aufgenommen und ich hatte eine sehr interessante und schöne Zeit bei euch.

Zu guter Letzt möchte ich mich natürlich auch bei meinen Freunden und insbesondere bei meiner Familie für ihre Unterstützung und Hilfe während der gesamten Zeit bedanken.