

Rolle der Siah-Ubiquitinligasen in der Entstehung der pulmonalen Hypertonie und daraus resultierenden rechtsventrikulären Hypertrophie

Daniela Haag



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

und

dem Zentrum für Innere Medizin
Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Rolle der Siah-Ubiquitinligasen in der Entstehung der pulmonalen Hypertonie und daraus resultierenden rechtsventrikulären Hypertrophie

INAUGURALDISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

an der Justus-Liebig-Universität

Eingereicht von

Daniela Haag

Tierärztin aus Friedberg

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität-Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger
Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 12.06.2014

Für meine Eltern

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Daniela Haag

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

2.2.10.5 Bestimmung der Proteinkonzentration	91
2.2.10.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	92
2.2.10.7 Western Blot	93
2.2.10.8 Enzyme-linked immunosorbent assay	94
2.2.11 Statistische Auswertung	95
3. Ergebnisse	97
3.1 Siah2 Mäuse im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	97
3.1.1 Auswirkungen der Hypoxie-Exposition	97
3.1.2 Hämatokritwert	98
3.1.3 Systolischer arterieller Druck	99
3.1.4 Rechtsventrikulärer systolischer Druck	100
3.1.5 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus <i>Septum</i> als Maß der Rechtsherzhypertrophie	100
3.1.6 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht als Maß der Rechtsherzhypertrophie	101
3.1.7 Morphometrische Analyse der Lungengefäße	102
3.1.7.1 Muskularisierungsgrad	102
3.1.7.2 Mediale Wandstärke	104
3.1.8 Echokardiografische Untersuchungen	105
3.1.8.1 Rechter Ventrikel und rechtes Atrium	105
3.1.8.2 Cardiac output	108
3.1.8.3 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels	109
3.1.8.4 IVRT/RR – diastolische Funktion des rechten Ventrikels	111
3.1.8.5 MPI – globale Funktion des rechten Ventrikels	113
3.1.8.6 Zusammenfassung der echokardiografischen Befunde	115
3.1.9 Prozentualer Kollagenanteil des rechten Ventrikels	115
3.1.10 Molekularbiologische Untersuchungen	116
3.1.10.1 Genexpression von <i>siah2</i> und <i>siah1 a/b</i> in der Lunge und im rechten Ventrikel	116
3.1.10.2 Proteinexpression der Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD)1, PHD2 und PHD3 in der Lunge und im rechten Ventrikel	119
3.1.10.3 Proteinexpression von vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in der Lunge und im rechten Ventrikel	123
3.1.10.4 Genexpression von vascular endothelial growth factor a, vegf-rezeptor 1 und vegf-rezeptor 2 in der Lunge und im rechten Ventrikel	124
3.2 Siah2 Mäuse im Modell des pulmonalarteriellen „banding“	128
3.2.1 Auswirkungen des pulmonalarteriellen „banding“	128
3.2.2 Systolischer arterieller Druck	129
3.2.3 Rechtsventrikulärer systolischer Druck	130

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

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

Abkürzungsverzeichnis

♂	männlich
♀	weiblich
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A.	Arteria (dt. Arterie)
Abb.	Abbildung
AG	Ausgangsgewicht
AK	Antikörper
ALK-1	activin-like kinase type-1
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	aryl hydrocarbon nuclear translocator
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	Beta2-Mikroglobulin
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor type-2
BNP	brain natriuretic peptide
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalziumionen
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO	cardiac output (dt. Herzminutenvolumen)
CO ₂	Kohlendioxid
Ct-Werte	“cycle threshold” Werte
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dt.	deutsch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
engl.	englisch
EPO	Erythropoetin
ERK	extracellular-signal regulated kinases
et al.	und andere
ET-1	Endothelin-1
Fe ²⁺	Eisenionen
FGF	fibroblast growth factor
FIH	HIF-inhibierender Faktor (engl. factor inhibiting HIF)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Flk	fetal liver kinase-1
Flt	fms-like tyrosine kinase 1
FPAH	Familiäre pulmonalarterielle Hypertonie
g	Gramm
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
het	heterozygot
HF	Herzfrequenz
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor
HIPK2	homeodomain-interacting proteinkinase 2
Hkt	Hämatokrit
HO-1	Hämoxygenase-1
Hox	Hypoxie
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HRE	hypoxia-responsive element
I.E.	internationale Einheiten

Abkürzungsverzeichnis

i.p.	intraperitoneal
IB4	Isolectin B4
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
IVRT	isovolumic relaxation time (dt. isovolumetrische Relaxationszeit)
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K ⁺	Kaliumionen
Kap	Kapillaren
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kiloDalton
KDR	kinase insert domain receptor
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KM	Kardiomyozyten
KO	knockout
K _v	spannungsabhängige Kaliumkanäle
l	Liter
LV	linker Ventrikel
LVOT	left ventricular outflow tract (dt. linksventrikulärer Ausflusstrakt)
m	Meter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase (MAPK)
mg	Milligramm
MHC	myosin heavy chain
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPI	myocardial performance index
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert

Abkürzungsverzeichnis

n	Anzahl
N.	Nervus (dt. Nerv)
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaN ₃	Natriumazid
NFκB	nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nox	Normoxie
Nr.	Nummer
NT-proBNP	N-terminal pro brain natriuretic peptide
O ₂	Sauerstoff
OGHDC	2-Oxoglutaratdehydrogenase-Komplex
PAB	pulmonalarteriellles „banding“
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck
PAPm	mittlerer pulmonalarterieller Druck
PAPW	pulmonalarterieller Verschlussdruck (engl. wedge pressure)
PBS	phosphate buffered saline (dt. Phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	personal computer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	platelet derived growth factor
pg	Pikogramm
PGI	Prostazyklin
PH	pulmonale Hypertonie
PHD	Prolyl-4-Hydroxylasen
PHS	Pulmonales Hypertensionssyndrom
PLGF	placental growth factor
PL	plexiforme Läsionen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POSH	plenty of SH3s
PVDF	Polyvenylidendifluorid
pVHL	von Hippel-Lindau Protein
PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand (pulmonalvaskuläre Resistance)

Abkürzungsverzeichnis

RA	right atrium (dt. rechtes <i>Atrium</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reactive nitrogen spezies (dt. Reaktive Stickstoff Spezies)
ROS	reactive oxygen spezies (dt. Reaktive Sauerstoff Spezies)
Rpm	revolutions per minute (dt. Umdrehungen pro Minute, UpM)
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction (dt. quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktionen)
RV	rechter Ventrikel
RVID	right ventricular internal diameter (dt. Innendurchmesser des RV)
RVSP	right ventricular systolic pressure (dt. systolischer Druck des RV)
RVWT	right ventricular wall thickness (dt. Wandstärke des RV)
S	<i>Septum</i>
s.c.	subkutan
SAP	systolic arterial pressure (dt. systolischer arterieller Druck)
SBD	Substratbindungsdomäne
SDS	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (dt. Natriumdodecylsulfat)
sec.	Sekunde
SEM	standard error mean (dt. Standardfehler)
sFlt	soluble fms-like tyrosine kinase 1
sham	Scheinoperation
Siah	seven in absentia homolog
Sina	seven in absentia
SIP	Siah-interacting-protein
Tab.	Tabelle
TAC	transaortic constriction (dt. transaortale Konstriktion)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion (dt. systolische Bewegung des Trikuspidalringes)
TBL1	transducin beta like 1
TBST	tris buffered saline (dt. Tris gepufferte Kochsalzlösung) with Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- α	transforming growth factor alpha
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF2	tumor necrosis factor associated factor protein 2
TRF2	telomeric repeat binding factor 2

Abkürzungsverzeichnis

TRITC	Tetramethylrhodamin-5(-6)-Isothiocyanat
TRPC	transient receptor potential cation channel
V.	Vena (dt. Vene)
v. a.	vor allem
v/v	Volumenkonzentration (m^3/m^3)
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGF-R1-3	vascular endothelial growth factor receptor 1-3
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VTI	velocity time integral (dt. Geschwindigkeits-Zeit Integral)
w/v	Massenkonzentration (g/100ml)
WGA	wheat germ agglutinin
WHO	World Health Organisation (dt. Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie des Menschen

1.1.1 Definition der pulmonalen Hypertonie (PH)

Der Begriff „pulmonale Hypertonie“ (PH) umfasst eine Reihe von Erkrankungen mit multifaktoriellen Ätiologien, die als gemeinsames Merkmal eine Erhöhung des arteriellen Druckes und des Gefäßwiderstandes in der Lungenstrombahn verbindet. Dies wird durch die Obstruktion von kleinen Pulmonalarterien, Gefäßproliferation und -remodeling ausgelöst (Rosenkranz, 2007). Goldstandard für die Diagnosestellung einer PH ist die Bestimmung des mittleren pulmonalarteriellen Druckes (PAPm) mittels einer Rechtsherzkatheterisierung. Beim Vorliegen eines PAPm von ≥ 25 mmHg in Ruhe spricht man von einer klinisch manifesten PH (Hoepfer, 2009; Jonigk et al., 2012; Rosenkranz et al., 2011).

1.1.2 Geschichte und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie

Die erstmalige Beschreibung des Krankheitsbildes der pulmonalen Hypertonie erfolgte 1891 durch den deutschen Internisten Ernst von Romberg als „isolierte Sklerose der Lungenarterien“ (Romberg, 1891). Eine ausführliche Charakterisierung der histopathologischen Veränderungen bei Krankheitsbildern, die wir heute unter dem Begriff der PH zusammenfassen, entstand in den 1940er Jahren durch Brenner und Kollegen (Brenner, 1931). Eine klinische Diagnose wurde jedoch erst ermöglicht, als Cournand in den 1950er Jahren die Katheterisierung des rechten Ventrikels etabliert hatte (Cournand, 1950; Cournand et al., 1953; Cournand et al., 1945a; Cournand et al., 1945b). 1958 präsentierte Wood eine Reihe von systemischen Untersuchungen am kleinen Kreislauf einschließlich der ersten Normwerte des mittleren pulmonalarteriellen Druckes (Wood, 1958). Zwischen 1965 und 1968 kam es infolge der Verabreichung des Appetitzüglers Menocil zu einem gehäuften Auftreten der PH, welches als sogenannte Menocil-Epidemie in die Geschichte einging. Aufgrund der steigenden Aktualität der Erkrankung fand 1971 eine Konferenz der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) zur pulmonalen Hypertonie statt, auf der die erste allgemein-gültige, hämodynamische Definition der PH verabschiedet wurde. Eine systematische Einteilung der PH in fünf Gruppen erfolgte erst weitere 27 Jahre später, 1998, bei der WHO Konferenz in Evian (Hoepfer, 2010). Diese

Klassifikation wurde das erste Mal 2003 auf der dritten Weltkonferenz in Venedig modifiziert (Simonneau et al., 2004). Die zweite und vorerst letzte Aktualisierung fand im Jahre 2008 bei der vierten Weltkonferenz in Dana Point in Kalifornien statt (Simonneau et al., 2009). Das nächste Weltsymposium zur PH wird im Februar 2013 in Nizza abgehalten werden.

Beim Betrachten der aktuellen Klassifikation wird ersichtlich, wie inhomogen diese Erkrankung, die solitär oder als Begleit- und Folgeerkrankung auftreten kann, ist (Tab. 1.1.1).

1.1.3 Prävalenz, Gruppeneinteilung und Klinik

Schätzungen zu Folge sind weltweit etwa 100 Millionen Menschen an einer der Varianten der PH erkrankt (Schermlay et al., 2011). Frauen sind dabei 2-5 mal so häufig betroffen wie Männer (Shin and Semigran, 2010).

Man unterscheidet zwischen dem Vorliegen präkapillärer und postkapillärer Ursachen. Bei Patienten mit postkapillärer PH kommt es durch eine primäre Linksherzerkrankung (Gruppe 2) zu einer pulmonalvenösen Stauung mit sekundär folgender Erhöhung des kapillären und pulmonalarteriellen Druckes (PAP). Die präkapilläre PH hingegen, ist durch eine isolierte Erhöhung des PAP bei normalem kapillären Druck charakterisiert. Zur Unterscheidung zwischen prä- und postkapillärer PH wird der pulmonalarterielle Verschlussdruck oder Wedge-Druck (PAPW) herangezogen. Dabei handelt es sich um den Druck, der während eines vorübergehenden Verschlusses der *Arteria pulmonalis* mittels eines Ballonkatheters distal des geblockten Ballons gemessen wird. Der Wedge-Druck entspricht unter physiologischen Bedingungen den Druckverhältnissen im linken Vorhof. Ein pulmonalarterieller Verschlussdruck von ≤ 15 mmHg spricht für eine präkapilläre PH (Gruppe 1, 3, 4, 5), während ein Druck > 15 mmHg charakteristisch für eine postkapilläre PH der Gruppe 2 ist (Hoeper, 2009; Rosenkranz et al., 2011).

Gruppe 1 der Dana Point Klassifizierung umfasst die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH). In dieser Gruppe werden Formen der „reinen“ präkapillären PH ohne andere zugrunde liegende Ursachen zusammengefasst. Diese zeichnen sich histopathologisch durch den Umbau vornehmlich des pulmonalarteriellen Schenkels der Lungenstrombahn aus (Jonigk et al., 2012). Die PAH ist definiert als das Vorliegen eines mittleren PAP ≥ 25 mmHg und eines PAPW ≤ 15 mmHg (Fukumoto and Shimokawa, 2011).

1. Pulmonalerterielle Hypertonie (PAH)

- 1.1 Idiopatische PAH (IPAH)
- 1.2 Hereditär (HPAH)
 - 1.2.1 BMPR2
 - 1.2.2 ALK1, Endoglin (mit/ohne hereditärer hämorrhagischer Telangiektasie)
 - 1.2.3 Unbekannt
- 1.3 Medikamenten-/Drogenassoziiert
- 1.4 PAH assoziiert mit:
 - 1.4.1 Kollagenosen
 - 1.4.2 HIV-Infektion
 - 1.4.3 Portaler Hypertension
 - 1.4.4 Angeborenen Herzfehlern
 - 1.4.5 Schistosomiasis
 - 1.4.6 Chronisch-hämolytischer Anämie
- 1.5 Persistierende pulmonale Hypertonie der Neugeborenen

1' Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonal kapilläre Hämangiomatose (PCH)

2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankung

- 2.1 Systolische Funktionsstörungen
- 2.2 Diastolische Funktionsstörungen
- 2.3 Herzklappenerkrankungen

3. Pulmonale Hypertonie in Verbindung mit Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie

- 3.1 Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen
- 3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen
- 3.3 andere Lungenerkrankungen mit gemischten restriktiv-obstruktiven Mustern
- 3.4 Schlafapnoesyndrom
- 3.5 Erkrankungen mit alveolärer Hypoventilation
- 3.6 Chronischer Aufenthalt in Höhenlagen
- 3.7 Pulmonale Entwicklungsstörungen

4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)

5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen

- 5.1 Hämatologische Erkrankungen: myeloproliferative Störungen, Splenektomie
- 5.2 Systemische Störungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans Zell Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
- 5.3 Metabolische Erkrankungen (Glykogenspeicherkrankheit, M. Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen)
- 5.4 andere: Kompression der Pulmonalgefäße durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, dialysepflichtige chronische renale Insuffizienz

Tabelle 1.1.1: Einteilung der pulmonalen Hypertonie (Dana Point Klassifizierung, 2008)
(Simonneau et al., 2009)

Weiterhin schließen einige Definitionen die Messung des pulmonalvaskulären Widerstandes (pulmonalvaskuläre Resistance, PVR) ein. Dieser berechnet sich nach der Formel $PVR = (PAPm - PAPW) / \text{Herzzeitvolumen}$ und wird in Wood Units (mmHg/l/min) angegeben. Charakteristisch für eine PAH ist ein PVR von ≥ 2 oder 3 Wood Units (Badesch et al., 2009), während gesunde Menschen Werte zwischen 0,7 und 1,1 Wood Units aufweisen (Carbone et al., 2005). Die Prävalenz der PAH beträgt etwa 15 Neuerkrankungen pro eine Million Menschen (Badesch et al., 2009).

In Gruppe 3 werden pulmonale Hypertonien in Verbindung mit Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie erfasst. Diese werden durch eine hypoxische Vasokonstriktion als Folge der Lungenpathologie ausgelöst und sind durch eine moderate PH mit einem PAPm von 25-35 mmHg gekennzeichnet. Als chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (Gruppe 4) bezeichnet man die thromboembolische Verlegung der zentralen und/oder distalen Lungenarterien mit folgender Druckerhöhung im kleinen Kreislauf. In der 5. Gruppe sind verschiedene Formen der PH mit unklarer Genese und z. T. multifaktorieller Ätiologie zusammengefasst (Fukumoto and Shimokawa, 2011).

Schwerwiegendste Folge und lebenslimitierender Faktor der pulmonalen Hypertonie ist ein Rechtsherzversagen infolge der chronischen Rechtsherzbelastung durch die Druckerhöhung in der Lungenstrombahn (Howard, 2011). Klinisch zeigt sich die PH durch unspezifische Symptome, wie Dyspnoe, Müdigkeit, Synkopen, Brustschmerzen, Palpitationen oder periphere Ödeme. Dies erschwert die Diagnose erheblich, so dass zwischen dem Auftreten der ersten Anzeichen bis zur endgültigen Diagnose durchschnittlich zwei Jahre vergehen (Rosenkranz, 2007).

1.1.4 Prognose

Eine späte Diagnose und ein verzögerter Therapiebeginn sind kritische Faktoren bei einer Erkrankung mit einer schlechten Prognose. 1991 publizierten D'Alonzo et al. eine mittlere Überlebenszeit von 2,8 Jahren für Patienten mit einer unbehandelten IPAH. Nach drei Jahren betrug die Überlebensrate nur noch 48% (D'Alonzo et al., 1991). Seitdem wurde eine Reihe neuer Therapien erfolgreich zur klinischen Anwendung gebracht. Neuere Studien aus dem Jahr 2008 zeigten nun nach drei Jahren eine deutlich gesteigerte Überlebensrate von etwa 80% (Hoepfer and Dinh-Xuan, 2008).

Um eine Aussage über die Lebenserwartung der Patienten zu ermöglichen, können heute eine Reihe verschiedener Konstanten herangezogen werden. Invasiv gemessene

hämodynamische Parameter, die Rückschlüsse auf die Prognose zulassen, sind der pulmonalarterielle und rechtsventrikuläre Druck, sowie der Herzindex (Herzminutenvolumen / Körperoberfläche, l/min/m²). Ein einfaches aber sehr effektives Prognosekriterium ist die Sechs-Minuten-Gehstrecke. Hier wird die Distanz gemessen, die ein Patient innerhalb von sechs Minuten ohne fremde Hilfe zurückzulegen vermag. Biomarker, die mit einer erhöhten Mortalität korrelieren, sind das brain natriuretic peptide (BNP) und das N-terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP). Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch echokardiografisch ermittelte Konstanten mit der Überlebenszeit korrelieren. Dies sind zum einen die tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), eine einfache Messung der longitudinalen Beweglichkeit des Herzens, die mit der rechtsventrikulären Ejektionsfraktion korreliert, und zum anderen der Tei-Index, der eine Einschätzung der globalen rechtsventrikulären Funktion zulässt und sich aus der Summe der isovolumetrischen Kontraktions- und Relaxationszeit geteilt durch die Ejektionszeit berechnet (Howard, 2011; Vonk Noordegraaf and Galie, 2011).

1.1.5 Therapie

Die moderne Therapie der PH begann 1980/81 mit der Einführung des intravenös verabreichten Prostazyklins Epoprostenol (Barst et al., 1994; Higenbottam, 1987; Higenbottam et al., 1984). Derzeitige Therapien adressieren die Prostazyklin, Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1 abhängigen Regulationskaskaden und sprechen somit vor allem den Gefäßtonus an (Humbert, 2008). Prostazyklinanaloga, wie Epoprostenol, Iloprost, Trepostenil und Beraprost, sind Vasodilatoren, die zusätzlich antiproliferative Effekte auf Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen vermitteln. Phosphodiesterase 5 (PDE-5) - Inhibitoren (Sildenafil, Tadalafil) greifen in den NO-Signaltransduktionsweg ein und wirken durch Hemmung des Abbaus von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) vasodilatatorisch. Endothelin-1-Rezeptor Antagonisten (Bosentan, Sitaxentan, Ambrisentan) hemmen die Vasokonstriktion und Fibroblastenproliferation. Neuere Therapiestrategien kombinieren mit Erfolg die oben aufgeführten Wirkstoffe, um additive Effekte durch das Ansprechen verschiedener Signalkaskaden zu erzeugen. Als Hintergrundtherapie werden Antikoagulantien, Diuretika und inhalativer Sauerstoff verabreicht. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein moderates körperliches Training positive Effekte auf die Lebensqualität hat. Etwa 7% aller Patienten mit IPAH oder familiärer pulmonalarterieller Hypertonie (FPAH) profitieren von einer

Therapie mit Kalziumantagonisten. Man bezeichnet sie als responder, da durch einen Vasoreaktivitätstest (meist mit Iloprost) ermittelt wird, ob diese Patienten auf eine derartige Behandlung ansprechen. Schreitet die Erkrankung weiter fort, so kommen invasive Therapiemethoden, wie z. B. eine atriale Septostomie, eine Lungen- oder Herz-Lungentransplantation oder die Implantation eines right ventricular assist device (RVAD), zum Einsatz (McLaughlin et al., 2009; Rosenkranz, 2007).

Derzeitige Behandlungsstrategien verbessern zwar die Prognose und Lebensqualität, können die Erkrankung aber nicht heilen. Deshalb wird beständig weiter nach neuen Therapieansätzen geforscht. Mögliche Angriffspunkte sind die Guanylatzyklase (z. B. mit Riociguat), Serotonin Rezeptoren, Rho-Kinasen, verschiedene Tyrosinkinase-Signalwege wie z.B. das platelet derived growth factor (PDGF) oder epidermal growth factor (EGF) Signalsystem (z. B. mit Imatinib) und die Elastase (Schermuly and Grimminger, 2008).

1.1.6 Pathogenese

Wie bereits beschrieben, ist die Pathogenese der PH multifaktoriell und es gibt neben der idiopathischen PH eine Vielzahl von unterschiedlichen Primärerkrankungen, die eine PH zur Folge haben können. Allerdings existiert eine Reihe von pathologischen Befunden, die (fast) alle Untergruppen gemeinsam haben. Hierzu gehören das vaskuläre Remodeling, die Vasokonstriktion und *in-situ* Thrombosen der Pulmonalgefäße. Ein weiteres gemeinsames Kriterium ist die Entstehung einer globalen oder regionalen, persistierenden oder intermittierenden, alveolaren Hypoxie (Olschewski and Seeger, 1994; Stenmark et al., 2006b).

1.1.6.1 Vaskuläres Remodeling

1.1.6.1.1 Anatomie und anatomische Besonderheiten der Lungenstrombahn

Die Lungenzirkulation ist ein System mit hoher Flussrate bei niedrigem Gefäßwiderstand und geringem Druck (Mandegar et al., 2004). Der Strömungswiderstand der pulmonalen Strombahn beträgt beim Menschen lediglich 1/10 des im Körperkreislauf herrschenden Widerstandes. Die Perfusion der Lunge wird durch die geringe Druckdifferenz (von nur etwa 8 mmHg beim Menschen) zwischen der Pulmonalarterie und dem linken Vorhof aufrechterhalten. Hinzu kommt, dass die pulmonalen arteriellen und venösen Gefäßabschnitte aufgrund ihres im Vergleich zu denen des Körperkreislaufes sehr geringen muskulären Wandanteils, dünnwandiger sind und einen größeren Durchmesser besitzen

(Schmidt et al., 2000). Der pulmonal vaskuläre Widerstand (Resistance) ist die Summe der Einzelwiderstände von Arterien, Venen und Kapillaren. Die humane Lunge besitzt jeweils über 300 Millionen Arterien und Venen sowie mehrere Billionen Kapillaren. Aufgrund der Zunahme der Gesamtquerschnittsfläche des pulmonalvaskulären Systems von den zentralen Pulmonalarterien hin zu den Kapillaren (durch die Parallelschaltung tausender Kapillaren) nimmt die Resistance im distalen Gefäßbett kontinuierlich ab (Mandegar et al., 2004). Da pulmonale Kapillaren im Gegensatz zu denen des Körpers nicht von einer stützenden Schicht aus Interstitium umgeben sind, besitzen sie eine enorme elastische Weitbarkeit (Compliance) (Mandegar et al., 2004; Schmidt et al., 2000). In Ruhe werden lediglich etwa 50% der pulmonalen Kapillaren durchblutet (Schmidt et al., 2000). Bei Belastung erfolgen eine Vasodilatation und eine Rekrutierung von Reservekapillaren. Dieses Prinzip ermöglicht es, eine bis zu sechsfache Steigerung des Herzminutenvolumens, ohne einen Anstieg des PAP, zu kompensieren (Mandegar et al., 2004).

Die nutritive Versorgung der Bronchien wird durch Bronchialgefäße gewährleistet die dem Körperkreislauf entstammen. Diese Gefäße gehören nicht zum pulmonalvaskulären Niederdrucksystem, sondern zeigen ähnliche Druckwerte wie die Gefäße des Körperkreislaufes (Jonigk et al., 2012; Schmidt et al., 2000).

Arterienwände bestehen aus drei Schichten: der äußeren bindegewebigen *Adventitia*, gefolgt von der *Media*, bestehend aus *Lamina elastica externa* und einer Schicht aus glatten Muskelzellen, kollagenen und elastischen Fasern und zum Lumen abschließend der *Intima*, aus der *Lamina elastica interna* und dem einschichtigen Endothel bestehend (Liebich, 1999; Weyrauch and Smollich, 1998). Bronchialarterien vom elastischen Typ verlaufen gemeinsam mit den Bronchien bzw. Bronchioli ungefähr bis zum Übergang zu den Bronchiolen. Dort findet ein Wechsel vom elastischen zum muskulären Typ statt (Jonigk et al., 2012). Venen differenzieren sich von den Arterien durch das Fehlen der *Lamina elastica interna*. Sie besitzen stattdessen lediglich ein dünnes Netz aus elastischen Fasern, das sogenannte *Rete elastica*. Die *Media* von Venen ist dünner als die der Arterien und besteht vor allem aus kollagenen und elastischen Fasern, während der Anteil an glatten Muskelzellen gering ist (Liebich, 1999). Lungenvenen verlaufen bronchusfern (Jonigk et al., 2012). Pulmonale Blutgefäße werden vor allem durch sympathische Fasern innerviert. Adrenerge Transmitter wirken hauptsächlich über α -Rezeptoren vasokonstriktorisch. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer vasodilatatorischen Wirkung durch β -Rezeptoren oder parasymphatische cholinerge Fasern (Liebich, 1999; Schmidt et al., 2000). Trotz der

reichhaltigen Innervation durch das autonome Nervensystem spielt dieses eine untergeordnete Rolle in der Kontrolle des pulmonalvaskulären Tonus. Die Durchblutungsregulation wird hauptsächlich lokal geregelt (siehe auch 1.1.6.4 und 1.1.6.5) (Junqueira and Carneiro, 1996).

Der als vaskuläres Remodeling bezeichnete Prozess betrifft alle drei Schichten der Gefäßwand. Die Stärke der Veränderungen ist abhängig von Spezies, Geschlecht und Entwicklungszustand. Als Folge eines chronisch hypoxischen Stimulus kommt es sowohl zum Remodeling von großen, proximal gelegenen Lungenarterien, als auch von kleinen distal gelegenen Gefäßen. Folge der Veränderungen der großen Arterien ist eine Reduktion der Compliance. Die Veränderungen in den kleinen Gefäßen führen zu einer markanten Reduktion der Querschnittsfläche der Lungenstrombahn und somit zu einem Anstieg der PVR. Beide Prozesse führen zu einer ausgeprägten Erhöhung der Belastung des rechten Ventrikels (Schermuly et al., 2011; Stenmark et al., 2006b).

1.1.6.1.2 Remodeling der *Intima*

Veränderungen der *Intima* sind hauptverantwortlich für die Einengung des Gefäßlumens in kleinen Pulmonalarterien. Sie können Endothelverletzungen, Endothelzellproliferation, Invasion der *Intima* durch Myofibroblasten-ähnliche Zellen, Akkumulation von azellulärer Matrix und eine Obstruktion des Gefäßlumens durch plexiforme Läsionen (PL) umfassen. Plexiforme Läsionen bestehen aus einem Netzwerk endothelausgekleideter Gefäßkanäle, verbunden durch ein glattmuskuläres Interstitium aus Myofibroblasten und Matrixproteinen. Sie können sich aus den Pulmonalarterien ausstülpfen oder intravaskulär liegen. Typischerweise findet man PL an Aufzweigungen der muskulären Arterien (Humbert et al., 2004; Jonigk et al., 2012; Schermuly et al., 2011; Tuder et al., 2007a). Ein charakteristisches Kennzeichen der humanen PAH ist die Entstehung einer *Neointima* durch die Formierung einer Schicht aus Myofibroblasten und extrazellulärer Matrix zwischen Endothel und *Lamina elastica interna* (Humbert et al., 2004).

Endothelzellen (als innerste Schicht der *Intima*) werden als einer der Hauptregulatoren der vaskulären Funktion betrachtet. Spricht man von einer endothelialen Dysfunktion, so umfasst dies eine Ungleichheit der Produktion von Vasokonstriktoren *versus* Vasodilatoren, von Aktivatoren *versus* Inhibitoren des Wachstums und der Migration glatter Muskelzellen, von prothrombotischen *versus* antithrombotischen Mediatoren, und von proinflammatorischen *versus* antiinflammatorischen Signalen (Morrell et al., 2009).

1.1.6.1.3 Remodeling der *Media*

Eine Verdickung der *Media* durch eine Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskelzellen ist pathognomonisch für die PH. Diese Prozesse involvieren sowohl große muskularisierte Arterien (70-500 µm Durchmesser), als auch präkapilläre Gefäße (<70 µm Durchmesser) (Tuder et al., 2007a). Ein weiteres typisches Kennzeichen ist die *de-novo* Muskularisierung vormals nicht-muskularisierter kleiner Gefäße durch das Einwandern von adventitialen Myofibroblasten (Stenmark et al., 2006a). Eine verringerte Apoptoserate der glatten Muskelzellen sowie eine Zunahme der extrazellulären Matrix und der elastischen Fasern tragen entscheidend zur Verdickung der *Media* bei (Galie et al., 2004). Zusätzlich kann infolge der Druckbelastung eine „Arterialisierung“ der Venen erfolgen. Die Bildung einer *Media* und einer zerfaserten *Elastica* lassen sie dann wie Arterien erscheinen und erschweren eine histologische Differenzierung (Jonigk et al., 2012).

1.1.6.1.4 Remodeling der *Adventitia*

Die *Adventitia* der Lungenarterien besteht aus einer heterogenen Population von Fibroblasten. Sie gilt als biologisches Steuerzentrum für die Bereitstellung, Speicherung und Freisetzung von Mediatoren der Gefäßwand. Adventitiale Fibroblasten werden im Verlauf der PH aktiviert und haben eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen: Sie können proliferieren oder sich zu Myofibroblasten differenzieren. Weiterhin beginnen sie mit der Expression von kontraktilen Proteinen und Proteinen der extrazellulären Matrix. Die *Adventitia* beeinflusst den Gefäßtonus und die Proliferation von glatten Muskelzellen durch die Produktion von autokrinen und parakrinen Substanzen (Stenmark et al., 2006a). Von Fibroblasten gebildete reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bewirken eine Erhöhung des Gefäßtonus, indem sie vasodilatatorisches NO unwirksam machen, und stoßen Signalkaskaden an, die zur Proliferation oder Migration glatter Muskelzellen führen (Liu et al., 2004; Touyz and Schiffrin, 2004). Weiterhin sezernieren sie Mediatoren, die den Gefäßtonus direkt beeinflussen (z. B. Endothelin 1 (ET-1), PDGF, EGF, fibroblast growth factor 2 (FGF-2)), sowie Chemokine (z. B. vascular endothelial growth factor (VEGF) und transforming growth factor-β (TGF-β)), die Immunzellen anlocken und die Angiogenese anregen (Stenmark et al., 2006a).

Myofibroblasten adventitialen Ursprunges können in die *Media* und *Intima* einwandern und zur Verdickung dieser Schichten beitragen (Shi et al., 1996; Siow et al., 2003). Verschiedene Modelle für vaskuläre Verletzungen und Bluthochdruck haben gezeigt, dass

das Remodeling der *Adventitia* den Veränderungen innerhalb der *Intima* und *Media* vorausgeht (Herrmann et al., 2005). Auch in der Hypoxie-induzierten PH zeigen adventitielle Fibroblasten, im Vergleich zu allen anderen Zelltypen der Gefäßwand, den frühesten und signifikantesten Anstieg der Proliferation (Belknap et al., 1997; Meyrick and Reid, 1979).

1.1.6.2 Inflammation

Mit dem Remodeling der Gefäße geht stets ein mehr oder weniger stark ausgeprägter Entzündungsprozess einher. Die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und die Expression von Adhäsionsmolekülen führt zu einer Akkumulation von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und dendritischen Zellen im Lungengewebe und um die pulmonalen Gefäße herum. Die Plasmaspiegel von Tumornekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin (IL) -1 β , IL-6 und IL-8 steigen an. Weiterhin erhöht sich die Permeabilität der Endothelzellbarriere, die Zellverbindungen werden „leck“ und es tritt eine Extravasation von z. B. Albumin auf (Schermuly et al., 2011; Stenmark et al., 2006b).

1.1.6.3 In-situ Thrombose

Eine erhöhte Thromboseneigung entsteht durch Dysfunktionen der Gerinnungskaskade, des Endothels und/oder der Thrombozyten. Infolge einer PH kommt es zu einer massiven Veränderung der Funktion der Endothelzellen. Sie sezernieren verstärkt gerinnungsfördernde Substanzen, wie von Willebrand Faktor, Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 und Fibrinopeptid A. Die aufgrund des erhöhten PVR wirkenden Scherkräfte generieren eine thrombogene Oberfläche, an die sich Thrombozyten leicht anlagern können. Eine erhöhte Aggregationsneigung der Thrombozyten kann durch vasoaktive Substanzen verstärkt werden. Im Verlauf einer PH erhöhte Thromboxan A₂-Spiegel wirken proaggregatorisch, während die Konzentrationen von antiaggregatorisch wirkendem NO und Prostazyklin herabgesetzt sind (Humbert et al., 2004; Mandegar et al., 2004; Schermuly et al., 2011).

1.1.6.4. Vasokonstriktion

1.1.6.4.1 Pulmonale Hypoxie und hypoxische Vasokonstriktion

Nicht nur eine direkte Hypoxieexposition (wie z. B. in großer Höhe), sondern auch Begleiterscheinungen vieler Erkrankungen der Gruppe der PH, wie z. B. ein verminderter

Atemstimulus, obstruktive Prozesse, intra-alveolare Exsudate, ödematös verdickte Septen, Entzündungsgeschehen, Fibrose oder Zerstörung alveolarer Kapillaren, führen zu einer pulmonalen Hypoxie mit resultierender hypoxischer Vasokonstriktion (Dumas et al., 1999; Tuder et al., 2007b).

Der Ablauf einer pulmonalen, präkapillären Vasokonstriktion als Resultat einer hypoxischen Umgebung ist ein physiologischer Adaptationsmechanismus, der das Blut von schlecht ventilerten Bereichen zu gut belüfteten Bereichen umleitet, um eine optimale, gesamtpulmonale Sauerstoffaufnahme zu ermöglichen (Mandegar et al., 2004). Der Mechanismus der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) wurde bereits 1946 durch von Euler und Liljestrand beschrieben (Euler and Liljestrand, 1946) und fand als „Von Euler-Liljestrand Mechanismus“ Eingang in die Fachliteratur. Fortan folgte eine Reihe von Untersuchungen, um die Entstehung dieses Phänomens zu entschlüsseln. Eine wichtige Erkenntnis infolge neuerer Studien ist, dass die hypoxische Vasokonstriktion in drei verschiedene Phasen eingeteilt werden kann: 1) die akute hypoxische Antwort binnen Sekunden, 2) eine anhaltende, protrahierte hypoxische Reaktion mit einer Dauer von Minuten bis Stunden und 3) die chronische Hypoxie mit vaskulärem Remodeling und folgender chronischer PH (Sommer et al., 2008; Weissmann et al., 2001). Als Charakteristikum der protrahierten oder subakuten Vasokonstriktion wurde in Untersuchungen an isolierten Gefäßen, isoliert perfundierten Lungen und Messungen an lebenden Tieren verschiedener Spezies (Schwein, Hund, Katze, Hase, Frettchen, Ratte, Maus) eine temporäre Vasodilatation, gefolgt von einer erneuten, schwächer ausgeprägten Konstriktion beschrieben (Domino et al., 1984; Jin et al., 1992; Peake et al., 1981; Weissmann et al., 2004; Welling et al., 1993). Allerdings trat diese Kinetik nicht in allen Untersuchungen auf (Ozaki et al., 1998).

Die auslösenden Mechanismen der HPV sind derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Als Effektorwege werden Kalziumkanäle, unspezifische Kationenkanäle und spannungsabhängige Kaliumkanäle angesehen. Als Sauerstoffsensoren scheinen Mitochondrien und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidasen zu fungieren, und als Mediationen der HPV werden ROS, Redoxpaare und Adenosin-Monophosphat-aktivierte Kinasen diskutiert (Sommer et al., 2008).

1.1.6.4.2 Vasokonstriktion im Rahmen der pulmonalen Hypertonie

Im Verlauf der PH kommt es zu einem Ungleichgewicht von vasoaktiven Mediatoren. Die Ausschüttung von Vasodilatoren wie NO, Prostazyklin (PGI₂), vasoaktivem intestinalen Peptid (VIP), atrialem natriuretischen Peptid (ANP) und Hämoxxygenase-1 (HO-1) ist reduziert, während die Spiegel der Vasokonstriktoren wie Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) und ET-1 ansteigen. Weiterhin kommt es zu Veränderungen der Kalziumhomöostase der glatten Muskelzellen. Im Rahmen der PH werden spannungsabhängige K⁺-Kanäle (K_v) herunterreguliert. Kalium kann nicht mehr aus der Zelle entweichen und akkumuliert. Das Zellinnere wird positiver geladen und eine Membrandepolarisation folgt. Daraufhin öffnen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle, Ca²⁺ strömt in die Zelle ein und induziert eine Muskelkontraktion durch Aktivierung sowohl der Kalzium-Calmodulin- als auch der Myosin-leichte-Ketten-Kinase. Zusätzlich wird der Kalziumeinstrom durch die Heraufregulation der Expression der beiden Kanäle „transient receptor potential cation channel 3 und 6“ (TRPC3 und TRPC6) verstärkt (Mandegar et al., 2004; Schermuly et al., 2011; Stenmark et al., 2006b).

1.1.6.5. Mediatoren der pulmonalen Hypertonie

Viele Mediatoren, deren Homöostase im Rahmen der PH beeinflusst wird, zeichnen sich durch ein „multitasking“ hinsichtlich ihrer Einflüsse auf Proliferation, Vasokonstriktion und Apoptose aus. Im Folgenden soll eine kurze Zusammenfassung wichtiger Vermittler der mit einer PH einhergehenden pathologischen Prozesse gegeben werden.

Endothelin-1 und Serotonin werden im Rahmen der PH von Zellen des Endothels verstärkt exprimiert, wirken vasokonstriktorisch und stimulieren gleichzeitig die Proliferation der glatten Muskelzellen (Eddahibi et al., 2006; Kirchengast and Munter, 1999; Mandegar et al., 2004; Morrell et al., 2009). Weiterhin spielt ET-1 eine Rolle im Entzündungsgeschehen und führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Mandegar et al., 2004). Ca²⁺ hat, wie oben beschrieben, einen starken vasokonstriktorischen Effekt und wirkt darüber hinaus mitogen, indem es in den Zellzyklus eingreift und die Proliferation der glatten Muskelzellen stimuliert (Golovina et al., 2001; Mandegar et al., 2004; Platoshyn et al., 2000). Ein Absinken der intrazellulären Kaliumkonzentration und ein nachfolgender Volumenverlust der Zelle sind ausschlaggebend für die Induktion der Apoptose. Durch Verminderung des K⁺-Ausstromes aufgrund einer Herunterregulierung der K_v-Kanäle bleibt die zytosolische K⁺-Konzentration erhalten und eine Apoptose wird verhindert (Remillard

and Yuan, 2004); Stenmark et al., 2006b). Angiopoietin-1 repräsentiert einen angiogenetischen Faktor, der von glatten Muskelzellen sezerniert wird, zur Freisetzung von Serotonin führt, eine Hypertrophie der *Media* vermittelt und antiapoptotisch wirkt (Sullivan et al., 2003). Thromboxan A₂ hat neben seiner vasokonstriktorisches und proaggregatorische Wirkung auch mitogene Effekte auf pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (Mandegar et al., 2004). Im Verlauf einer PH kommt es weiterhin zur vermehrten Expression der Rezeptoren für verschiedene Vasokonstriktoren wie z. B. Serotonin und Angiopoietin und somit zu einer Potenzierung ihrer Wirkung. Rho Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine sind in die Regulation der Proliferation und Apoptose von Endothelzellen involviert. Weiterhin spielen sie eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion (Morrell et al., 2009).

NO, Prostazyklin und VIP fungieren als Vasodilatoren, inhibieren die Proliferation der glatten Muskelzellen und hemmen die Thrombozytenaggregation. Ihre Herunterregulation trägt somit zur Progression der Erkrankung bei (Giaid and Saleh, 1995; Humbert et al., 2004; Morrell et al., 2009). Wachstumsfaktoren, die eine Rolle bei der Entstehung der PH spielen, sind VEGF, FGF, transforming growth factor- α (TGF- α), TGF- β , PDGF, hepatocyte growth factor (HGF) und insulin-like growth factor (IGF). Sie binden an Tyrosinkinase-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wirken mitogen und chemotaktisch auf glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen und führen so zu Proliferation, Migration und Apoptoseresistenz. Matrixmetalloproteinasen haben eine Schlüsselrolle in der Modulation der extrazellulären Matrix und sind in der Lage, Wachstumsfaktoren freizusetzen (Humbert et al., 2004; Mandegar et al., 2004; Schermuly et al., 2011).

1.1.6.6 Genetische Grundlagen

Im Rahmen der Erforschung der Pathomechanismen der PH rückte die Frage nach einer genetischen Prädisposition recht früh in den Fokus. Erste Berichte einer familiär assoziierten PAH findet man bereits zu Beginn der 1950er Jahre (Dresdale et al., 1954). Bei folgenden Studien wurden bei an PAH erkrankten Patienten Mutationen in zwei Rezeptorsubtypen für Proteine der TGF- β Familie entdeckt. Etwa 60% der Betroffenen, die an einer hereditären PAH leiden und 10-30% der Personen mit einer idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH) zeigen genetische Veränderungen des bone morphogenetic protein receptor type-2 (BMPR2). Es sind heute mehr als 140 verschiedene Mutationen bekannt. Allerdings führen diese nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 15-20%

zu der tatsächlichen Manifestation einer PH. Als Triggermechanismen müssen weitere Gen-Gen oder Gen-Umwelt Wechselwirkungen hinzukommen, um die Entstehung einer PH auszulösen. Mutationen des zweiten Rezeptors der TGF- β Familie, activin-like kinase type-1 (ALK-1), wurden in Familien mit hereditärer hämorrhagischer Teleangiektasie und koexistenter PAH gefunden. Die genauen Mechanismen, wie die Mutationen dieser Rezeptoren die pulmonalen Gefäße beeinflussen, sind allerdings noch weitgehend unbekannt (Humbert et al., 2004; Newman et al., 2004; Schermuly et al., 2011)

1.2 Der rechte Ventrikel - lebenslimitierender Faktor

Veränderungen der pulmonalen Gefäßstrombahn sind die Primärursache der PH, das klinische Ausmaß und der Verlauf der Erkrankung sind allerdings durch die Funktion des rechten Ventrikels determiniert. Wie unter 1.1.4 beschrieben, korrelieren Parameter der rechtsventrikulären Funktion (TAPSE, Tei-Index) eng mit der Überlebensdauer der Patienten.

1.2.1 Definition des Rechtsherzversagens

Als Rechtsherzversagen bezeichnet man den Zustand eines manifesten, rechtsventrikulären Vorwärts- oder Rückwärtsversagens. Die Hämodynamik ist dabei durch einen reduzierten Herzindex ($<1,5 \text{ l/min/m}^2$) und einen erhöhten rechtsatrialen Druck ($>18 \text{ mmHg}$) gekennzeichnet. Die zentrale Sauerstoffsättigung ist deutlich erniedrigt (Steiner and Strauer, 2009).

1.2.2 Anatomische Besonderheiten des rechten Ventrikels

Der rechte Ventrikel ist eine dünnwandige Niederdruckkammer mit einer hohen Compliance. Aufgrund der niedrigen Resistance der pulmonalen Gefäßstrombahn ist er in der Lage, mit nur etwa 25% der Schlagarbeit das gleiche Schlagvolumen wie der linke Ventrikel zu befördern (Han et al., 2007).

Der rechte Ventrikel kann sich (aufgrund seiner hohen Compliance) durch eine Steigerung der Kontraktilität schnell an eine Zunahme des Füllvolumens anpassen (Vonk Noordegraaf and Galie, 2011). Allerdings führen bereits geringe Veränderungen des Druckes zu einem starken Anstieg der Wandspannung mit erhöhtem Sauerstoffbedarf und einer Abnahme der Ejektionsfraktion. Unter physiologischen Bedingungen ist die Wandspannung des rechten

Herzens niedrig, was einen kontinuierlichen koronaren Blutfluss ermöglicht, während der linke Ventrikel überwiegend in der Diastole perfundiert wird (Steiner and Strauer, 2009).

Die meisten bisherigen Untersuchungen des Phänomens der Herzhypertrophie wurden am linken Ventrikel durchgeführt. Der rechte Ventrikel rückt erst seit Kurzem mehr und mehr in den Mittelpunkt der Forschung. Die Ergebnisse der Analysen der linksventrikulären Hypertrophie können allerdings nicht einfach auf den rechten Ventrikel übertragen werden, da sich beide Herzkammern entwicklungsgeschichtlich unterscheiden. Sie stammen aus zwei getrennten embryonalen Anlagen mit unterschiedlichen Vorläuferzellen und kammerspezifischen Genexpressionsprofilen (Haworth, 2007; Pokreisz et al., 2007). Signaltransduktionsmechanismen und Kalzium-„handling“ unterscheiden sich (Urashima et al., 2008). Im Verlauf einer Hypertrophie kommt es zu einer Reaktivierung der embryonalen (rechts- und linksventrikulär unterschiedlichen) Genprogramme (Bar et al., 2003; Chien et al., 1993).

Der rechte Ventrikel besitzt eine enorme Regenerationfähigkeit. Beobachtungen an Menschen nach einer Lungentransplantation sowie nach einer Endarterektomie zeigten, dass ein PAH-induziertes Remodeling reversibel ist (Steiner and Strauer, 2009; Vonk Noordegraaf and Galie, 2011). Bereits drei Monate nach der Lungentransplantation wiesen die Patienten eine signifikante Verkleinerung des rechten Ventrikels auf (Haworth, 2007).

1.2.3 Pathophysiologie der PH-induzierten Rechtsherzhypertrophie

Infolge einer gesteigerten Nachlast reagiert das rechte Herz zunächst mit einer Steigerung der systolischen Kontraktion und einer konzentrischen Hypertrophie (Zunahme der Wandstärke) bei stark ansteigendem pulmonalarteriellen Druck und gleich bleibendem Herzminutenvolumen. Die initiale adaptive Hypertrophie ist durch eine erhöhte Proteinsynthese und einen Anstieg der Kardiomyozytengröße durch *de-novo* Synthese von Sarkomeren gekennzeichnet. Weiterhin kommt es zu einer Zunahme der extrazellulären Matrix und einer Proliferation der versorgenden Gefäße (Bogaard et al., 2009a; Haworth, 2007). Eine rechtsventrikuläre Hypertrophie konnte in Tiermodellen bereits innerhalb von 96 Stunden nach einer Nachlaststeigerung beobachtet werden (Pokreisz et al., 2007). Einem anhaltenden Druckanstieg vermag der rechte Ventrikel allerdings nicht standzuhalten. Dilatation, Verlust der Kontraktilität, Abnahme der Ejektionsfraktion, Abfall des Herzminutenvolumens, Erhöhung der rechtsventrikulären Kontraktionszeit, ventrikuläre Asynchronie und eine mangelhafte Füllung des linken Ventrikels sind die Folgen einer

rechtsventrikulären Dysfunktion (Gan et al., 2006; Marcus et al., 2008; Steiner and Strauer, 2009; Vonk-Noordegraaf et al., 2005). Durch die Verlagerung des *Septum* in Richtung des linken Ventrikels wird dessen Funktionsbeeinträchtigung verstärkt. Weiterhin kann eine Volumenüberladung des rechten Ventrikels durch Dilatation und Zug auf die Sehnenfäden (*Chordae tendineae*) zur Regurgitation der Trikuspidalklappe führen (Vonk Noordegraaf and Galie, 2011).

1.2.4 Therapie der PH-assoziierten rechtsventrikulären Dysfunktion

Derzeitige Therapieansätze der PH sprechen vor allem die Veränderungen innerhalb der pulmonalen Gefäßstrombahn an (Fukumoto and Shimokawa, 2011; Humbert, 2008; McLaughlin et al., 2009). Die verschiedenen Therapien haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Kontraktilität des rechten Ventrikels. So wirken z.B. ET-1 Rezeptor Antagonisten negativ inotrop (Kelly et al., 1990), während PDE-5 Inhibitoren einen positiv inotropen Effekt (Nagendran et al., 2007) besitzen. Auf den ersten Blick scheint eine Steigerung der rechtsventrikulären Kontraktilität von Vorteil, allerdings muss man beachten, dass sie mit einer Steigerung des Sauerstoffbedarfs einhergeht. Aufgrund der kontrastierenden Anforderungen in Bezug auf Kontraktilität (Steigerung in den Kardiomyozyten *versus* Relaxation der glatten pulmonalarteriellen Muskelzellen), Angiogenese (Inhibierung in der Lunge *versus* Steigerung im Myokard) und Apoptose (Förderung in krankhaft veränderten Endothelzellen der Pulmonalgefäße *versus* Inhibierung in Kardiomyozyten) ist es eine enorme Herausforderung, Therapien zu finden, die gleichzeitig positive Effekte auf die pulmonale vaskuläre Pathologie ausüben und die rechtsventrikuläre Funktion fördern. (Bogaard et al., 2009a).

1.2.5 Mechanismen von adaptiver *versus* maladaptiver Hypertrophie des rechten Ventrikels

Eine physiologische Herzhypertrophie ist durch die Beibehaltung einer normalen kardialen Struktur bei normaler oder gar verbesserter Herzfunktion gekennzeichnet, während eine pathologische Hypertrophie mit dem Verlust von Kardiomyozyten, ihrer Replatzierung durch fibrotisches Material und einer folgenden kardialen Dysfunktion einhergeht (Bernardo et al., 2010).

Die genauen Mechanismen, die einen Umbruch zwischen adaptiver Hypertrophie und rechtsventrikulärem Versagen bewirken, sind noch weitgehend ungeklärt. Eine wichtige Rolle scheint das Missverhältnis von erhöhtem Sauerstoffbedarf bei gleichzeitig

verminderter Sauerstoffzufuhr zu spielen: Die erhöhte Wandspannung führt zu einem erhöhten myokardialen Sauerstoffbedarf (Bogaard et al., 2009a; Steiner and Strauer, 2009) gleichzeitig bewirkt der Anstieg der Wandspannung durch Beeinträchtigung des systolischen Blutflusses in den Koronargefäßen jedoch eine Ischämie (Gomez et al., 2001; van Wolferen et al., 2008).

Faktoren, die zu einer Verminderung der Kontraktilität beitragen, sind eine chronische Aktivierung des sympathischen Nervensystems, oxidativer und nitrosativer Stress, eine Aktivierung der Immunantwort und vermehrte Apoptose. Die Aktivierung neurohormonaler Signalkaskaden durch eine reduzierte Gewebepерfusion führt zur Sekretion von Neurohormonen (Angiotensin II, Aldosteron, Natriuretisches Peptid) mit Einfluss auf Wachstum, Proliferation und Überleben der Kardiomyozyten (Bernardo et al., 2010; Bogaard et al., 2009a). Die Steigerung der Produktion von ROS und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) führt durch Suppression von Enzymen mit einer Rolle im Rahmen der Kontraktion und einer Polynitrosylierung des Ryanodinrezeptors zu einer kontraktilen Dysfunktion, sowie Induktion von Zellzerstörung, Apoptose und Inflammation (Bogaard et al., 2009a; McMurray et al., 1993; Murdoch et al., 2006). Im Rahmen des Remodeling kommt es zu einer Rekrutierung von Immunzellen und Ausschüttung von proinflammatorischen Interleukinen wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Mann, 2002).

Kennzeichen einer maladaptativen Hypertrophie ist eine Umschaltung der vorrangigen Expression des kontraktilen Proteins von α -myosin heavy chain (MHC) auf diejenige des β -MHC. Beta-myosin heavy chain verfügt über eine verminderte Kontraktilität, aufgrund einer geringeren Adenosin-Triphosphatase Aktivität der Köpfchenstruktur (Bogaard et al., 2009a).

Die Insuffizienz der Mikrozirkulation mit resultierender Ischämie spielt eine große Rolle bei der Entstehung einer Fibrose. Im Verlauf der kardialen Hypertrophie entsteht ein Missverhältnis zwischen der Anzahl an Kapillaren und der Größe der von diesen versorgten Kardiomyozyten, was zu einer myokardialen Hypoxie, kontraktiler Dysfunktion und Apoptose führt (Bernardo et al., 2010; Bogaard et al., 2009a; Tomanek, 1990).

Weitere Theorien, die eine potentielle Rolle im kardialen Remodelingprozess spielen, sind die Rekrutierung und Reifung von kardialen Stammzellen (Pokreisz et al., 2007) und eine Umstellung der kardialen Energiegewinnung von der Fettsäureoxidation auf die Glycolyse (Oikawa et al., 2005).

Studien von Bogaard et al. weisen darauf hin, dass eine erhöhte rechtsventrikuläre Nachlast nicht ausreicht, um einen Wechsel von Adaptation zu Dekompensation auszulösen. So entwickelten Ratten, die einem pulmonalarteriellen „banding“ (siehe Kap. 1.4.2) unterzogen wurden, eine rechtsventrikuläre Hypertrophie ohne Rechtsherzversagen, während Tiere, die einer Hypoxie in Kombination mit Applikation eines VEGF-Inhibitors ausgesetzt wurden, eine rechtsventrikuläre Dekompensation aufwiesen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Freisetzung von Mediatoren durch „remodelte“ pulmonale Gefäße, die mit der adaptiven Rechtsherzhypertrophie interferieren (Bogaard et al., 2009b).

Neueste Untersuchungen von Drake et al. zeigen, dass sich die Genexpressionsprofile von kompensatorisch hypertrophierten rechten Ventrikeln einerseits und dekompensierenden rechten Ventrikeln andererseits unterscheiden. Abweichungen treten bei Genen auf, die für die Regulation von Zellwachstum, Angiogenese und Energiehaushalt verantwortlich sind, wie z. B. IGF-1, VEGF und uncoupling protein 2 (UCP2) (Drake et al., 2011).

1.3 Pulmonale Hypertonie in der Tiermedizin

In der Veterinärmedizin kommt der pulmonalen Hypertonie aufgrund wirtschaftlicher Einbußen vor allem bei Rindern und Broilern eine große Bedeutung zu. Die Entstehungsmechanismen der PH bei diesen Spezies sind noch weitgehend ungeklärt, so dass auch im Bereich der Tiermedizin aktuell und beständig geforscht wird. Weiterhin spielt die PH eine zunehmende Rolle in der Kleintiermedizin, und auch bei Pferden kann diese Erkrankung infolge eines Linksherzversagens auftreten (Merck Sharp & Dohme Corp., 2011; Newman et al., 2011; Stepien, 2009; Tan et al., 2007; Tang et al., 2002).

1.3.1 Pulmonale Hypertonie des Rindes

Die häufigste Ursache einer pulmonalen Hypertonie bei Rindern ist eine Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion, verursacht durch die Tierhaltung in großer Höhe. Dieses Phänomen ist auch als high-mountain-disease oder brisket disease bekannt. Höhenunabhängige Ursachen, die zur Ausprägung einer brisket disease führen, sind chronische Intoxikationen durch Swainsonine bei Aufnahme von Farnenwicken (*Oxytropis spp.*) oder Tragant Arten (*Astragalus spp.*) sowie chronische Lungenerkrankungen wie z. B. eine Bronchopneumonie oder der Befall mit Lungenwürmern (Merck Sharp & Dohme Corp., 2011).

Einige Rinderrassen (z. B. Angus) zeigen eine hereditäre Prädisposition für die Entwicklung einer schweren, höhenassoziierten PH (HAPH), während andere resistent sind (z. B. Yak) (Anand et al., 1986; Shirley et al., 2008; Weir et al., 1974). Als Grundlage der genetischen Unterschiede stehen autosomal-dominante Erbgänge oder eine an wenige Hauptgene gekoppelte Vererbung in der Diskussion. Etwa 20% der empfindlichen Tiere, die in Höhen von > 2000 m verbracht werden, entwickeln eine klinisch manifeste HAPH (Newman et al., 2011). Bis zum Auftreten der ersten Symptome vergehen meist über zwei Monate. Stiere, die unter einem Jahr alt sind, scheinen häufiger betroffen zu sein. Initiale Anzeichen sind Mattigkeit und ein reduzierter Bewegungsdrang. Die typischen, namensgebenden subkutanen Ödeme der Trielregion (engl. brisket) folgen und können sich vom Intermandibularraum bis zum ventralen Abdomen ausdehnen. Weiterhin sind eine deutliche Spannung und Pulsation der Jugularvene, eine forcierte Atmung und eine Zyanose feststellbar. Schließlich kommt es zum Festliegen, Kollaps und Tod durch Rechtsherzversagen. Eine mikroskopische Untersuchung der Lungen betroffener Rinder zeigt eine deutliche Mediahypertrophie der kleinen Arterien und Arteriolen (Merck Sharp & Dohme Corp., 2011).

Die Identität der Gene, die ein empfindliches von einem resistenten Tier unterscheiden, ist bis heute ungeklärt. Eine kürzlich durchgeführte Studie von Newman et al. zeigte, dass die Gensequenzen der endothelialen NO-Synthase und des BMPR2, die beide eine wichtige Rolle bei der Entstehung der PH des Menschen spielen, keine Unterschiede zwischen empfindlichen und resistenten Rindern aufweisen. Sie fanden bei erkrankten Tieren 46 heraufregulierte und 14 herunterregulierte Gene im Vergleich zu Gesunden. Diese Studie bietet eine interessante Grundlage für weitere Untersuchungen (Newman et al., 2011).

1.3.2 Pulmonale Hypertonie der Broiler

Eine primäre PH tritt bei jungen, schnell wachsenden Broilern mit einem hohen metabolischen Sauerstoffbedarf auf und ist eine bedeutende Todesursache in der modernen Broilerhaltung (Tan et al., 2007). Die Erkrankung wird als pulmonales Hypertensionssyndrom (PHS) oder Ascites Syndrom bezeichnet. Weitere Ursachen einer PH sind eine höhenassoziierte Hypoxie (ähnlich wie beim Rind), eine Natriumvergiftung oder eine zugrundeliegende Lungenpathologie.

Klinische Symptome des PHS werden erst offensichtlich, wenn ein Rechtsherzversagen eintritt. Die Broiler sind zyanotisch, die Haut am Bauch ist gerötet, die Atemfrequenz steigt,

der Bewegungsdrang nimmt ab und das Wachstum stagniert. Viele Tiere zeigen eine ausgeprägte Ascites. Allerdings treten auch subklinische Todesfälle auf. Die höchste Mortalität zeigen Tiere mit einem Alter von fünf Wochen und männliche Tiere sind häufiger betroffen als weibliche Individuen (Merck Sharp & Dohme Corp., 2011).

Aufgrund des schnellen Wachstums haben die Broiler einen enorm hohen Sauerstoffbedarf. Das Herz steigert seine Pumpleistung, um diesen zu decken und einer Hypoxämie entgegenzuwirken. Limitierende Faktoren sind die Rigidität und die geringe Größe (im Vergleich zur Zunahme der Körpermasse) der Vogellunge. Die Dehnungsfähigkeit der pulmonalen Kapillaren reicht nicht aus, um sich dem erhöhten Herzminutenvolumen anzupassen, und es kommt zu einer Druckerhöhung im pulmonalen Gefäßbett mit folgender Beeinträchtigung des rechten Ventrikels (Merck Sharp & Dohme Corp., 2011; Olkowski, 2007; Tan et al., 2007).

Der PHS liegt eine erbliche Prädisposition zugrunde. Verschiedene Untersuchungen zeigen Defekte der mitochondrialen Atmungskette in Leber, Lunge, Brust- und Herzmuskeln der erkrankten Broiler (Cisar et al., 2005; Tang et al., 2002). Diese Defekte führen zu einer ineffizienten Sauerstoffutilisierung und folglich zu einem unproportional stark steigenden Sauerstoffbedarf. Führt man sich nun vor Augen, dass das Muskelgewebe 45% des Gesamtsauerstoffbedarfs benötigt, wird offensichtlich, wie fatal die Folgen für ein zur Fleischproduktion gezüchtetes Tier sind (Tang et al., 2002).

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Rolle von Vasodilatoren und Vasokonstriktoren im Rahmen des PHS. Erhöhte Spiegel von Serotonin und ET-1, sowie eine erniedrigte Konzentration an NO zeigen dabei interessante Parallelen zur humanen PH (Tan et al., 2007; Wideman et al., 2007).

1.3.3 Pulmonale Hypertonie des Hundes

Aufgrund fortschreitender Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie erlangt die pulmonale Hypertonie auch bei Hunden und Katzen eine zunehmende klinische Bedeutung. Hunde sind dabei häufiger betroffen als Katzen (Henik, 2007). In der Veterinärmedizin spricht man beim Vorliegen eines systolischen pulmonalarteriellen Druckes >30 mmHg, diastolischen pulmonalarteriellen Druckes >15 mmHg oder mittleren pulmonalarteriellen Druckes >20 mmHg von einer klinisch manifesten PH (Stepien, 2009). Tiere beider Geschlechter erkranken gleich häufig (Henik, 2007). Meist sind mittelalte bis alte Hunde kleiner Rassen betroffen. Diese Verteilung reflektiert die Prädisposition älterer Hunde

kleiner Rassen für Mitralklappenerkrankungen. Klinische Symptome sind Husten, Dyspnoe, Lethargie, Synkopen, Bewegungsintoleranz, Herzgeräusche und Ascites. Die veterinärmedizinische Diagnose erfolgt meist durch eine echokardiografische Untersuchung. Eine Herzkatheteruntersuchung stellt zwar den Goldstandard dar, ist aber aufgrund einer benötigten Sedierung oder Anästhesie mit einem hohen Risiko verbunden und zusätzlich sehr kostenintensiv. Zur Diagnosesicherung können, wie in der Humanmedizin, die Blutspiegel der beiden Biomarker BNP und NT-proBNP verwendet werden (Kelliher and Stepien, 2010).

Die klinische, veterinärmedizinische Klassifizierung der PH orientiert sich an der humanen Evian-Klassifikation. Quinn und Williams unterscheiden in ihrer Einteilung fünf verschiedene Klassen (Quinn and Williams, 2011a):

Klasse 1 – pulmonalarterielle Hypertonie: Kongenitale Shunts (wie z. B. ein persistierender *Ductus arteriosus*, atriale und ventrikuläre Septumdefekte) und Herzwurminfektionen (*Dirofilaria immitens* und *Angiostrongylus vasorum*) sind die am häufigsten vorkommenden Ursachen der caninen PAH. Auch eine idiopatische PH kann, wenn auch nur selten, bei Hunden auftreten.

Klasse 2 – pulmonalvenöse Hypertonie: Primäre Linksherzerkrankungen sind die häufigste Ursache einer (sekundären) PH bei Hunden. Degenerative Erkrankungen der Mitralklappe haben die größte Bedeutung.

Klasse 3 – Lungenerkrankungen oder Hypoxie: Lungenerkrankungen, die bei Hunden zur Ausprägung einer PH führen, sind z. B. Lungenfibrose, Pneumonie, tracheobronchiale Erkrankungen und Neoplasien. Eine hohe Rasseprädisposition weisen West Highland White Terrier auf: Bis zu 40% dieser Hunde mit einer chronischen interstitiellen Lungenerkrankung zeigen eine PH.

Klasse 4 – thrombembolische Erkrankungen: Zu den caninen pulmonalen thrombembolischen Erkrankungen gehören die immunmedierte hämolytische Anämie, Neoplasien, Nephropathien und Enteropathien mit Proteinverlust, Hyperadrenocortizismus, Sepsis und Traumata.

Klasse 5 – multifaktorielle Ursachen: Über Fälle dieser Kategorie liegen in der Veterinärmedizin nur wenige Berichte vor. Meist handelt es sich um Gegebenheiten, die eine Kompression der pulmonalen Gefäße zur Folge haben, wie z. B. Neoplasien.

Für eine angemessene Therapie stehen derzeit keine veterinärmedizinisch zugelassenen Medikamente zur Verfügung, so dass auf humanmedizinische Präparate zurückgegriffen

werden muss. Endothelin Rezeptor Antagonisten zeigten in experimentellen Studien positive Effekte, finden klinisch aber keine Anwendung, da sie zu kostenintensiv sind. Prostazyklinanaloga werden intravenös oder inhalativ verabreicht und können aufgrund dieser Darreichungsformen in der Tiermedizin nicht verwendet werden (Kelliham and Stepien, 2010; Quinn and Williams, 2011b). Einzig der kurzwirksame, oral verfügbare PDE-5 Inhibitor Sildenafil wurde bisher in größerem Rahmen veterinärmedizinisch erprobt (Bach et al., 2006; Brown et al., 2010; Kellum and Stepien, 2007; Toyoshima et al., 2007). Verschiedene Studien zeigen eine Senkung des PAP, eine Verbesserung der Lebensqualität und Leistungsfähigkeit, sowie eine Verlängerung der Lebensdauer. Es treten keine therapielimitierenden Nebenwirkungen auf. Somit ist Sildenafil für die PH des Hundes die Therapie der Wahl. Aufgrund der kurzen Verabreichungsintervalle von Sildenafil (alle acht Stunden) gibt es Therapieversuche mit längerwirksamen PDE-5 Inhibitoren wie Tadalafil oder Vardenafil, die nur einmal täglich gegeben werden müssen. Allerdings existieren über diese Substanzen noch keine publizierten veterinär-klinischen Studien (Kelliham and Stepien, 2010; Quinn and Williams, 2011b).

1.4 Experimentelle Tiermodelle

Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, repräsentiert die PH eine multifaktorielle Erkrankung, deren Pathogenese eine große Anzahl von verschiedenen molekularen Signalkaskaden und Mediatoren einschließt, deren Rollen und Interaktion noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Weiterhin steht zurzeit noch keine Behandlung zur Verfügung, die eine Heilung dieser Erkrankung ermöglicht. Es besteht hinsichtlich Pathogenese und Therapie also noch großer Forschungsbedarf. Dazu steht heute eine Vielzahl verschiedener Tiermodelle zur Verfügung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden das Modell der Hypoxie-induzierten chronischen PH und das Modell des pulmonalarteriellen „banding“ (siehe Kap. 1.4.2) herangezogen, um die pulmonalen und kardialen Veränderungen im Verlauf einer PH zu untersuchen.

1.4.1 Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie

Die Exposition gegenüber chronischer Hypoxie ist eines der am häufigsten verwendeten Tiermodelle zur Induktion einer PH (Stenmark et al., 2009) und wird bereits seit vielen Jahren in der Forschung eingesetzt (Naeye, 1967; Urbanova et al., 1973). Es kommen

Versuchsprotokolle mit normobarer oder hypobarer Hypoxie zur Anwendung, die beide eine vergleichbare PH hervorrufen. Das Modell gilt als vorhersehbar und gut reproduzierbar. Die meist verwendeten Tierspezies sind Maus und Ratte (Ryan et al., 2011; Stenmark et al., 2009).

Zu beachten ist eine artspezifische Variation der Reaktion auf den hypoxischen Stimulus. So zeigen z. B. Frettchen, Schweine und Rinder eine starke, Ratten, Katzen, Kaninchen, Ponys, Ziegen, Schafe und Menschen eine intermediäre und Mäuse, Hamster, Meerschweinchen und Hunde eine geringe hypoxische pulmonale Vasokonstriktion. Des Weiteren weisen in Höhenlagen einheimische Tierarten wie Yak, Pika (Pfeiffhase), Bharal (Blauschaf) sowie Menschen (Tibeter) eine geringere HPV, keine PH und kein vaskuläres Remodeling auf (Sylvester et al., 2012). Die hypoxische Reaktion wird weiterhin durch das Alter beeinflusst. Junge Tiere sind aufgrund der voranschreitenden Lungenentwicklung empfindlicher als adulte Individuen (Haworth, 1988; Stenmark et al., 2009). Es bestehen nicht nur speziesspezifische, sondern auch individuelle Unterschiede in der Reaktion auf eine Hypoxie. In humanmedizinischen Studien zeigten gesunde Probanden markante Variationen hinsichtlich der Ausprägung einer pulmonalen Vasokonstriktion und einem damit verbundenen Anstieg des PAP, von kaum erfassbaren bis hin zu extrem starken Reaktionen (Fowler and Read, 1963; Laks et al., 1997; Naeije et al., 1982).

Eine Hypoxieexposition geht (ungeachtet des unterschiedlichen Ausmaßes) bei allen Säugetieren mit sehr ähnlichen strukturellen pulmonalen Veränderungen einher: Es erfolgen eine Muskularisierung von kleinen, vormals nicht muskularisierten Arterien (*de-novo* Muskularisierung) und eine Zunahme der Wandstärke von muskularisierten präkapillären Pulmonalarterien. Typisch ist das Vorliegen einer von mononukleären Zellen geprägten Inflammation (Burke et al., 2009; Frid et al., 2006). Zusätzlich kommt es zu einer fibrotischen Verdickung der *Adventitia* und Zunahme der *Media* der großen proximalen Pulmonalarterien mit resultierender Steigerung der Rigidität. Hypoxie-exponierte Mäuse zeigen trotz geringem vaskulären Remodeling einen Anstieg des PAP. Sie entwickeln nur eine leichte Verdickung der *Media* und eine geringe Proliferation der glatten Muskelzellen. Die Hypoxie-induzierten Veränderungen erweisen sich bei Reexposition in Normoxie als reversibel (Ryan et al., 2011; Stenmark et al., 2009). Klöpping zeigte in ihrer Dissertation eine vollständige Revertierung des durch eine dreiwöchige Hypoxieexposition verursachten Gefäßumbaus und Anstieges des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) nach einer zweiwöchigen Normoxiereexposition und eine Normalisierung der rechtsventrikulären

Masse nach sechs Wochen, bei der Maus (Klöppling, 2010). Auch bei Menschen, die an einer höhenassozierten PH erkranken, kommt es nach Rückkehr auf Seehöhe zu einer Verbesserung des Zustandes (Stenmark et al., 2009).

1.4.2 Mausmodell des pulmonalarteriellen „banding“

Ein pulmonalarteriell „banding“ (PAB) dient als Modell für eine gesteigerte Druckbelastung des rechten Ventrikels, wie sie mit kongenitalen Herzerkrankungen (Shunts, Ventrikelseptumdefekte, atriale Septumdefekte, Pulmonalarterienstenosen) oder einer pulmonalen Hypertonie einhergeht.

Man versteht darunter eine Reduktion des Durchmessers der Pulmonalarterie durch einen Ring, einen Clip oder eine Ligatur (je nach Tierspezies). Das PAB-Modell ist bereits seit über 30 Jahren bekannt und wurde zunächst häufig bei Katzen angewendet, um die Folgen einer rechtsventrikulären Drucküberladung zu untersuchen (Marino et al., 1986; Spann et al., 1972; Wisenbaugh and O'Connor, 1988). Aber auch bei Hunden (Szabo et al., 2006), Schafen (Geens et al., 2009; Leeuwenburgh et al., 2003), Schweinen (Cusimano et al., 1988), Kaninchen (Alpert and Mulieri, 1982; Rouleau et al., 2001), Ratten (Ito et al., 1994; Olivetti et al., 1988; Roncon-Albuquerque et al., 2006) und Mäusen (Rockman et al., 1994) wurde dieses Modell im Rahmen verschiedener kardialer Fragestellungen eingesetzt. Zur Erforschung der Mechanismen der rechtsventrikulären Hypertrophie im Verlauf einer PH liegen bereits verschiedene Publikationen über den Einsatz eines PAB bei Hunden (Hsieh et al., 1992), Ratten (Schafer et al., 2009) und Mäusen (Rockman et al., 1994; Vistnes et al., 2010) vor.

Frühe Untersuchungen wurden aufgrund der einfacheren Operationsmethode an größeren Tieren (Katzen, Ratten) durchgeführt. In den letzten Jahren ist es durch hochentwickelte Mikroskope und mikrochirurgische Instrumente in der kardiovaskulären Forschung zu einem Wechsel von Ratten zu Mäusen als Versuchstiere gekommen. Die Durchführung eines PAB ist bei der Maus aufgrund der extrem dünnen Wand des pulmonalen *Truncus* und der geringen Toleranz des rechten Ventrikels gegenüber jeglicher Manipulation ein komplizierter Eingriff. Die Präparation des Gewebes unterhalb der Pulmonalarterie während der Operation führt zu einer Blockade des Blutflusses zu den Lungen und somit zu einer Beeinträchtigung der respiratorischen und kardialen Funktion. Ein „banding“ der Aorta zur Induktion einer linksventrikulären Druckbelastung wurde weitaus häufiger angewendet als das PAB und ist somit besser etabliert. Dies kann zum Einen durch das, aufgrund der

geringeren Prävalenz von rechtsventrikulären Pathogenesen, bisher größere Interesse der Forschung an linksventrikulären Erkrankungen, sowie durch den hohen Schwierigkeitsgrad des PAB erklärt werden (Tarnavski, 2009; Tarnavski et al., 2004).

1.5 Siah – Spitze des Eisberges

1.5.1 Die Siah-Ubiquitinligasen

Die seven in absentia homolog (Siah)-Proteine sind Ubiquitin-E3-Ligasen. Sie wurden während der Suche nach genetischen Homologien zwischen *Drosophila melanogaster* und Säugetieren entdeckt und verdanken ihren Namen der Übereinstimmung mit den seven in absentia (Sina)-Proteinen der Fliege. Die Untersuchung der Entwicklungsmechanismen bei *Drosophila* Fliegen zeigte bereits eine Reihe von Parallelen zu denjenigen bei Vertebraten. Das Sina-Gen ist notwendig für die Entwicklung des R7 Fotorezeptors der Fliege. Es existiert eine starke Konservierung der Gensequenz zwischen dem Sina-Gen der Fliegen und den murinen Siah-Genen, sowie eine ungewöhnlich hohe Homologie der Aminosäuresequenz für die translatierten Sina- und Siah-Proteine. Die Maus besitzt drei funktionelle Siah-Gene, *siah1a*, *siah1b* und *siah2* sowie zwei *siah1*-Pseudogene (Della et al., 1993). Die Sequenzen der *siah1a*- und *siah1b*-Gene ähneln sich stark, sie differieren in nur 25 Basennukleotiden und codieren für Proteine mit einer Länge von 282 Aminosäuren, die sich lediglich in sechs Aminosäuren unterscheiden (98% identisch). Siah2-Proteine sind mit 325 Aminosäuren etwas größer und unterscheiden sich in der N-terminalen Region von den Siah1-Proteinen (85% identisch) (Holloway et al., 1997). Die *siah*-Gene werden während der Embryonalentwicklung sowie in vielen adulten Geweben exprimiert. Es erfolgt eine gleich starke Expression in murinem adulten Gewebe aus Gehirn, Milz, Darm, Muskel, Herz, Lunge, Hoden, Niere, Speicheldrüse und Thymus. In der Leber konnte Siah nicht nachgewiesen werden (Della et al., 1993). Siah2 wird in hohem Maße in proliferierenden Keimzellen des murinen Ovars und Hodens gebildet (Della et al., 1995).

Das menschliche Genom besitzt ein *siah1*-Gen und ein *siah2*-Gen. Das humane *siah1*-Gen ist homolog zum murinen *siah1a*-Gen (Holloway et al., 1997). Sina- und Siah-Proteine sind im Zytoplasma lokalisiert (Hu et al., 1997), wobei Siah1 zusätzlich im Nukleus nachgewiesen werden konnte (Kim et al., 2009b).

1.5.2 Ubiquitinligasefunktion von Siah

Ubiquitin ist ein kleines, ubiquitär vorkommendes, hoch konserviertes Protein aus nur 76 Aminosäuren. Es wird durch die Verknüpfung seines C-terminalen Glycinrestes mit den Lysinresten seiner Zielproteine an diese gebunden (Löffler and Petrides, 2002). Die Anlagerung weiterer Ubiquitinmoleküle an einen der sieben Lysinreste des ersten Ubiquitins führt, abhängig von dem verwendeten Lysinrest, zur Formation unterschiedlich langer und geformter Ketten mit jeweils unterschiedlichen zellulären Funktionen. So spielt eine Monoubiquitinierung eine Rolle bei Endozytose, Histonregulierung, nukleärem Proteinexport sowie DNA-Reparatur. Eine Multiubiquitinierung (mehrere einzelne Ubiquitinmoleküle werden an verschiedene Lysinreste des Zielproteins gekoppelt) führt zur Endozytose. Eine Polyubiquitinierung kann, je nach Lysinrest an den die Ubiquitinkette anknüpft, einen proteasomalen Abbau (Lysin 48), die Aktivierung von Proteinkinasen oder eine Endozytose auslösen, sowie in DNA-Reparatur-Prozesse (Lysin 63) involviert sein (Haglund and Dikic, 2005; Pickart and Eddins, 2004).

Vor allem im Rahmen des proteasomalen Abbaus spielt die Ubiquitinierung eine tragende Rolle (Löffler and Petrides, 2002). Sie stellt eine sequentielle Reaktion dar, die in drei Schritten erfolgt. Zunächst bindet das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) ein Ubiquitinmolekül und aktiviert es dadurch energieabhängig unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP). Anschließend wird das Ubiquitin an das Ubiquitin-transferierende Enzym (E2) überführt. Während es nur ein Ubiquitin-spezifisches E1 Enzym gibt, existieren eine Reihe verschiedener E2 Enzyme. Im letzten Schritt wird das Ubiquitin durch eine substratspezifische Ubiquitinligase (E3) auf das Zielprotein übertragen. Es existieren drei Unterfamilien der E3-Enzyme: HECT (homologous to the E6-AP carboxyl terminus), RING (really interesting new gene) und U-Box-E3 Ligasen (Hershko and Ciechanover, 1998; Pickart and Eddins, 2004). Die Siah-Ubiquitin E3 Ligasen gehören zur Familie der RING-Finger Ubiquitinligasen mit einer katalytischen E2 bindenden RING Domäne und einer C-terminalen Substratbindungsdomäne (SBD). Siah1 und Siah2 zeigen eine starke Homologie in der SBD, variieren aber in der N-terminalen RING-Domäne (House et al., 2009).

Siah ubiquitiniert eine Reihe verschiedener Substrate mit den unterschiedlichsten Funktionen und ist somit in mannigfaltige zelluläre Prozesse involviert (Tab. 1.5.1). Es kann seine Substrate entweder direkt binden oder mit verschiedenen Adaptorproteinen wie Siah-interacting-protein (SIP) oder plenty of SH3s (POSH) interagieren (Nakayama et al., 2009).

Einleitung

Protein		Funktion
N-Cor	nuclear receptor co-repressor	Transkriptions- steuerung
c-Myb	avian myeloblastosis virus oncogene cellular homolog	
OBF1/BOB1	Oct binding factor 1/ B cell Oct-binding protein	
β-Catenin		
PML	promyelocytic leukemia protein	
CtIP	C-terminal binding protein	
TIEG-1	TGFβ-inducible early gene-1	
HIPK2	homeodomain-interacting protein kinase 2	
T-STAR	testis-signal transduction and activation of RNA	
FBP-3	far upstream element (FUSE) binding protein	
TRF2	telomeric repeat binding factor 2	
Tramtrack		
PHD	Prolyl-4-Hydroxylasen	HIF-Regulation
FIH	factor inhibiting HIF	
AKAP121	A-kinase anchoring protein 121	Mitochondrien/ Metabolismus
OGHDC	2-oxoglutaratdehydrogenase-complex	
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	Signaltransduktions- moleküle
Numb		
Vav	guanine nucleotide exchange factor (protooncogene)	
Spry2	Sprouty2	
Bag-1	Bcl-2 associated athanogene	Apoptose
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
POSH	plenty of SH3s	
Peg3, Peg10	paternally expressed gene 3, 10	
DCC	deleted in colorectal cancer	Zelloberflächenrezeptor
Kid	kinesin-like DNA binding protein	Mitose
α-Tubulin		Zytoskelett
Synaptophysin		neuronale Signaltransduktion
AF4	acute lymphoblastic leukemia 1-fused gene from chromosome 4	
α-Synuclein		
Synphilin-1		
mGluR1	metabotropic glutamate receptor 1	
pAPC	adenomatous polyposis coli	Proteindegradation/ Degradationskomplex
Ubc H5	ubiquitin-conjugating enzyme H5	
Phyllopod		
Dab-1	disabled-1	Siah-Aktivität

Tabelle 1.5.1: Zielproteine von Siah (Übersicht ohne Anspruch auf Vollständigkeit)

(Brauckhoff et al., 2011; Calzado et al., 2009; Frew et al., 2003; Hara et al., 2006; Horikawa et al., 2011; Kim et al., 2011; Nakayama et al., 2009; Shah et al., 2009; Xu et al., 2006)

Zur Ubiquitinierung mancher Zielproteine, wie z. B. β -Catenin, werden komplizierte Komplexe aus Siah1, SIP, S-phase kinase-associated protein 1 (Skp1), transducin beta like (TBL1) und adenomatous polyposis coli (APC) benötigt (Matsuzawa et al., 2003; Matsuzawa and Reed, 2001).

1.5.3 Siah und die hypoxische Reaktion

1.5.3.1 Zelluläre Adaptationsvorgänge bei Hypoxie

Die Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre beträgt 20,9%. Verglichen mit der atmosphärischen Konzentration an Sauerstoff sind die meisten Organe und Gewebe des Körpers hypoxisch. Die physiologische Normoxie im Körperinneren liegt bei 2-9% O₂. Sinkt die Sauerstoffkonzentration, beginnen Zellen eine Reihe von verschiedenen Signalkaskaden zu aktivieren, um sich den veränderten Bedingungen anzupassen und ein Überleben des Organismus zu ermöglichen. Die Energieproduktion wird von oxidativer Phosphorylierung auf Glykolyse umgestellt, die Glukoseaufnahme wird heraufreguliert und glykolytische Enzyme werden induziert, der Zellmetabolismus wird gesenkt, die Atemfrequenz und die Erythrozytenproduktion des Gesamtorganismus steigen (Nakayama, 2009).

1.5.3.2 Der Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktor (HIF) - Schlüsselenzym der hypoxischen Reaktion

Die Schlüsselrolle bei der Aktivierung dieser Kaskaden trägt der sogenannte Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktor (HIF). Der Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktor ist eines der vielen Proteine, die durch Siah (im Rahmen der Siah-Prolyl-4-Hydroxylasen/ HIF-inhibierender Faktor-Kaskade) reguliert werden. Das Heterodimer HIF besteht aus einer Hypoxie-induzierbaren α -Untereinheit und einer kontinuierlich exprimierten β -Untereinheit. Um einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor zu bilden, müssen sich beide Untereinheiten im Zellkern zu einem Komplex zusammenlagern (Wang et al., 1995). Anschließend kann sich das entstandene Heterodimer an Promotorregionen, die ein sogenanntes hypoxia-responsive element (HRE) besitzen, anlagern und die Transkription nachgeschalteter Gene induzieren. HIF regulierte Gene besitzen viele verschiedene physiologische Funktionen, wie die Regulation von Zellzyklus, Zelltod, Metabolismus, Säure-Basen Status, Erythropoese, Vaskularisierung, Zellproliferation, -migration und

-differenzierung. Es reguliert die Expression von Enzymen, Liganden, Rezeptoren und Ionenkanälen (Nakayama et al., 2009).

Es existieren drei Isoformen der α -Untereinheit von HIF (HIF1 α , HIF2 α und HIF3 α) und zwei der β -Untereinheit (aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) und ARNT2). HIF1 α und HIF2 α sind potente Aktivatoren von Hypoxie-induzierbaren Genen. Die Rolle von HIF3 α ist weniger gut erforscht, aber es wird vermutet, dass es als transkriptionaler Repressor von HIF1 α fungiert. HIF1 α und HIF2 α haben viele gemeinsame Zielgene (wie z. B. VEGF), allerdings ist ihre Gewebedistribution unterschiedlich. Während HIF1 α ubiquitär exprimiert wird, wird HIF2 α gewebespezifisch in Endothel, Niere, Lunge, Herz und Dünndarm gebildet (Nakayama, 2009; Nakayama et al., 2009).

Die HIF1 α und HIF2 α Untereinheiten unterliegen in Normoxie einem kontinuierlichen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasomen-System. Ihre biologische Halbwertszeit liegt im Bereich von nur zehn Minuten (Hänze et al., 2007). Die HIF α -Untereinheit wird dabei durch Ubiquitinierung markiert und von einem Komplex aus von Hippel-Lindau Protein (pVHL), Elongin B, Elongin C, Cullin2 und Rbx1 abgebaut. Von Hippel-Lindau Protein hat in diesem Prozess durch das Erkennen und Binden der HIF α Untereinheit eine essentielle Funktion (Nakayama, 2009; Nakayama et al., 2009).

1.5.3.3 Prolyl-4-Hydroxylasen und HIF-inhibierender Faktor

Voraussetzung für das Erkennen der HIF α -Untereinheit durch pVHL ist eine Hydroxylierung von HIF α an zwei spezifischen Prolinresten (Prolin 406 und Prolin 564) (Nakayama et al., 2009; Nakayama and Ronai, 2004). Diese Aufgabe wird von den Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD, für prolyl-4-hydroxylase domain-containing) übernommen, von welchen die drei Isoformen PHD1, PHD2 und PHD3 existieren (Abb. 1.7.1). Weitere posttranslationale Modifizierungen denen HIF α unterliegt, sind die Hydroxylierung eines Asparaginrestes (Asparagin 803) durch den HIF-inhibierenden Faktor (FIH, factor inhibiting HIF), wodurch seine transkriptionale Aktivität inhibiert wird (Abb. 1.7.1), eine Phosphorylierung durch ERK-MAPK oder eine SUMOylierung (Calzado et al., 2009; Nakayama et al., 2009).

Die PHDs sowie FIH gehören zu einer Familie von Fe(II) und 2-Oxoglutarat-abhängigen Oxygenasen. Sie benötigen Sauerstoff, Ascorbinsäure, 2-Oxoglutar Säure und Fe²⁺, um ihre katalytische Funktion erfüllen zu können. Beide Proteine werden durch Hypoxie inhibiert.

Die enzymatische Aktivität der PHDs wird bereits unter milden hypoxischen Bedingungen herabgesetzt, HIF α wird nicht mehr hydroxyliert und folglich nicht mehr abgebaut. *In vivo* kommt PHD2 die dominierende Rolle bei der normoxischen HIF1 α -Regulation zu, während PHD1 und PHD3 eine stärkere Aktivität gegenüber HIF2 α besitzen. PHD2 wird am stärksten und ubiquitär in allen Organen exprimiert. Den höchsten Gehalt an PHD3 findet man im Herzen. Die Rolle von PHD1 in der HIF1 α -Regulation *in vivo* ist noch ungeklärt (Fong and Takeda, 2008; Nakayama et al., 2009). Prolyl-4-Hydroxylase 3 bildet in Hypoxie Proteinkomplexe aus mehreren Molekülen; diese „Enzympöhlen“ besitzen eine verminderte Hydroxylierungsaktivität, sind aber vor einer Ubiquitinierung durch Siah geschützt (Nakayama et al., 2007). Interessanterweise werden PHD2 und PHD3 in Hypoxie durch HIF1 α induziert. Neben der Aufgabe als negativer Feedback-Mechanismus unter Hypoxie könnte dies einen raschen Abbau der HIF α -Isoformen bei einer anschließenden Reoxygenierung sicherstellen (Fong and Takeda, 2008; Nakayama et al., 2009).

Der HIF-inhibierende Faktor wird erst bei starker Hypoxie inaktiviert. In Zellkulturexperimenten bleibt seine Aktivität bis zu einer Sauerstoffkonzentration von nur 0,2% O₂ erhalten (Calzado et al., 2009; Stolze et al., 2004).

1.5.4 Siah-Zielproteine – Regulation von HIF

Siah1 und Siah2 degradieren PHD1 und PHD3, wobei Siah2 über eine höhere Kapazität verfügt. Prolyl-4-Hydroxylase 2 wird Siah-unabhängig reguliert. FKBP38, ein Immunophilin interagiert mit PHD2 und führt zu seiner Degradierung (Barth et al., 2009). Die Siah-Ubiquitinligasen zeigen eine unterschiedliche Bindungskapazität für die PHDs mit der Rangfolge: PHD3 > PHD1 > PHD2 (Moller et al., 2009; Nakayama et al., 2004).

Die Fähigkeit von Siah2, PHD3 zu degradieren, steigt in Hypoxie (Nakayama and Ronai, 2004). Nakayama et al. gehen davon aus, dass die Regulation der PHD3-Stabilität durch Siah2 ausschlaggebend für die physiologische Reaktion in milder Hypoxie ist (Nakayama, 2009). Eine bedeutende Rolle für PHD3 untermauern Cioffi et al., die eine erhöhte Expression von PHD3, nicht aber von PHD1 und PHD2 in kardialen Myozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen infolge einer Hypoxie zeigen (Cioffi et al., 2003). Siah1 führt in Normoxie zur Degradierung von FIH (Fukuba et al., 2008; Shang et al., 2012).

Ein weiteres Zielprotein von Siah, das in die HIF-Regulation involviert ist, ist die homeodomain-interacting proteinkinase 2 (HIPK2). Diese Kinase fungiert als Regulator der

Genexpression durch Phosphorylierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie HIF1 α und anderen (Calzado et al., 2008).

Siah reguliert die HIF α -Transkription also auf drei verschiedenen, unabhängigen Wegen (Qi et al., 2010a). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass ohne Siah die postrationalen Regulationsmechanismen von HIF ungehemmt wirken und zu einem Abbau von HIF führen können. Untersuchungen an *Siah1a/2*-Doppelnulzellen in Hypoxie stützen diese These: Eine Expression von *hif1a*, sowie seinem Zielgen *vegf* kann in diesen kaum nachgewiesen werden (Nakayama et al., 2004; Nakayama and Ronai, 2004).

1.5.5 Siah als Zielprotein – „upstream Regulation“

Über die Regulation der Aktivität von Ubiquitinligasen liegen nur wenige Studien vor (Khurana et al., 2006). Siah unterliegt einer beständigen Auto-Ubiquitinierung, die seine Verfügbarkeit limitiert (Hu and Fearon, 1999; Lorick et al., 1999).

Die Transkription von *siah2* wird vorrangig durch die Sauerstoffkonzentration reguliert. So erfolgt in embryonalen Mausfibroblasten unter Hypoxie bereits nach zwei Stunden ein Anstieg der *siah2* Genexpression, nach fünf Stunden ist ein Maximum erreicht und nach 14 Stunden fällt die Expressionsrate auf Werte gering über Basalniveau ab. Die Induktion ist unter 10%, 5% und 1% Hypoxie gleich stark, was eine Rolle von Siah2 in milder Hypoxie impliziert. Der zugrunde liegende Mechanismus der Hypoxie-bedingten Heraufregulation ist noch unbekannt (Nakayama et al., 2004; Nakayama and Ronai, 2004). Auch für *siah1* wurde eine zeitabhängige Heraufregulation der Genexpression in verschiedenen Zelltypen unter hypoxischen Bedingungen gezeigt. Die Heraufregulation beginnt nach sechs Stunden und persistiert für 12-24 Stunden (Wang et al., 2011).

Ein interessanter Regulationsmechanismus ist die Interaktion von Siah und HIPK2. Unter Normoxie phosphoryliert diese Kinase Siah2, destabilisiert es dadurch und verkürzt seine Halbwertszeit sowie seine Substratbindungsfähigkeit. Ein sehr geringer Anteil der HIPK2 wird von Siah2 ubiquitiniert und anschließend degradiert. In Hypoxie ist die Siah/HIPK2-Interaktion gesteigert, die E3 Ligase kann HIPK2 ubiquitinieren und vermittelt somit die Degradation der Kinase (Calzado et al., 2009) (Abb. 1.7.1).

Obwohl Siah1 und Siah2 eine Reihe von gemeinsamen Funktionen besitzen wird ihre Expression unterschiedlich reguliert. Die Proteinkinase Akt, die in bestimmten Zellen durch Hypoxie aktiviert wird, ist in der Lage Siah2 zu induzieren (Nakayama et al., 2009). Eine Phosphorylierung von Siah2 durch die Hypoxie-induzierte p38 mitogenaktivierte

Proteinkinase (p38 MAPK) führt zu einer Steigerung seiner Aktivität (Khurana et al., 2006). Kürzlich wurde gezeigt, dass p75 Neurotrophin (p75^{NTR}), ein Mitglied der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie, der in neuronalen Geweben weithin exprimiert wird, Siah2 unter hypoxischen Bedingungen, durch das Verhindern der Autoubiquitinierung, stabilisiert (Le Moan et al., 2011). Die Expression von *siah1* wird durch p53, einem Protein, das eine Rolle bei Wachstumsstillstand und Apoptose spielt, induziert. P53 wird bei genotoxischem Stress (wie z. B. UV-Strahlung), aber auch unter Hypoxie exprimiert (Amson et al., 1996; Matsuzawa et al., 1998) (Abb. 1.7.1).

1.5.6 Andere Zielproteine von Siah

Neben der HIF-Signalkaskade sind die Siah-Ubiquitinligasen in eine Reihe weiterer Signaltransduktionswege, die Apoptose und Zellproliferation steuern, involviert. Ein wichtiges Zielprotein, durch dessen Ubiquitinierung Siah in den Apoptosemechanismus eingreift, ist tumor necrose factor associated factor protein 2 (TRAF2). Es existieren sowohl Reporte über pro-, als auch über antiapoptotische Wirkungen (Christian et al., 2011; Habelhah et al., 2002; Polekhina et al., 2002). Weitere Wege, durch die Siah die Apoptose beeinflusst, sind die c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Kaskade (Shah et al., 2009; Wen et al., 2010; Xu et al., 2006), die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Hara et al., 2006; Hara and Snyder, 2006) und telomeric repeat binding factor2 (TRF2) (Horikawa et al., 2011).

Im Prozess des Zellwachstums und der Zellmigration wirkt Siah über die Ras/Raf Signalkaskade und Erk ein (Ahmed et al., 2008; Shah et al., 2009; Wen et al., 2010), eine Schlüsselrolle spielt dabei Sprouty2, das ein Siah-Zielprotein ist und diese Kaskade hemmt (Qi et al., 2008).

Zwei prominente Siah-Zielproteine, die sowohl im Rahmen der Apoptose als auch bei der Zellproliferation eine Rolle spielen, sind β -Catenin (Dimitrova et al., 2010; Liu et al., 2001; Wang et al., 2011) und HIPK2 (Calzado et al., 2008; Calzado et al., 2009; Kim et al., 2009b; Winter et al., 2008).

Ein weiterer Angriffspunkt von Siah ist der mitochondriale Zitratzyklus, *via* Ubiquitinierung des 2-Oxoglutaratdehydrogenase-Komplexes (OGHDC) (Habelhah et al., 2004; Shah et al., 2009).

1.5.7 Siah in der Forschung

Der Hauptfokus der Untersuchungen über die Siah-Ubiquitinligasen lag bisher im Bereich der Tumorforschung. Verschiedene Studien zeigen eine Rolle von Siah in der Tumorigenese und Metastasierung von diversen Tumortypen, wie Mammatumoren (Chan et al., 2011; Moller et al., 2009; Wong et al., 2012), Prostatakrebs (Qi et al., 2010a; Qi et al., 2010b), Melanomen (Qi et al., 2008; Shah et al., 2009), Lungentumoren (Ahmed et al., 2008; Nakayama, 2009), Lebertumoren (Brauckhoff et al., 2011), Pankreastumoren und nasopharyngealen Tumoren (Nakayama et al., 2009). Die Siah Ubiquitin E3 Ligasen sind dabei sowohl über HIF-abhängige als auch über die oben beschriebenen HIF-unabhängigen Signaltransduktionswege involviert. Die Inhibierung von Siah kann das Wachstum von Pankreastumoren, Lungentumoren und Melanomen verhindern (Nakayama, 2009).

Parallelen zwischen Tumoren und einer PH sind ein hypoxisches Milieu, die Proliferation von Zellen und eine Verminderung der Apoptoserate. Weiterhin zeigen Krebszellen, sowie proliferierende pulmonalvaskuläre Endothelzellen einen Wechsel im Glukosemetabolismus von oxidativer Phosphorylierung zu Glykolyse (Schermyly et al., 2011; Sommer et al., 2008).

Gegenwärtig beginnt Siah ebenfalls stärker in den Fokus der Forschung an kardialen Fragestellungen zu rücken. Neuere Studien zeigen, dass Siah interacting protein (SIP) während eines Myokardinfarktes sowie während des Ablaufes von Hypoxie-/Reoxygenierungskaskaden heraufreguliert wird (Au et al., 2006) und dass ein Verlust von SIP bei *Drosophila* eine Kardiomyopathie verursacht (Casad et al., 2012). Kim et al. publizierten kürzlich, dass *Siah2*^{-/-} Mäuse eine reduzierte Infarktgröße und eine geringere Apoptoserate im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Kontrollen aufweisen (Kim et al., 2011).

1.5.8 Siah knockout-Mäuse

In der Literatur ist die Generierung von *Siah1a* und *Siah2* knockout (KO) Mäusen beschrieben.

1.5.8.1 Siah1a knockout Mäuse

Dickins et al. publizierten 2002 die Kreation von *Siah1a* KO Mäusen mit einem C57BL/6J Hintergrund. Diese Tiere zeigen eine postnatale Wachstumsverzögerung, eine hohe Sterblichkeit der Welpen und eine Sterilität der Böckchen aufgrund einer Blockade der Spermatogenese mit folgender Apoptose der Spermien (Dickins et al., 2002). Wenig später

beschrieben Frew et al. bei *siah1a*^{-/-} Mäusen ein reduziertes Knochenvolumen aufgrund einer Reduktion der Osteoblasten und des Osteoidvolumens sowie einen Anstieg der Anzahl der Osteoklasten. Weiterhin besitzen die KO Tiere, verglichen mit WT Mäusen, durch eine reduzierte Anzahl nur 30-50% der hämatopoetischen Stammzellen (Frew et al., 2004).

1.5.8.2 Siah2 knockout-Mäuse

Die Generierung von Siah2 KO Mäusen, ebenfalls mit einem C57BL/6J Hintergrund, veröffentlichten Frew et al. 2003 (Frew et al., 2003). Die *siah2*^{-/-} Mäuse sind fertil und zeigen einen unauffälligen Phänotyp. Die Expression von Siah1 ist im Gewebe und in Lymphozyten der *siah2*^{-/-} Mäuse unverändert. Dies impliziert eine überlappende Funktion von Siah1 und Siah2, wodurch phänotypische Konsequenzen bei *siah2*^{-/-} Mäusen verschleiert werden. Ein kombinierter knockout von *siah1a* und *siah2* führt zu einer embryonalen oder postpartalen Sterblichkeit aller Nachkommen. Die lebend geborenen Welpen von *siah2*^{+/-} *siah1a*^{-/-} Mäusen sterben vor dem Absetzen und die Würfe von *siah2*^{-/-} *siah1a*^{-/-} Tieren bereits innerhalb weniger Stunden nach der Geburt (Frew et al., 2003).

Nakayama und Mitarbeiter untersuchten *siah2*^{-/-} Mäuse unter hypoxischen Bedingungen (7% O₂) und stellten eine verminderte Polyzytämie sowie eine beeinträchtigte ventilatorische Reaktion fest. Nach zweiwöchiger Hypoxieexposition weisen *siah2*^{-/-} Mäuse einen geringeren Anstieg der roten Blutzellen auf als ihre WT-Kontrollen, gemessen durch Bestimmung des Hämoglobingehaltes. In akuter Hypoxie (15 Minuten) reagieren WT Tiere mit einer Steigerung der Atemfrequenz und einer Reduktion des Metabolismus, während die *siah2*^{-/-} Mäuse zwar ebenfalls einen herabgesetzten Metabolismus, aber keine Steigerung der Atemfrequenz aufweisen. In Normoxie zeigen beide Mauslinien identische Werte (Nakayama et al., 2004; Nakayama and Ronai, 2004).

1.6 Rolle der Siah-Kaskade in der pulmonalen Hypertonie und kardialen Hypertrophie

Es existieren kaum Veröffentlichungen über Siah im Rahmen der PH und der Rechtsherzhypertrophie. Allerdings gibt es in diesem Themenbereich bereits eine Vielzahl von Publikationen über sein Zielprotein HIF.

1.6.1 Rolle von HIF in der pulmonalen Hypertonie

In der Pathogenese der PH sind Proliferation, Zellmigration und Apoptose pathologische Schlüsselereignisse. HIF spielt eine wichtige Rolle im Rahmen dieser Prozesse und wird in den meisten Zellen der hypoxischen Lunge (Bronchialepithel, Alveolarepithel, glatte Muskulatur und vaskuläres Epithelium) exprimiert. Die ausschlaggebende Rolle von HIF im Krankheitsgeschehen der PH ist bereits umfassend dargelegt (Hänze et al., 2007; Stenmark et al., 2006b).

HIF-regulierte Gene, die eine Rolle in der Entstehung der PH spielen, sind diejenigen für VEGF, VEGF-Rezeptor2, ET-1, AT-1-Rezeptor, endotheliale und induzierbare NO-Synthase, Erythropoetin (EPO), TRPC1 und 6, 5-HT-Transporter, $K_v1.5$, PDGF und IGF-2. Von großer Bedeutung ist dabei die Rolle der HIF-regulierten Gene im pulmonalarteriellen Remodelingprozess. Studien an heterozygoten HIF1 α (*hif1 α ^{+/-}*) Mäusen zeigen, dass diese eine verminderte Hypoxie-induzierte PH mit vermindertem vaskulären Remodeling entwickeln. Heterozygote HIF2 α (*hif2 α ^{+/-}*) Tiere sind vollkommen gegen ein pulmonalvaskuläres Remodeling geschützt (Hänze et al., 2007; Østergaard and Gassmann, 2011).

Neben Hypoxie-assoziierten Formen der PH konnte auch in chemisch und genetisch induzierten Formen der PH eine Beteiligung von HIF nachgewiesen werden (Semenza, 2012). *Fawn hooded* Ratten entwickeln z. B. eine spontane PH aufgrund einer abnormalen mitochondrialen Sauerstoffmessung (oxygen sensing) sowie einer gesteigerten HIF1 Induktion (Bonnet et al., 2006).

1.6.2 Rolle von HIF im Herzen

Im Herzen steuert HIF verschiedene Funktionen. Eine myozytenspezifische HIF1 α -Deletion führt zu eingeschränkter Kontraktilität und Vaskularisierung. Weiterhin kommt es zu Veränderungen im Kalziumfluss und Glukosemetabolismus (Huang et al., 2004). HIF1 α spielt eine Rolle bei Erkrankungen der Koronararterien (Semenza, 2012) und hat eine

protektive Funktion im Ischämie-Reperfusionen-Modell (Cai et al., 2008; Eckle et al., 2008; Semenza, 2012). Bezüglich des Modells der kardialen Drucküberladung (transaortic constriction, TAC, dt. transaortale Konstriktion) existieren Studien, die eine protektive Rolle für HIF1 α zeigen (Sano et al., 2007; Wei et al., 2012), aber auch kontroverse Ergebnisse, die eine HIF1 α Expression für eine maladaptative Entwicklung verantwortlich machen (Krishnan et al., 2009). Weitere Hinweise auf eine negative Funktion für HIF1 α liefert ein ischämisches Kardiomyopathiemodell, bei dem ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von HIF1 α und der Entstehung einer kontraktile Dysfunktion gezeigt wurde (Bekeredjian et al., 2010).

1.7 Wissenschaftliche Fragestellung der Arbeit

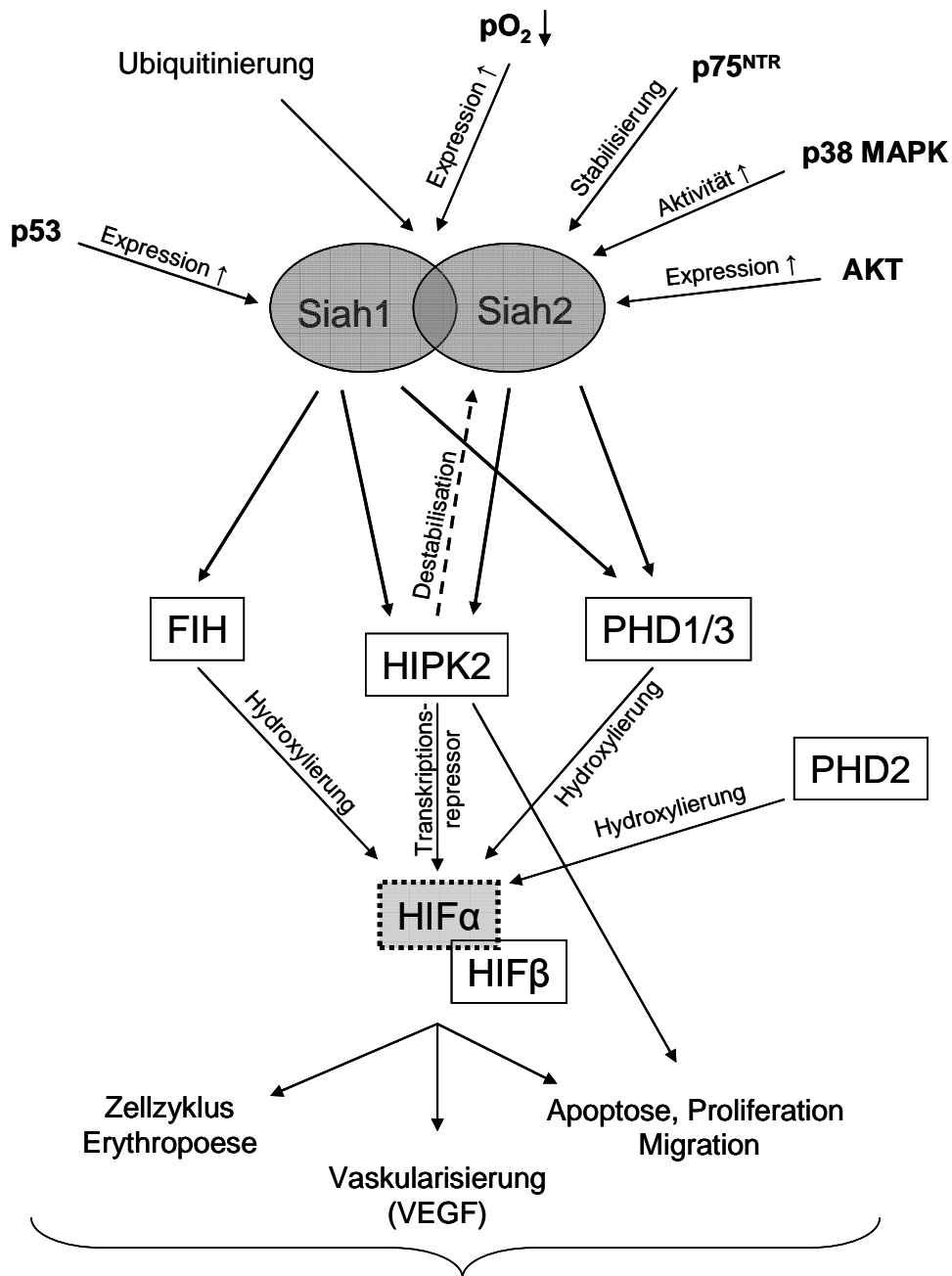
Es gibt noch immer kaum Therapiemöglichkeiten der pulmonalen Hypertonie (PH), die eine gleichzeitige Behandlung der Lungenpathologie und der Dekompensation des rechten Herzens ermöglichen. Da Siah-Enzyme spezifische Proteine aus Signalkaskaden, die im Rahmen beider Pathomechanismen eine Rolle spielen, ubiquitiniert, stellen diese Ligasen einen höchst interessanten therapeutischen Angriffspunkt dar.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Spielen die Siah-Ubiquitinligasen eine Rolle in der Pathogenese der PH?
- Welchen Schweregrad der PH entwickeln *siah2*^{-/-} und *siah1*^{+/-}/*2*^{-/-} knockout Mäuse
 - im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH?
 - im Mausmodell der PAB-induzierten rechtsventrikulären Hypertrophie? (Erzeugung einer von der pulmonalen Strombahn unabhängigen rechtsventrikulären Hypertrophie)
 - Experimentelle Zielparameter dieser Fragestellung sollten sein:
 - terminaler systolischer arterieller und rechtsventrikulärer Druck
 - terminaler Grad der rechtsventrikulären Hypertrophie
 - Dokumentation der Entwicklung der rechtsventrikulären Funktion durch echokardiografische Verlaufskontrollen

- Wie stark ist das pulmonalvaskuläre Remodeling bei *siah2*^{-/-} und *siah1*^{+/-}/*2*^{-/-} knockout Mäusen im Modell der Hypoxie-induzierten PH ausgeprägt?
 - histologische Untersuchung der Gefäßmorphometrie der pulmonalen Strombahn
- Wie entwickeln sich der rechtsventrikuläre Kollagengehalt (Fibrose), die Kardiomyozytengröße (Hypertrophie) und die kapilläre Blutversorgung (Neoangiogenese) der *siah2*^{-/-} und *siah1*^{+/-}/*2*^{-/-} knockout Mäuse in beiden Tiermodellen?
 - histologische Untersuchung des rechten Herzventrikels
- Wie beeinflussen die Bedingungen in den beiden verwendeten Tiermodellen die Expression der Siah-Ubiquitinligasen?
 - Genexpression von *siah*
- Beeinflussen die Siah-Ubiquitinligasen die Entstehung bzw. Progression einer PH durch die Regulation der Siah-PHD-HIF-VEGFA Kaskade?
 - Zielparameter dieser Fragestellung sollten sein:
 - Proteinexpression der Prolyl-4-Hydroxylasen
 - Proteinexpression des Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktors
 - Proteinexpression von vascular endothelial growth factor A

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Promotionsarbeit war, dass die Deletion der Siah-Ubiquitinligasen als oberster Regent der PHD-HIF-VEGFA Signalkaskade die Pathogenese der PH und rechtsventrikulären Hypertrophie in beiden Tiermodellen entscheidend zu beeinflussen vermag. Die Siah-Ubiquitinligasen induzieren den Abbau von FIH, HIPK2 sowie PHD1 und PHD3, während PHD2 unbeeinträchtigt bleibt. Somit werden die Hydroxylierung sowie die Repression der Transkription von HIF α erheblich vermindert bzw. verhindert. Die Menge an verfügbarem HIF steigt und beeinflusst durch seine regulatorische Funktion im Ablauf des Zellzyklus, der Erythropoese, der Vaskularisierung, der Apoptose, der Proliferation und der Zellmigration die Entwicklung der PH und der Rechtsherzhypertrophie (Abb. 1.7.1).



Pulmonale Hypertonie & Rechtsherzhypertrophie

Abbildung 1.7.1: Hypothetische Rolle der Siah-Ubiquitinligasen in der HIF-abhängigen Pathogenese der pulmonalen Hypertonie und Rechtsherzhypertrophie.

p53= ein Tumorsuppressorprotein, pO₂= Sauerstoffpartialdruck, p75^{NTR}= p75 Neurotrophin, p38 MAPK= p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, AKT= eine Proteinkinase (siehe 1.5.5) FIH= factor inhibiting HIF, PHD= Prolyl-4-Hydroxylasen (siehe 1.5.3.3 und 1.5.4), HIPK2= homeodomain-interacting proteinkinase 2 (siehe 1.5.5), HIF= Hypoxie-induzierter Faktor (siehe 1.5.3.2), VEGF= vascular endothelial growth factor (siehe 4.4.3)

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden weibliche und männliche Siah2 knockout (KO) Mäuse und Siah2 Wildtyp (WT) Mäuse, sowie heterozygote Siah1a (Het) /2KO Mäuse und C57BL/6J Mäuse untersucht. Zuchtpaare der Siah2KO, Siah2WT und Siah1aHet/2KO Linien wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Andreas Möller (Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australien) im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Schmitz (Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität, Gießen) zur Verfügung gestellt. Die Zucht der verwendeten Tiere erfolgte im Zentralen Tierlabor (Frankfurter Straße 105, 35392 Gießen) der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die C57BL/6J Mäuse stammten von der Firma Charles-River Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland). Die Siah2KO Mäuse wurden mit den Siah2WT Mäusen als interne Kontrollen verglichen. Als Kontrollen für die Siah1aHet/2KO Tiere (Siah1/2KO) dienten C57BL/6J Mäuse (BL/6J). Zur Vereinfachung werden Siah2KO und Siah2WT Mäuse im Folgenden als „Siah2 Gruppe“ und Siah1aHet/2KO und C57BL/6J Mäuse als „Siah1/2 Gruppe“ bezeichnet (Tab. 2.1.1).

Linie	Genotyp	Background	Herkunft
<i>Siah2 Gruppe</i>			
Siah2KO	<i>siah2^{-/-}</i>	C57BL/6J	Peter MacCallum Cancer Centre
Siah2WT	<i>siah2^{+/+}</i>	C57BL/6J	Peter MacCallum Cancer Centre
<i>Siah1/2 Gruppe</i>			
Siah1aHet/2KO	<i>siah1a^{+/-}2^{-/-}</i>	C57BL/6J	Peter MacCallum Cancer Centre
C57BL/6J			Charles-River Deutschland GmbH

Tabelle 2.1.1: Verwendete Mauslinien

Um eine Vergleichbarkeit mit dem Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie des Erwachsenen zu ermöglichen, wurden adulte Mäuse eingesetzt. Die Tiere wurden in einem Alter von 8 – 16 Wochen und mit einem Gewicht von 15,0 – 31,5 g in den Versuch genommen.

Während des Versuchszeitraumes wurden die Tiere im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten und von den dort beschäftigten Tierpflegern versorgt. Die Mäuse erhielten Futter (Altromin® Standarddiätfutter) und Wasser *ad libitum*. Die Beleuchtungsdauer im Tierstall betrug dreizehn Stunden pro Tag (von 6:00 Uhr – 19:00 Uhr), die Umgebungstemperatur im Mittel 25°C und die Luftfeuchtigkeit 40-60%.

2.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Die durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt und können unter folgenden Aktenzeichen eingesehen werden:

- GI 20/10 Nr. 111/2010
„Hypoxie-induzierte PH – Regulation und Einfluss von Prolylhydroxylasen (PHD) und Siah“
- GI 20/10 Nr. 54/2011
„Rechtsherzhypertrophie – Rolle von Siah1 und 2“
- GI 20/10 Nr. 73/2011
„Hypoxie-induzierte PH – Einfluss von Siah auf den rechten Ventrikel“

2.1.3 Material und Geräte für die Mausmodelle

2.1.3.1 Injektionslösungen und Substanzen

Buprenorphin	Temgesic®	Essex Pharma München, Deutschland
50% 2-Propanol / 1% Providonjod-Lösung	Braunoderm®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Glucose 5%	Glucose 20%® 1:4 verdünnt	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Heparin	Heparin-Natrium-25000- ratiopharm®	Ratiopharm GmbH Ulm, Deutschland
Isofluran	Isofluran Baxter®	Baxter Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland
Kaliumchlorid	30 mg/ml KCl gelöst in 0,9% NaCl-Lsg.	Carl Roth GmbH & Ko Karlsruhe, Deutschland
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml	Ketamin 10%®	Belapharm GmbH & Co KG Vechta, Deutschland
Natriumchloridlösung (100 ml)	Isotonische Natriumchlorid-lösung Diac®	Serag-Wiessner KG Naila, Deutschland
Natriumchloridlösung (1000 ml)	zum Spülen und Befeuchten	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	Xylazin 2%®	Ceva Tiergesundheit GmbH Düsseldorf, Deutschland

2.1.3.2 Verbrauchsmaterial

Augensalbe	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital Leverkusen, Deutschland
Dreiwegehahn	Discofix®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einbettkassetten, groß	Rotilabo® Einbettkassette Macro	Carl Roth GmbH & Ko Karlsruhe, Deutschland
Einbettkassetten, klein	Tissue Tek® 3 Uni-Cassette®	Sakura Finetek Europe B.V Zoeterwoude, Niederlande
Einmalhandschuhe	Vasco® Nitril white	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalnitrilhandschuhe	Peha soft® nitrile	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Einmalspritze 1 ml, 2 ml, 5ml, 10 ml, 20 ml	Inject Luer®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalspritze 50 ml	Original Perfusor® Spritze	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Enthaarungscreme	Elca® Med Creme	ASID BONZ Herrenberg, Deutschland

Material und Methoden

Eppendorf Tubes	Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Ko Nümbrecht, Deutschland
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Hämatokritkapillaren		Hirschmann Laborgeräte GmbH & KoKG Eberstadt, Deutschland
Hämatokritversiegelungskit		Brand GmbH & KoKG Wertheim, Deutschland
Kanülen 24G (0,55 mm x 25mm) 26G (0,45 mm x 25 mm) 30G (0,3 mm x 25 mm)	BD Microlance 3®	Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland
Medizinisches Klebeband	Durapore®	3M St. Paul, MN, USA
Nahtmaterial	Prolene® 6-0 Ethicon Polypropylen	Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland
Parafilm		American National Can Menasha, WI, USA
Perfusor-Leitung 150 cm		B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
PET-Schläuche	mit unterschiedlichen Durchmessern	
Polyester Garn 5/0		FSSB Jestetten, Deutschland
Schraubdeckeltubes	Cryo.s™ Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Skalpel 10er, 11er, 20er	Feather® Disposal Scalpel	Pfmmedical AG Köln, Deutschland
Titaniumclips für Pulmonalarterie	WECK Hemoclip® small titanium ligating clips	Edward Weck, Research Triangle Park, NC, USA
Ultraschallgel	Aquagel®	Parker Laboratories Inc. Fairfield, NJ, USA
Venenverweilkanüle 20G (1,1 mm x 33 mm)	Vasofix® Safety	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Xylocaingel	Xylocain®Gel 2% Lidocainhydrochlorid	Astra Zeneca GmbH Wedel, Deutschlang
Zellstofftupfer 4 x 5 cm	Pur-Zellin®	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Handtücher		Tork Mannheim, Deutschland

2.1.3.3 Geräte für die Echokardiographie

EKG Tisch	Vevo 770	VisualSonics Inc. Toronto, Ontario, Kanada
Isofluranverdampfer	Vet Equip	KF Technology Rom, Italien
Rektalthermometer		Indus Instruments Houston, TX, USA
Ultraschallgerät	Vevo 770	VisualSonics Inc. Toronto, Ontario, Kanada

2.1.3.4 Geräte und Materialien für das Hypoxiemodell

Atemkalk	Drägersorb® 800 Plus	Dräger Medial GmbH Lübeck, Deutschland
Blutgasanalysegerät ABL 330		Radiometer Kopenhagen, Dänemark
Iso-Gard® Filter	HUDSON RCI	Teleflex Medical GmbH Kernen, Deutschland
Membran Vakuumpumpe		KnF-Neuberger Freiburg, Deutschland
O ₂ -Controller	Modell 4010	Labotect Göttingen, Deutschland
O ₂ -Sensor	Teledyne Oxygen Sensor C-1	TeledyneAnalytical Instruments City of Industry, CA, USA

2.1.3.5 Geräte und Instrumente für die chirurgische Eingriffe

Arterienclip	Aesculap® Biemer Clip	Aesculap AG Tuttlingen, Deutschland
Beatmungspumpe	MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik March, Deutschland
Clipapplier		Edward Weck, Research Triangle Park, NC, USA
Computer mit Monitor		
Druckaufnehmer	APT 300	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Druckwandler	Combitrans Monitoring Set Mod. II for arterial Blood Pressure Measurement	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Hämatokrit-Zentrifuge	Hämatokrit 210	Hettrich Zentrifugen Tuttlingen, Deutschland
Katheter für <i>A. carotis</i>	Micro Cannulation Sysytem	FST Fine science tools GmbH Heidelberg, Deutschland

Katheter für <i>V. jugularis</i>	Hyman Mouse Pressure Catheter 14 cm	Nu MED Inc. Hopkinton, NY, USA
Mandrin zur Intubation	gefertigt aus Spinalkanüle 20G (0,9 mm x 75 mm)	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Messschieber	Absolute Digimatic Caliper	Mitutoyo Deutschland GmbH Neuss, Deutschland
Narkosekammer		Keutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland
Operationsbesteck		FST Fine science tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Software von HSE	Pulmodyn W	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Spülkanüle	Pulmonalarterieller Katheter Sondeanfertigung für ILU1	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Stativ	Zum Halten der Spritzen während des Spülens	
Trachealtubus	aus Vasofix® Safety 20G gekürzt auf ca. 1,5 cm	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Vergrößerungslupe	MS5	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wasserbad		Keutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland
Wundhaken	gefertigt aus 20G Kanülen BD Microlance 3®	Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland

2.1.4 Histologie

2.1.4.1 Geräte/ Software/ Makros

Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
geschlossener Vakuum- Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1050	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom vollautomatisch	RM 2165	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop Durchlicht	DMLA	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

Material und Methoden

Wärmeschrank		Memmert GmbH & Co KG Schwabach, Deutschland
Computer	Q 550 IW	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Makro für - Muskularisierungsgrad - Wandstärke - Kollagenanteil		entwickelt von Hr. Christoph Frank (Informatiker), Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

2.1.4.2 Verbrauchsmaterial

Deckgläser 24 x 36 mm		R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Eindeckmedium Xylol-löslich	Pertex®	Medite GmbH Burgdorf, Deutschland
Mikrotomklingen S 35	Feather	Produkte für die Medizin AG Köln, Deutschland
Objektträger	Superfrost Plus®	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Paraffin Einbettmedium	Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Selecta Faltenfilter		Schleicher + Schüll GmbH Dassel, Deutschland

2.1.4.3 Lösungen, Kits und Antikörper für die immunhisto- und zytochemischen Markierungen

Albumin bovine Fraction V		Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Anti-alpha-smooth muscle actin; clone 1A4 monoclonal, mouse anti-human	Verdünnung 1:900 mit 10% BSA	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Anti-von Willebrand Faktor polyclonal, rabbit anti-human	Verdünnung 1:900 mit 10% BSA	Dako Cytomation Hamburg, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl
DAB Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, pro analysi	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Eisen-Haematoxylin A nach Weigert enthält Ethanol		Division Chroma Münster, Deutschland
Eisen-Haematoxylin B nach Weigert		Division Chroma Münster, Deutschland
Essigsäure 100%		Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70%, 96%, 99,6% vergällt mit Ethylmethylketon		Fischer Saarbrücken, Deutschland
Fluoro care anti-fade-mountant von Biocare Medical		Zytomed Systems GmbH Berlin, Deutschland
Formaldehyd – Lösung 3,5 – 3,7 %	neutral gepuffert mit Methanol stabilisiert	Otto Fischar GmbH & Co. KG Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd säurefrei $\geq 37\%$		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
ImmPRESS Reagent Anti-rabbit IgG		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Isolectin B4-TRITC	L5264-2MG	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Isopropanol (99,8%)		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat pro analysi	KH_2PO_4	Merck Darmstadt, Deutschland
Methanol, reinst		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Methylgrün		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Natriumchlorid pro analysi	NaCl	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Pikrinsäure, wässrig, gesättigt		Appli Chem GmbH Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Dako Real™	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH Eching, Deutschland
R.T.U. Horseradish		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Resorcin Fuchsin		Waldeck GmbH & CO. KG Münster, Deutschland
Salzsäure 25%	HCl	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Säurefuchsin		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Sirius Rot F3B Lösung		Niepötter Labortechnik Bürstadt, Deutschland
Trizma® Base		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

Trypsin	Digest All 2 [®]	Zytomed Berlin, Deutschland
Vector VIP [®] Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Vector [®] M.O.M. Immunodetection Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Wasserstoffperoxid 30% pro analyse		Merck Darmstadt, Deutschland
WGA-FITC	L4895	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Xylol		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Molekularbiologie

2.1.5.1 Verbrauchsmaterial

2 ml Schraubverschluss- Gefäße	Mikro-Schraubröhre	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
4x NuPage LDS		Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
6x Loading Dye		Fermentas St. Leon Rot, Deutschland
96-well Mikroplatten		Thermo Fischer Scientific Schwerte, Deutschland
Acrylamid/Bis		Serra Nürnberg, Deutschland
Agarose		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Amersham Hyperfilm ECL GE		GE Healthcare München, Deutschland
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
<i>Aqua dest.</i>		B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
CaCl ₂	Kalziumchlorid	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Chemilumineszenzfilm	Cronex 5 Medical X-Ray Film	Agfa, Morstel, Belgien
Complete		Roche Mannheim, Deutschland
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Glycin		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

HCl 37%	Salzsäure 37%, rauchend	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Keramikkügelchen	1,4mm	Peqlab Erlangen, Deutschland
NaN ₃	Natriumazid	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Na-Orthovanadat (200 mM)		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße		Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
PMSF (100 mM)	Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
PVDF-Membran	Polyvenylidendifluorid	Pall Corporation Dreieich, Deutschland
Real-time PCR-Reaktionsgefäße		Thermo-Fischer (Abgene), Hamburg, Deutschland
SDS (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide)	Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Skim milk		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
SYBR safe DNA gel stain		Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Pulver 0,5 M pH 6,8	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Pulver 1,5 M pH 8,8	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Tween 20		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Whatman-Filter		Schleicher & Schuell Dassel, Deutschland
β-Mercaptoethanol		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

2.1.5.2 Kits und Standards

DC protein assay		Bio-Rad München, Deutschland
DNA-Standard	GeneRuler™ 100bp Ladder	Fermentas St. Leon-Rot, Deutschland
iScript cDNA-Synthese Kit		Bio-Rad München, Deutschland

Material und Methoden

peqGOLD total RNA Kits		Peqlab Erlangen, Deutschland
Proteinstandard	Precision Plus Protein™ Standards (Dual Color)	Bio-Rad München, Deutschland
RayBio® mouse VEGF ELISA Kit		Hölzel Diagnostika GmbH Köln, Deutschland
RNase-free DNase Set		Quiagen Hilden, Deutschland
iTaq™ SYBR® green supermix with Rox		Bio Rad München, Deutschland

2.1.5.3 Geräte

Bio Imaging System	ChemiGenius	VWR (Syngene) Darmstadt, Deutschland
Elektrophoresekammer		Keutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland
Entwicklermaschine	Crurix	Agfa Morstel, Belgien
Homogenisator	Precellys 24	Peqlab Erlangen, Deutschland
Mikroplattenlesegerät (1)	Elx808	Bio Tek Bad Friedrichhall, Deutschland
Mikroplattenlesegerät (2)	Molecular Devices Versamax Microplatereader	MDS Analytical Technologies Ismaning, Deutschland
Mikrozentrifuge 200R		Hettich Tuttlingen, Deutschland
Real-time PCR System	Mx3000P® QPCR System	Agilent (Stratagene), Waldbronn, Deutschland
Semidry-Blot-System		Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Spannungsgerät für Elektrophorese		Biometra Göttingen, Deutschland
Spektrometer, NanoDrop	ND-1000	Kisker-Biotech Steinfurt, Deutschland
Thermoblock		VWR Bruchsal, Deutschland
Thermocycler	T-personal	Biometra Göttingen, Deutschland
Vertikal-/Horizontalschüttler		Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland

2.1.5.4 Primerdesign und verwendete Primer

Die Primer (Tab. 2.1.2) wurden mit dem frei verfügbaren Programm „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) erstellt und als 100 µM Lösung von der Firma Metabion International AG (Martinsried, Deutschland) bezogen. Damit alle Primer mit dem selben PCR-Programm verwendet werden konnten, wurden sie so konstruiert, dass ihre Schmelztemperaturen zwischen 61 und 63°C lagen.

Gen	Primersequenz	Produktgröße (bp)
<i>b2m</i>	F: 5'-AGCCCAAGACCGTCTACTGG-3'	128
	R: 5'-TTCTTTCTGCGTGCATAAATTG-3'	
<i>hprt1</i>	F: 5'-GCTGACCTGCTGGATTACAT-3'	202
	R: 5'-TTGGGGCTGTACTGCTTAAC-3'	
<i>siah2</i>	F: 5'- AATGCCGCCAGAAGTTAAGC-3'	133
	R: 5'-AGGGAACAGCCCGTGGTAG-3'	
<i>siah1a/b</i>	F: 5'-TTCCTGGTGCTGTTGACTGG-3'	144
	R: 5'-TTTCAGCTTGCTTGCTGCGTGTT-3'	
<i>vegfa</i>	F: 5'-GCACTGGACCCTGGCTTTAC-3'	173
	R: 5'CGGGGTACTCCTGGAAGATG-3'	
<i>vegfr1</i>	F: 5'CCGGAAGCTCTGATGATGTG-3'	186
	R: 5'CCTTGGGCTTGGTCTCAGTC-3'	
<i>vegfr2</i>	F: 5'TCCCTGCCTACCTCACCTGT-3'	195
	R: 5'-CTGGCTGTCATCTGGGATCA-3'	

Tabelle 2.1.2: Verwendete Primer

2.1.5.5 Antikörper für die Westernblotanalysen

Für die Westernblotanalysen wurden die in Tabelle 2.1.3 und 2.1.4 aufgeführten Antikörper (AK), in 6% (w/v) Milch, gelöst in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween (tris buffered saline with tween, TBST), verdünnt verwendet.

Primärantikörper				
Name	Spezies	Firma	Bestellnr.	Verdünnung
HIF-PHD1-AK	rabbit	Novus Biologicals, Cambridge, England	NB100-310	1:1000
HIF-PHD2-AK	rabbit	Novus Biologicals, Cambridge, England	NB100-2219	1:1000
HIF-PHD3-AK	goat	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	Sc-46030	1:500
β -Aktin	mouse	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland	A5316	1:30000
α -Tubulin	mouse	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	Sc-5286	1:1000

Tabelle 2.1.3: Verwendete Primärantikörper

Sekundärantikörper (Peroxidase gekoppelt)				
Name	Spezies	Firma	Bestellnr.	Verdünnung
Anti-Goat	donkey	Santa Cruz Heidelberg, Deutschland	Sc-2020	1:3000
Anti-Mouse	rabbit	Promega Mannheim, Deutschland	W402B	1:5000
Anti-Rabbit	goat	Promega Mannheim, Deutschland	W401B	1:5000

Tabelle 2.1.4: Verwendete Sekundärantikörper

2.2 Methoden

2.2.1 Mausmodell 1: Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie

Zur Erzeugung einer Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie wurden die Mäuse für 28 Tage in einer geschlossenen, normobaren Kammer (1), bei 10% Sauerstoff gehalten (Abb. 2.2.1). Die prozentuale Sauerstoffkonzentration im System wurde permanent durch einen O₂-Controller (7) überwacht und autoregulatorisch durch die Zufuhr von Stickstoff oder Sauerstoff (8) konstant gehalten. Der Druck des einströmenden Gases wurde über ein Flowmeter (9) geregelt und eine Pumpe (4) sorgte für eine kontinuierliche Luftzirkulation. Ein zwischengeschalteter Filter (3) verhinderte, dass Festbestandteile (wie z. B. Einstreu) aus der Kammer in die Pumpe gelangten. Mit Hilfe eines Überdruckventiles (11) wurde eine normobare Atmosphäre erhalten. Die bei der Atmung der Tiere entstandene Feuchtigkeit wurde durch eine Kondensationskühlfalle (5) abgefangen und täglich entfernt. Das abgeatmete CO₂ wurde, durch Leitung der innersystemischen Luft über Atemkalk (6), aus dem System entfernt.

Der Zustand der Tiere wurde täglich überprüft. Das System wurde alle 2-3 Tage zum Wechseln des Trinkwassers und Futters, sowie Säubern der Käfige geöffnet. Die Temperatur innerhalb der Kammern betrug 22-24°C, die Luftfeuchtigkeit 60-65% und die tägliche Beleuchtungszeit dreizehn Stunden. Die Kontrolltiere wurden in einem baugleichen System, dem normoxisches Atemgas (21% O₂) zugeführt wurde, unter den gleichen Versuchsbedingungen gehalten.

Zur Kontrolle des Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalts wurden täglich Gasproben aus der Kammer entnommen und mit einem Blutgasanalysegerät, mit integrierter Gasmessfunktion, analysiert.

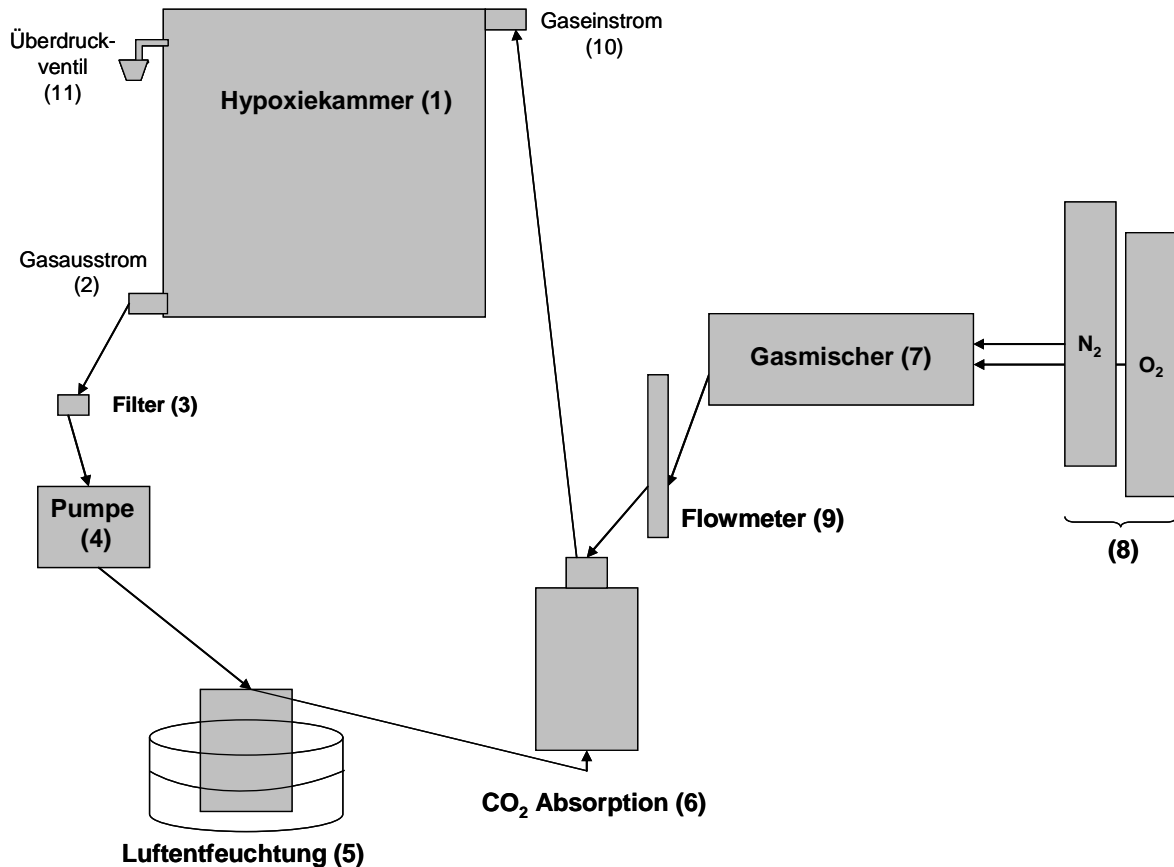


Abbildung 2.2.1: Schematischer Aufbau des hypoxischen Systems. Der Gasfluss erfolgte in Pfeilrichtung.

2.2.1.1 Aufteilung der Tiergruppen

Die Tiere der *Siah2 Gruppe* und der *Siah1/2 Gruppe* wurden in jeweils vier Untergruppen aufgeteilt: Jeweils eine Hälfte der knockout- und Kontrolltiere wurde für 28 Tage in Hypoxie (10% O₂) und die andere Hälfte in Normoxie (21% O₂) gehalten. Es wurden männliche und weibliche Mäuse verwendet.

Stichprobenumfang der Siah2 Gruppe

- n = 20 Siah2WT Normoxie (15 ♂, 5 ♀)
- n = 20 Siah2WT Hypoxie (15 ♂, 5 ♀)
- n = 20 Siah2KO Normoxie (15 ♂, 5 ♀)
- n = 20 Siah2KO Hypoxie (15 ♂, 5 ♀)

Stichprobenumfang der *Siah1/2* Gruppe

- n = 14 *siah1a*^{+/-}*2*^{-/-} Normoxie (9 ♂, 5 ♀)
- n = 16 *siah1a*^{+/-}*2*^{-/-} Hypoxie (11 ♂, 5 ♀)
- n = 17 C57BL/6J Normoxie (12 ♂, 5 ♀)
- n = 16 C57BL/6J Hypoxie (11 ♂, 5 ♀)

Im Rahmen des Versuches erfolgte eine echokardiografische Verlaufskontrolle. Die echokardiografischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov vorgenommen. Die Mäuse wurden einen Tag vor Versuchsbeginn (Tag 0, „baseline“-Messung), nach 2 Wochen (Tag 14), nach 3 Wochen (Tag 21), sowie am letzten Tag vor Versuchsende (Tag 27, Endpunktmessung) unter schonender Inhalationsnarkose mit Isofluran untersucht. (Abb. 2.2.2)

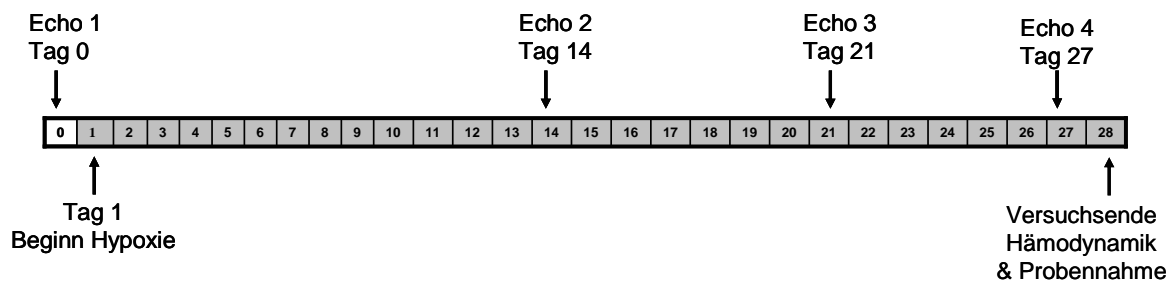


Abbildung 2.2.2: Echokardiografische Verlaufskontrolle im Hypoxiemodell

Am Ende des Versuches (Tag 28) wurden bei 5 weiblichen und 5 männlichen Tieren hämodynamische Messungen, sowie die Entnahme von Herz und Lunge durchgeführt. Bei den übrigen männlichen Tieren wurden lediglich Herz und Lunge entnommen.

2.2.2 Mausmodell 2: Pulmonalarterielle „banding“

Als zweites Mausmodell wurde das pulmonalarterielle „banding“ verwendet. Dieses Modell ermöglicht es, im Gegensatz zum Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie, eine vom pulmonalvaskulären Widerstand unabhängige rechtsventrikuläre Druckbelastung herbeizuführen.

Die Mäuse wurden in eine kleine Narkosekammer gelegt und durch eine Inhalationsnarkose (3,5% Isofluran/Sauerstoff-Gemisch) anästhesiert. Nach Erreichen einer sicheren Narkosetiefe wurden die Tiere mit einer gekürzten Venenverweilkanüle (20G) endotracheal intubiert und künstlich beatmet. Zum Schutz der Cornea gegen Austrocknen wurde Bepanthen® Augensalbe aufgetragen. Die Narkose wurde für die Dauer des Experiments mit 2 - 2,5% Isofluran (v/v) unter künstlicher Beatmung mit reinem Sauerstoff aufrechterhalten. Das Atemzugvolumen betrug 10 µl/g Körpergewicht und die Beatmungsfrequenz 140 Züge pro Minute. Um ein Kollabieren der Alveolen in der maschinellen Expiration zu vermeiden, wurde ein positiv endexpiratorischer Druck von 1 cm Wassersäule festgelegt. Eine Analgesie wurde durch die subkutane Gabe von Buprenorphin (Temgesic®), in einer Dosierung von 0,1 mg/kg, 20 Minuten *prä operationem* erreicht. Während des gesamten operativen Eingriffs wurden die Tiere in Rückenlage in einer flachen doppelwandigen Kunststoffschale, in der ca. 40°C warmes Wasser zirkulierte, gelagert und vorsichtig mit Durapore® Klebeband an Armen und Beinen fixiert. Die Tiere erhielten prophylaktisch eine subkutane Injektion von 0,3 - 0,5 ml Natriumchlorid-Lösung zum Ausgleich des *intra operationem* auftretenden Flüssigkeitsverlustes.

Nach gründlicher Rasur und Hautdesinfektion mit Braunoderm® erfolgte eine etwa 1cm lange Hautincision im linken Thorakalbereich, auf Höhe des zweiten Interkostalraumes, mit einem 20er Skalpel. Die Brustmuskulatur wurde stumpf gelöst und mit kleinen Wundhaken aus 20G Kanülen zurückgehalten. Anschließend wurde die Interkostalmuskulatur im zweiten Interkostalraum durchtrennt und der Thorax anterolateral eröffnet. Es folgte ein vorsichtiges Spreitzen der Rippen mit Hilfe der Wundhaken. Anschließend wurden das Perikard eröffnet, die *Arteria pulmonalis* aufgesucht und sehr vorsichtig frei präpariert. Das „banding“ der Pulmonalarterie erfolgte durch Aufsetzen eines Hemoclip® mittels eines „Clipappliers“. Der Clip wurde auf einen Durchmesser von 0,3 mm verengt, was einem Stenosegrad von 65 - 70% entspricht. Anschließend wurde der Thorax mit Einzelheften (6.0 Prolene®) verschlossen und die Hautwunde mit einer fortlaufenden Naht (ebenfalls mit 6.0 Prolene®) versehen. Nach der Operation erhielten die Mäuse 100 µl einer 5%

Glukoselösung subkutan. Bis zum Wiedererlangen aller Reflexe wurden sie mit Sauerstoff beatmet und anschließend extubiert. *Post operationem* fand eine analgetische Versorgung der Tiere mit Buprenorphin in einer Dosierung von 0,1 mg/kg s.c. 2x täglich über 3 - 5 Tage (abhängig vom klinischen Befund) statt.

Die Scheinoperation („sham“) beinhaltete alle Operationsschritte, außer das Setzen der Stenose mittels des Clips. Die postoperative Versorgung erfolgte ebenfalls wie bei den PAB-Tieren beschrieben.

2.2.2.1 Aufteilung der Tiergruppen

Die Tiere der *Siah2 Gruppe* und der *Siah1/2 Gruppe* wurden in jeweils vier Versuchsgruppen aufgeteilt: Jeweils eine Hälfte der knockout- und Kontrolltiere wurde einem pulmonalarteriellen „banding“ unterzogen, während die andere Hälfte „sham“-operiert wurde. Der Versuchszeitraum betrug für beide Gruppen 22 Tage. In diesem Modell wurden nur männliche Tiere untersucht. Die unterschiedlichen Tieranzahlen beruhen auf der jeweiligen Verfügbarkeit der Mäuse.

Stichprobenumfang der Siah2 Gruppe

- n = 10 Siah2WT sham
- n = 15 Siah2WT PAB
- n = 8 Siah2KO sham
- n = 15 Siah2KO PAB

Stichprobenumfang der Siah1/2 Gruppe

- n = 10 *siah1a*^{+/-}*2*^{-/-} sham
- n = 13 *siah1a*^{+/-}*2*^{-/-} PAB
- n = 15 C57BL/6J sham
- n = 15 C57BL/6J PAB

Im Rahmen des Versuches erfolgte eine echokardiografische Verlaufskontrolle. Die echokardiografischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov vorgenommen. Die Mäuse wurden einen Tag vor Versuchsbeginn (Tag 0, „baseline“-Messung), nach einer Woche (Tag 7), nach 2 Wochen (Tag 14), sowie einen Tag

vor Versuchsende (Tag 21, Endpunktmessung) unter schonender Inhalationsnarkose mit Isofluran untersucht. (Abb. 2.2.3)

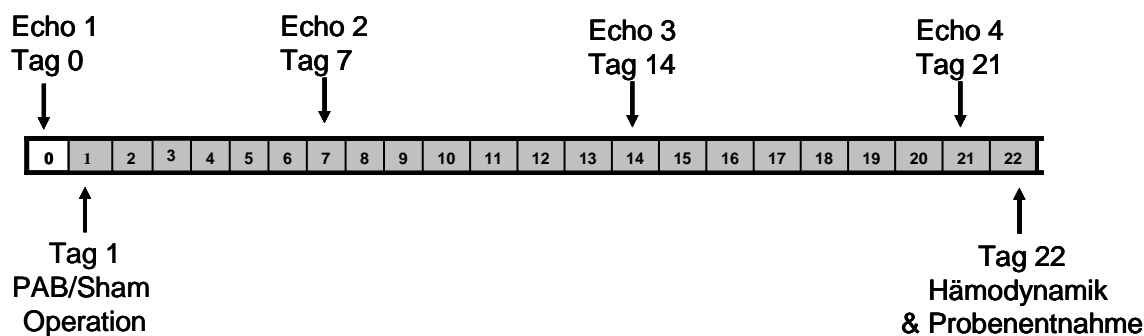


Abbildung 2.2.3: Echokardiografische Verlaufskontrolle im „banding“-Modell.

Am Ende des Versuches (Tag 22) wurden bei $n = 10$ Tieren (bzw. $n = 8$ in der Siah2KO „sham“-Gruppe) hämodynamische Messungen, sowie die Entnahme von Herz und Lunge, durchgeführt. Bei den übrigen Tieren wurde lediglich das Herz entnommen.

2.2.3 Echokardiografie

Die echokardiografische Verlaufskontrolle wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov durchgeführt. Die transthorakale Dopplerechokardiografie ist das führende, nicht-invasive bildgebende Verfahren zur Untersuchung des kardiovaskulären Systems bei Ratten und Mäusen. Zur Durchführung der Ultraschalluntersuchung wurden die Tiere in eine kleine Narkosekammer gelegt und mittels Inhalationsnarkose anästhesiert. Nach einer etwa zweiminütigen Anflutungsphase eines 3% Isofluran/Sauerstoff-Gemisches in der Narkosekammer wurde die Gaszufuhr von 1,5% Isofluran/Sauerstoff für die Zeit der Untersuchung über einen Nasenkonus aufrechterhalten. Die narkotisierte Maus wurde anschließend vorsichtig in Rückenlage verbracht und mit Klebestreifen an den Gliedmaßen auf einer Wärmeplatte mit integrierten Elektrokardiogramm (EKG)-Elektrodenplättchen fixiert. So konnte simultan zur echokardiografischen Untersuchung ein Ein-Kanal-EKG aufgezeichnet werden. Über einen rektal eingeführten Temperaturmessfühler wurde die Temperatur der Wärmeplatte automatisch, abhängig von der Körpertemperatur der Maus, reguliert. Anschließend wurden zur Verbesserung der Bildqualität der Brustkorb sowie der

kraniale Bauchbereich rasiert. Resthaare wurden mit einer Enthaarungscreme vollständig entfernt. Der Brustkorb wurde nun mit luftblasenfreiem, angewärmtem Ultraschallgel dick bedeckt. Das Gel diente als Schallfenster und als Abstandhalter zur optimalen Fokussierung. Die echokardiografischen Untersuchungen wurden mit einem Doppler-Echokardiografiesystem, das mit einem 30 MHz Doppler- und einem 30 MHz 2D- Linearschallkopf ausgestattet war durchgeführt. Nach der Untersuchung wurden die Mäuse von der Fixation befreit, sorgfältig vom Ultraschallgel gesäubert und anschließend für fünf bis zehn Minuten, bis zum vollständigen Erlangen des Bewusstseins und der motorischen Fähigkeiten, beobachtet. Vom Beginn der Isofluranexposition bis zum Ende der Untersuchung vergingen in der Regel 25 bis 35 Minuten.

Die Mäuse des Hypoxiemodells wurden nach einer etwa einstündigen Rekonvaleszenzphase im Anschluss an die echokardiographische Untersuchung wieder in die hypoxischen bzw. normoxischen Kammern verbracht.

Erhobene Parameter:

Cardiac output (CO)

Der cardiac output (CO) wird auch als Herzminutenvolumen bezeichnet und ist das Volumen des Blutes, welches in einer Minute vom Herzen über die *Aorta ascendens* in den Blutkreislauf gepumpt wird. Es errechnet sich aus Schlagvolumen x Herzfrequenz (HF) und wird in Milliliter pro Minute angegeben. Das Schlagvolumen wurde während der Echokardiografie des linksventrikulären Ausflusstraktes bestimmt. Es errechnet sich aus dem Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstraktes (LVOT) und dem Integral der Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Aorta während der Systole, dem sogenannten velocity time integral (VTI): $CO = (LVOT \times VTI) \times HF$. Ein Abfall des Herzminutenvolumens bedeutet eine Verschlechterung der Pumpleistung des Herzens.

Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE)

TAPSE bezeichnet die Distanz, die der Tricuspidalring zwischen Enddiastole und Endsystole zurücklegt und wird in mm gemessen. Sie ist ein Parameter für die longitudinale Funktion des rechten Ventrikels und korreliert mit der rechtsventrikulären Ejektionsfraktion (Schlagvolumen / Enddiastolisches Volumen x 100). Ein Absinken des Wertes der TAPSE zeigt also eine verminderte Kontraktionsbewegung und somit eine Einschränkung der systolischen Funktion des rechten Ventrikels. Dieser Parameter dient als wichtiger

prognostischer Faktor für die Überlebensdauer von Patienten mit einer PH (Howard, 2011; Vonk Noordegraaf and Galie, 2011).

Isovolumic relaxation time (IVRT/RR)

Die IVRT ist die Zeit vom Schluss der Pulmonalklappe bis zum Öffnen der Trikuspidalklappe. Sie ist ein Maß für die Relaxation und somit die diastolische Funktion des rechten Ventrikels. Die IVRT wird auf die Herzfrequenz normalisiert und in Prozent angegeben. RR steht dabei für das Intervall zwischen zwei R-Zacken im EKG und gibt somit die Zeit zwischen zwei Herzschlägen – also die Dauer eines Herzschlages – an. Eine Zeitverzögerung zwischen dem Schließen der Pulmonalklappe und dem Öffnen der Trikuspidalklappe führt zu einem Anstieg des IVRT/RR Wertes und verdeutlicht eine herabgesetzte diastolische Funktion des rechten Ventrikels.

Myocardial performance index (MPI) oder Tei-Index

Der Tei-Index (benannt nach seinem Entwickler C. Tei) ergibt sich aus der Summe der isovolumetrischen Kontraktionszeit und der isovolumetrischen Relaxationszeit, dividiert durch die Ejektionszeit. Diese Werte werden mittels Tissue Doppler Imaging gemessen. Der MPI stellt somit einen Parameter dar, der die globale Funktion (systolisch und diastolisch) des rechten Ventrikels charakterisiert. Ein Anstieg des Tei-Index ist gleichbedeutend mit einer Verschlechterung der globalen Herzfunktion: Die Ejektionszeit sinkt im Verhältnis zur isovolumetrischen Kontraktions- und Relaxationszeit; das Zeitfenster, in dem ein Bluttransport möglich ist, ist also verkürzt. Auch der Tei-Index dient als Prognosekriterium bei Patienten mit einer PH (Howard, 2011; Vonk Noordegraaf and Galie, 2011).

Right ventricular internal diameter (RVID)

Der RVID beschreibt den Innendurchmesser des rechten Ventrikels. Er wurde als die maximale Distanz der freien Wand des rechten Ventrikels zum *Septum* im apikalen Vierkammerblick gemessen und in mm angegeben. Mit seiner Hilfe kann man den Grad der Dilatation der rechten Herzkammer bestimmen.

Right atrial (RA) end diastolic area

Die RA end diastolic area bezeichnet die Querschnittsfläche des rechten *Atrium* am Ende der Diastole in mm^2 . Dieser Parameter dient zur Bestimmung der Dilatation des rechten

Vorhofs und somit als Indikator für eine rechtsventrikuläre Dysfunktion. (Ein Rückstau des Blutes in der rechten Herzkammer und ein resultierender unvollständiger Schluss der Atrioventrikularklappe bedingen eine Dilatation des rechten *Atrium*).

2.2.4 Hämodynamische Messungen

2.2.4.1 Vorbereitungen

Etwa 15 Minuten vor Beginn der hämodynamischen Messungen wurde den Mäusen 1 I.E. Heparin pro g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurden die Druckaufnehmer und Schläuche des Messsystemes sowie die angeschlossenen Katheter mit physiologischer Kochsalzlösung luftblasenfrei gespült und das Programm Pulmodyn W[®] (von HSE) zur Aufzeichnung des systolischen arteriellen Druckes (SAP, systolic arterial pressure) und systolischen rechtsventrikulären Blutdruckes (RVSP, right ventricular systolic pressure) gestartet.

Um die Mäuse zu narkotisieren, erhielten sie eine intraperitoneale Injektion mit 40 µg pro g Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®]) und 0,6 µg pro g Körpergewicht Xylazin (Rompun[®] 2%) in einer Mischspritze. Nach Erreichen einer sicheren Narkosetiefe (erkennbar anhand des Verlustes des Zwischenzehenreflexes) wurden sie innerhalb einer flachen doppelwandigen Kunststoffschale, in der ca. 40°C warmes Wasser zirkulierte in Rückenlage gelagert und auf einer Gummiunterlage fixiert. Um die Atmung der Tiere vor Beginn der maschinellen Beatmung zu erleichtern, wurde die Zunge vorgelagert.

Nun wurde das Fell der Tiere im Halsbereich mit Braunoderm[®] Lösung befeuchtet (um eine Verunreinigung des Operationsfeldes durch Haare zu vermeiden) und ein etwa 1 x 1 cm großes Hautstück per Scherenschlag entfernt. Die *Glandulae mandibulares* wurden vorsichtig nach links und rechts gelagert und die Muskeln über der Trachea stumpf zur Seite präpariert. Es wurde ein Faden (5/0) unterhalb der Trachea durchgeführt und eine Ligatur lose vorgelegt. Die Incision der Trachea erfolgte zwischen zwei Knorpelspangen direkt unterhalb des Larynx. Anschließend wurde der Tubus (aus Vasofix[®] Safety 20 G, gekürzt auf ca. 1,5 cm) eingeführt, die Maus an die Beatmungspumpe angeschlossen und die vorgelegte Ligatur zur Fixation des Tubus zugezogen.

Die Beatmung der Tiere erfolgte mit einer Frequenz von 140 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 10 µl pro g Körpergewicht. Um ein Kollabieren der Alveolen in der maschinellen Expiration zu vermeiden, wurde ein positiv-endexpiratorischer Druck von 1 cm Wassersäule festgelegt.

2.2.4.2 Präparation der linken Arteria carotis

Die linke *A. carotis* wurde von umgebendem Bindegewebe freipräpariert und mittels einer feinen, gebogenen, stumpfen Pinzette vorgelagert. Benachbarte Anteile des *N. vagus* wurden von der *A. carotis* gelöst und vorsichtig zur Seite gezogen. Danach erfolgte ein Unterlegen von zwei Bindfäden. Der craniale Faden wurde ligiert, gespannt und mit einem Durapore[®] Klebestreifen über dem Kopf der Maus fixiert. Mit dem caudalen Bindfaden wurde eine Ligatur lose vorgelegt. Anschließend wurde der arterielle Katheter neben der Arterie positioniert und der Kalibrationswert für den SAP durch Einstellung am Druckwandler auf 0 mmHg gesetzt.

Die *A. carotis* wurde vor dem Brusteingang mit einem Arterienclip abgeklemmt und inzidiert. Danach wurde der Katheter etwa 2-3 mm in die *A. carotis* eingeführt und die lose vorgelegte Ligatur des caudalen Bindfadens fixiert. Der Arterienclip wurde entfernt und der SAP aufgezeichnet.

2.2.4.3 Präparation der rechten Vena jugularis

Die rechte *V. jugularis* wurde von umgebendem Bindegewebe befreit und es wurden zwei Fäden untergelegt, mit denen wie bei der Arterie beschrieben verfahren wurde. Danach wurde der venöse Katheter neben der *V. jugularis* positioniert und der Ausgangswert für den RVSP durch Kalibration am Druckwandler auf 0 mmHg gesetzt. Es folgte die Incision der *V. jugularis* zwischen den beiden Bindfäden und das Einführen des Katheters. Nachdem der Katheter ca. 5 mm in die Vene geschoben worden war, wurde schnell die vorgelegte Ligatur zugezogen, um eine Blutung zu vermeiden. Anschließend wurde der Katheter bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben und der RVSP aufgezeichnet. Der systolische rechtsventrikuläre Druck entspricht bei intakter Pulmonalklappe dem systolischen pulmonalarteriellen Druck (Rosenkranz et al., 2011).

2.2.4.4 Messung des systolischen arteriellen und systolischen rechtsventrikulären Druckes

Die gemessenen Drücke (SAP und RVSP) wurden als analoge Signale durch die flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmer registriert, verstärkt, mit einer Wandlerkarte im Computer in digitale Signale umgewandelt und durch das Programm Labtech Pro[®] aufgezeichnet. Die Dauer der Messung betrug 10 bis 15 Minuten. Zur Auswertung wurden die systolischen Drücke verwendet.

2.2.5 Hämatokritwert

Die Messung des Hämatokritwertes wurde bei allen Mäusen des Hypoxie-induzierten PH-Modells zur Kontrolle der hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Am Ende der hämodynamischen Messungen wurde der rechtsventrikuläre Katheter entfernt und aus der *V. jugularis* austretendes Blut mit einer Kapillare zur Messung des Hämatokritwertes aufgefangen. Diese wurde mit Knete aus einem Hämatokritversiegelungskit verschlossen, in eine Zentrifuge verbracht und bei 13.000 rpm für 4 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Hämatokritwert wurde auf der Hämatokritskala des Zentrifugendeckels abgelesen.

2.2.6 Entnahme der Lunge

Nach Befeuchtung von Thorax und Abdomen mit Braunoderm[®] wurde ein medianer Hautschnitt vom *Umbilicus* bis zur Höhe des *Manubrium sterni* geführt. Folgend wurde der *Processus xiphoideus* mit einer Pinzette erfasst, angehoben, die Haut nach lateral, direkt unterhalb des Rippenbogens, zu beiden Seiten mit einer Schere incisiert und so das Abdomen eröffnet. Das *Diaphragma* wurde mit einer Federschere gelöst und die Thoraxhöhle dargestellt. Anschließend wurde das *Sternum* bis zur *Apertura thoracis cranialis* in der Medianen durchtrennt. Die Rippenbögen wurden auseinandergespreizt und mit gebogenen 24G Kanülen seitlich fixiert.

Ein Bindfaden wurde unter der *A. pulmonalis* und Aorta durchgeführt und eine Ligatur lose vorgelegt. Anschließend erfolgte eine kleine Incision in den rechten Ventrikel, durch die eine Spülkanüle in die *A. pulmonalis* eingeführt wurde. Die Ligatur wurde zugezogen und der linke Ventrikel zum Abfluss der Spüllösung eröffnet. Die Lunge wurde anschließend über die *A. pulmonalis* mit isotoner Kochsalzlösung bei einem Druck von 22 cm Wassersäule blutfrei gespült. Während des Spülvorganges wurde der Tubus aus der Trachea entfernt und eine 20G Braunüle ohne Mandrin eingeführt. Über diese Braunüle wurde isotonische Kochsalzlösung eingeleitet, um einen Gegendruck von 10 cm Wassersäule zu erzeugen und so das Kollabieren der Alveolen zu verhindern.

Nach Beenden des Spülvorganges und Entfernen der Spülvorrichtungen wurde der linke Lungenflügel entnommen, für histologische Untersuchungen in Einbettkassetten gelegt und einen Tag bei Raumtemperatur in Formalin gelagert. Der rechte Lungenflügel wurde in seine einzelnen *Lobi* geteilt und zusammen mit dem Herzlappen für molekularbiologische

Analysen zunächst in flüssigen Stickstoff (-196°C) verbracht und später bei -80°C aufbewahrt.

Am 2. Tag wurde die fixierte linke Lungenhälfte in 0,1 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) bei 4°C umgelagert. Am 3. Tag wurde sie in 50% Ethanol und am 4. Tag in 70% Ethanol überführt und so bis zur weiteren Verwendung für die histologischen Untersuchungen bei 4°C aufbewahrt.

2.2.7 Präparation des Herzens

Das Herz wurde aus dem Tierkörper entnommen und umgebendes Bindegewebe, Gefäßstämme sowie die Atrien abgetrennt. Anschließend erfolgte eine Teilung in rechten Ventrikel, linken Ventrikel und *Septum* sowie das Auswiegen dieser Anteile und des rechten *Atrium*. Die eine Hälfte der Herzen wurde in flüssigen Stickstoff (-196°C) verbracht und später bei -80°C für molekularbiologische Untersuchungen aufbewahrt. Die andere Hälfte der Herzen wurde für histologische Untersuchungen in Einbettkassetten gelegt und für einen Tag bei Raumtemperatur in Formalin gelagert. Am 2. Tag wurden die fixierten Herzanteile in 0,1 M PBS bei 4°C umgelagert. Am 3. Tag wurden sie in 50% Ethanol und am 4. Tag in 70% Ethanol überführt und so bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Aus den Gewichten der Herzanteile wurden verschiedene Verhältnisse (Quotienten) zur Bestimmung des Grades der Rechtsherzhypertrophie gebildet:

- Rechter Ventrikel (mg) zu linkem Ventrikel plus *Septum* (mg)
- Rechter Ventrikel (mg) zu Körpergewicht (g)
- Rechter Ventrikel (mg) zu Länge der *Tibia* (mm)
- Rechtes *Atrium* (mg) zu Körpergewicht (g)

Jeweils drei bis fünf Mäuse pro Gruppe wurden nach Eröffnung des Thorax durch intrakardiale Verabreichung von Kaliumchlorid euthanasiert, damit das Herz in Asystolie verharnte, und die Kardiomyozyten relaxiert (in runder Form) fixiert werden konnten (Diercks et al., 2004; Schmidt et al., 2000; Vassalle et al., 1964). Die Herzen dieser Tiere wurden entnommen, horizontal geteilt, in Formalin verbracht und anschließend wie oben beschrieben weiter für die histologischen Untersuchungen verarbeitet.

2.2.8 Entnahme der *Tibia*

Nach der Entnahme von Lunge und Herz wurde ein Hinterbein im *Articulatio genus* abgesetzt und der Fuß im *Articulatio talocruralis* entfernt. Die Unterschenkelmuskeln wurden lospräpariert und die Menisken entfernt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Tibialänge mit einem digitalen Messschieber. Die ermittelten Messwerte wurden zur Bildung der unter 2.2.7 beschriebenen Ratios verwendet. Die Ratio von rechtem Ventrikel zu Tibialänge ermöglicht es, Aussagen die unabhängig von unterschiedlichen Körpergewichtszunahmen aufgrund der Anwendung verschiedener Mausmodelle sind, zu treffen.

2.2.9 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

2.2.9.1 Einbettung und Schneiden des Gewebes

Die in 70% Ethanol gelagerten linken Lungenhälften und rechten Ventrikel wurden über Nacht im Routineprogramm des geschlossenen Vakuumgewebeeinfiltrationsautomaten (Leica) entwässert. Anschließend wurden sie mit Hilfe der Paraffinausgussstation in Paraffin eingegossen und auf einer integrierten Kühlplatte heruntergekühlt, bis die Wachsböcke aus ihren Formen entnommen werden konnten.

Für die im Folgenden beschriebenen histologischen Untersuchungsmethoden wurden jeweils 3 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und zum Trocknen auf eine Heizplatte verbracht. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Schnitte bei 37°C im Wärmeschrank gelagert.

2.2.9.2 Histologische Untersuchung der Lungen

Zur morphometrischen Analyse der Lungengefäße wurde ein computergestütztes Analysesystem (Leica Q Win Standard Analyzing Software) verwendet. Die Makros für die Gefäßmorphometrie wurden von der Firma Leica entwickelt. Die Schnitte wurden geblindet ausgezählt.

2.2.9.2.1 Muskularisierungsgrad

2.2.9.2.1.1 Protokoll der Anti-alpha Aktin/von Willebrand Faktor-Immunhistochemie

Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte		
60 Minuten	Inkubieren bei 58°C	
3 x 10 Minuten	Xylol	
2 x 5 Minuten	Ethanol absolut 99,6%	
5 Minuten	Ethanol 96%	
5 Minuten	Ethanol 70%	
Immunhistochemische Markierung der Gewebeschnitte		
15 Minuten	Block endogener Peroxidasen	20 ml 30% H ₂ O ₂ in 180 ml Methanol
2x5 Minuten	Waschen	<i>Aqua dest.</i>
2x5 Minuten	Waschen	PBS
15 Minuten	proteolytische Demaskierung	Trypsin Digest All [®] 1:3
3x5 Minuten	Waschen	PBS
15 Minuten	Block endogenen Avidins	Streptavidin-Reagenz
5 Minuten	Waschen	PBS
15 Minuten	Block endogenen Biotins	Biotin-Reagenz
5 Minuten	Waschen	PBS
20 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungen	10% BSA
3x5 Minuten	Waschen	PBS
60 Minuten	Mouse IG-Blocking-Reagenz	M.O.M. Kit (1)
3x5 Minuten	Waschen	PBS
5 Minuten	Proteinblocking	M.O.M. Kit (2)
30 Minuten	Primärantikörper anti-alpha smooth muscle actin	Verdünnung 1:900 mit 10% BSA
4x5 Minuten	Waschen	PBS
10 Minuten	biotinylierter Sekundärantikörper	M.O.M. Kit (3)
4x5 Minuten	Waschen	PBS
30 Minuten	RTU Horseradish Peroxidase Streptavidin	
3x5 Minuten	Waschen	PBS
ca. 3-4 Minuten	violettes Chromogen	Vector VIP [®] Substrat Kit
5 Minuten	Waschen	Leitungswasser
2x5 Minuten	Waschen	PBS
20 Minuten	Block unspezifischer Bindungen	10% BSA
3x5 Minuten	Waschen	PBS

20 Minuten	Serumblock	ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig
30 Minuten	Primärantikörper Anti-von Willebrand Faktor	Verdünnung 1:900 mit 10%BSA
4x5 Minuten	Waschen	PBS
30 Minuten	Biotinylierter Sekundärantikörper	ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig
4x5 Minuten	Waschen	PBS
20-40 Sekunden	Braunes Chromogen	DAB Substrat Kit
5 Minuten	Waschen	Leitungswasser
3 Minuten	Darstellung der Zellkerne	Methylgrün
Dehydrieren der Gewebeschnitte		
1 Minute	<i>Aqua dest.</i>	
2 x 2 Minuten	Ethanol 96%	
2 x 5 Minuten	Isopropylalkohol	
3 x 5 Minuten	Xylol	
Eindecken mit Pertex®		

Herstellung einer 10-fach konzentrierten phosphatgepufferten Salzlösung (PBS)

- 80 g Natriumchlorid (NaCl)
- 2,0 g Kaliumchlorid (KCl)
- 11,5 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)
- 2,0 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)

gelöst in 900 ml *Aqua dest.*

Die 10-fache Lösung wurde als Einmalpuffer verdünnt und der pH auf 7,4 eingestellt.

2.2.9.2.1.2 Morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades

Zur Analyse des Muskularisierungsgrades wurden die Paraffinschnitte mit einer immun-histochemischen Doppelfärbung gegen smooth muscle alpha actin und von Willebrand Faktor wie im Protokoll aufgeführt markiert. Muskularisierte Anteile der Gefäßwand wurden durch Anti-alpha smooth muscle actin violett angefärbt, während nicht-muskularisierte Gefäßwandbereiche durch Anti-von Willebrand Faktor braun dargestellt wurden (Abb. 2.2.5).

Um den Muskularisierungsgrad zu bestimmen wurden die Gefäße manuell markiert und danach automatisch der Innenraum detektiert (Abb 2.2.4a, b). Nach Bestätigung des Lumens (Abb. 2.2.4c) markierte der Computer die Gefäßwand und ermittelte den Anteil der

muskularisierten (violetten) Wandbereiche (Abb. 2.2.4d, e) durch eine kolorimetrisch-spektrometrische Messung.

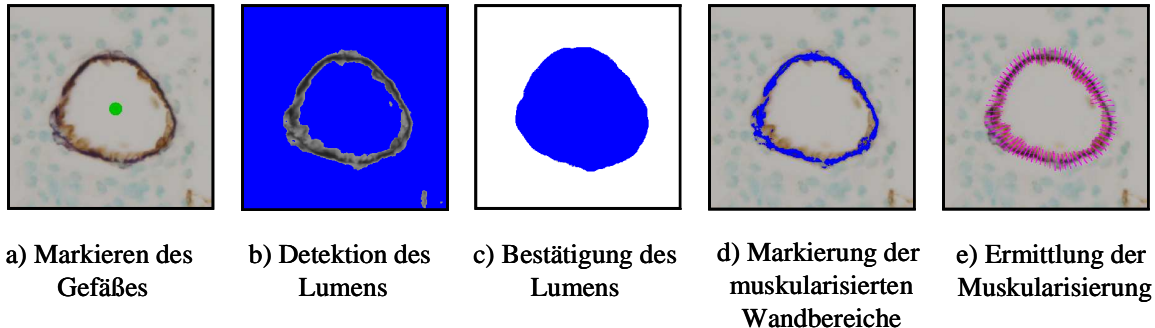


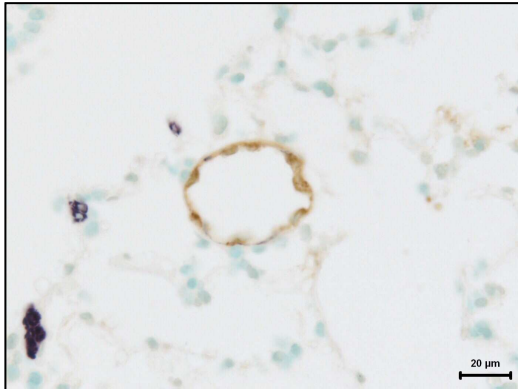
Abbildung 2.2.4 a) - e): Bestimmung des Muskularisierungsgrades

Bei 400-facher Vergrößerung wurden pro Tier 85 kleine Gefäße (Gefäßaußendurchmesser 20-70 μm), 10 mittlere Gefäße (Gefäßaußendurchmesser >70-150 μm) und 5 große Gefäße (Gefäßaußendurchmesser >150 μm) untersucht und als voll, partiell oder nicht muskularisiert kategorisiert. Die Einteilung in diese Kategorien erfolgte durch die Bestimmung des prozentualen Anteiles der für alpha smooth muscle actin immunhistochemisch markierten Gefäßmuskelschicht am Gesamtumfang des Gefäßes. (Ein zu 100% muskularisiertes Gefäß bedeutet also eine vollständig geschlossene Schicht aus alpha smooth muscle actin positiven bzw. immunmarkierten Zellen.)

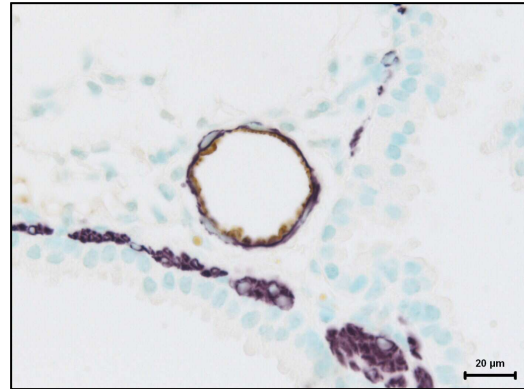
Die Grenzen zwischen den einzelnen Kategorien wurden wie folgt festgelegt:

- nicht muskularisiert: $\leq 5\%$ Anteil von alpha smooth muscle actin positiven Bereichen der Gefäßmedia
- partiell muskularisiert: $\leq 75\%$ Anteil von alpha smooth muscle actin positiven Bereichen der Gefäßmedia
- voll muskularisiert: $> 75\%$ Anteil von alpha smooth muscle actin positiven Bereichen der Gefäßmedia

Die errechneten Werte wurden nach Auswertung jedes einzelnen Gefäßes automatisch in Excel (Microsoft Corporation, USA) überführt und in die oben genannten Gefäßkategorien übertragen.



a) normoxisches nicht-muskularisiertes Gefäß
(braune Wandareale)



b) hypoxisches voll-muskularisiertes Gefäß
(violette Wandareale)

Abbildung 2.2.5: Beispiel für ein mit Anti-alpha Aktin/von Willebrand Faktor immunhistochemisch markiertes Lungengefäß einer a) Normoxie- und einer b) Hypoxie-exponierten Maus. (630-fache Vergrößerung).

2.2.9.2.2 Wandstärke

2.2.9.2.2.1 Färbeprotokoll der *Elastica* van Gieson-Färbung

(Färbung mit Resorcin-Fuchsin, Weigert A / B, van Gieson-Lösung)

Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte wie in 2.2.9.2.1.1	
10-24 Stunden	Resorcin-Fuchsin-Lösung
15 Minuten	Leitungswasser (fließend)
abspülen	<i>Aqua dest.</i>
5 Minuten	Eisen-Hämatoxylin nach Weigert A und B / 1 : 1
abspülen	<i>Aqua dest.</i>
15 Minuten	Leitungswasser (fließend)
abspülen	<i>Aqua dest.</i>
10 Minuten	van Gieson-Lösung
abspülen (kurz!)	Leitungswasser
Dehydrieren und Eindecken mit Pertex[®] wie in 2.2.9.2.1.1	

Die Resorcin-Fuchsin-Lösung wurde nach folgender Anleitung zubereitet:

- 10 ml Weigerts Resorcin-Fuchsin
- + 200 ml 1%iger HCl-Alkohol (7,2 ml HCl + 193,0 ml 70% Ethanol)

Die van Gieson-Lösung wurde nach folgender Rezeptur hergestellt:

- 240 ml gesättigte Pikrinsäure (nach Filtration)
- + 8 ml 2% Säurefuchsin
- + 4 ml 1% Essigsäure

2.2.9.2.2.1 Morphometrische Analyse der Wandstärke

Zur Bestimmung der mittleren Wandstärke wurden die Paraffinschnitte wie oben beschrieben mit der *Elastica* van Gieson Färbung gefärbt. Elastische Fasern werden durch die Resorcin-Fuchsin-Lösung schwarzviolett gefärbt, Eisenhämatoxilin lässt die Zellkerne schwarzbraun erscheinen und die van Giesson Lösung verleiht kollagenen Fasern eine rote und Muskulatur sowie Zytoplasma eine gelb-braune Farbe (Abb. 2.2.7).

Bei 630-facher Vergrößerung wurden pro Tier 85 kleine Gefäße (Gefäßaußendurchmesser 20-70 μm), 10 mittlere Gefäße (Gefäßaußendurchmesser >70-150 μm) und 5 große Gefäße (Gefäßaußendurchmesser >150 μm) computergestützt vermessen. Dazu wurden die Gefäße manuell markiert und danach automatisch der Innenraum detektiert. (Abb. 2.2.6a, b) Nach manueller Bestätigung des Lumens (Abb. 2.2.6c), wurden fünf bis acht Linien von der schwarz-violetten *Lamina elastica externa* in das Gefäßinnere gezogen (Abb.2.2.6d). Das Computerprogramm schnitt die Linien nach Überschreiten der *Lamina elastica interna* ab und vermaß anschließend die markierte Strecke (Abb.2.2.6e).

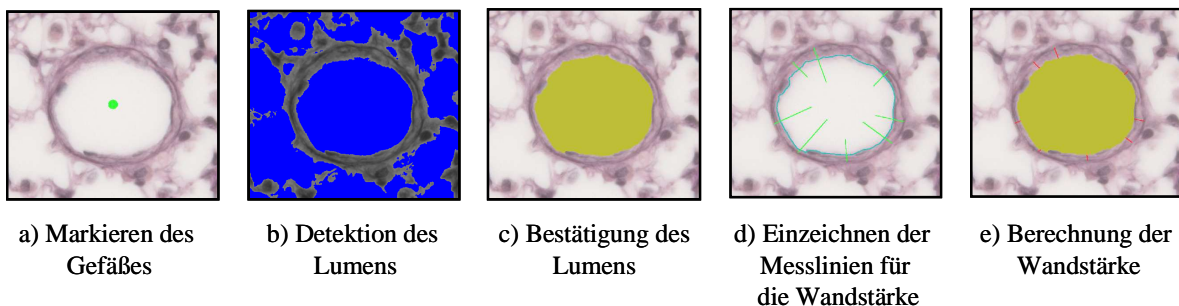
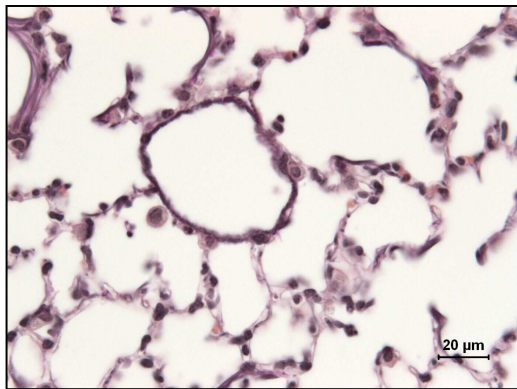


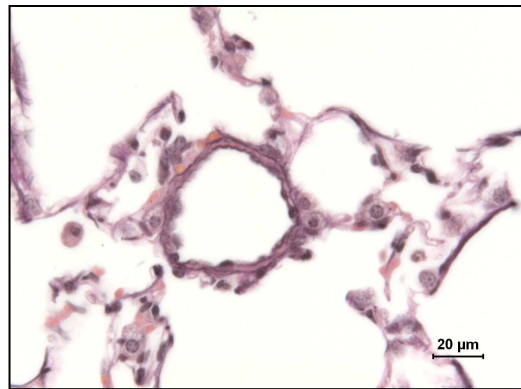
Abbildung 2.2.6 a) - e): Bestimmung der Wandstärke.

Die Mediadicke wurde definiert als der mittlere Abstand zwischen *Lamina elastica interna* und *Lamina elastica externa*. Die mittlere Wandstärke wurde als Prozentsatz des größten externen Querdurchmessers des Gefäßes angegeben und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Mittlere Wandstärke (\%)} = \frac{2 \times \text{Mediadicke}}{\text{externer Gefäßdurchmesser}} \times 100$$



a) normoxisches Gefäß mit fein gezeichneter Gefäßwand



b) hypoxisches Gefäß mit verdickter Gefäßwand

Abbildung 2.2.7: Beispiel für ein mit *Elastica* van Gieson gefärbtes Lungengefäß einer a) Normoxie- und einer b) Hypoxie-exponierten Maus. (630-fache Vergrößerung)

2.2.9.3 Histologische Untersuchung des rechten Ventrikels

2.2.9.3.1 Kollagenanteil

2.2.9.3.1.1 Färbeprotokoll der Sirius Red Färbung

Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte wie in 2.2.9.2.1.1	
60 Minuten	0,1% Picro Sirius Red Lösung (lichtgeschützt)
3 x 2 Minuten	1% Essigsäure (waschen)
abspülen	<i>Aqua dest.</i>
Dehydrieren und Eindecken mit Pertex[®] wie in 2.2.9.2.1.1	

Zur Zubereitung der Picro Sirius-Red Lösung wurde 0,2 g Sirius Red in 200 ml Pikrinsäure gelöst und die entstandene Lösung durch ein Filterpapier gegossen, um Festbestandteile zu entfernen. Anschließend wurde der pH-Wert auf 2,0 eingestellt.

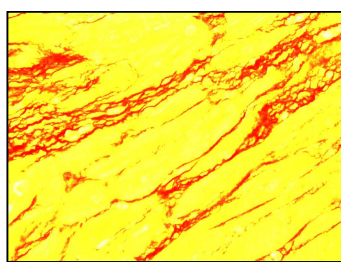
2.2.9.3.1.2 Analyse des Kollagenanteils

Der prozentuale Anteil an kollagenen Fasern in den rechten Ventrikeln wurde computergestützt, mit Hilfe des Analysesystems Leica Q Win Standard Analyzing Software, mit von der Firma Leica entwickelten Makros ermittelt. Die Schnitte wurden geblindet ausgezählt.

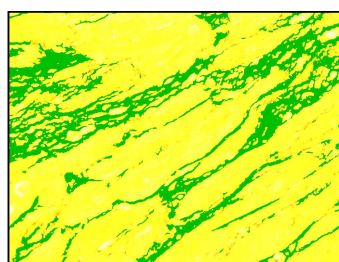
Die Längsschnitte der rechten Ventrikel wurden mit Sirius Red (wie im Färbeprotokoll aufgeführt) gefärbt. Dieser Farbstoff bindet an Kollagenfasern und färbt sie rot. Das umgebende, nicht kollagenhaltige, Gewebe wird gelb dargestellt.

Die Schnitte wurden bei 630-facher Vergrößerung mäanderförmig ausgezählt. Hierbei wurde jedes zweite Bild in jeder zweiten Reihe analysiert, so dass pro rechten Ventrikel größenabhängig 40-90 Bilder entstanden (Abb. 2.2.8).

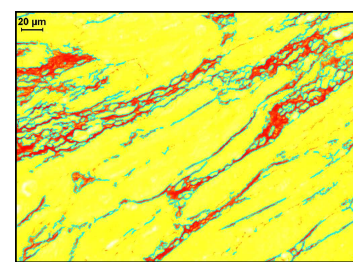
Der prozentuale Kollagenanteil pro Fläche wurde in jedem Bild computergestützt bestimmt und direkt in Excel (Microsoft Corporation, USA) übertragen. Es wurde nur der Anteil des interstitiellen Kollagens ermittelt. Angefärbte Gefäße konnten (in Schritt 2.2.8 b)) markiert und aus der Messung ausgeschlossen werden. Der Gesamtkollagengehalt des rechten Ventrikels wurde als Mittelwert aller Einzelbilder errechnet.



a) unbearbeitetes Bild



b) Kollagendetektion mit
Möglichkeit zur manuellen
Bearbeitung



c) gemessenes Kollagen

Abbildung 2.2.8 a)- c): Bestimmung des rechtsventrikulären Kollagenanteiles

2.2.9.3.2 Ratio Kapillaren zu Kardiomyozyten

2.2.9.3.2.1 Färbeprotokoll der Wheat germ agglutinin / Isolectin B4- Histochemie

Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte wie in 2.2.9.2.1.1	
2x5 Minuten	TBS (waschen)
30 Minuten	Proteinase K Verdauung
3x5 Minuten	TBS (waschen)
2 Minuten	BSA 10% (blocken)
4x5 Minuten	TBS (waschen)
über Nacht	WGA-FITC (1:150) IB4-TRITC (1:150) in TBS DAPI (1:200)
6x20 Minuten	TBS (waschen)
1 Minute	<i>Aqua dest.</i>
7 Minuten	In den Wärmeschrank bei 37°C zum Trocknen
Eindecken mit Dako Mounting Medium	

Nach Zugabe von WGA-FITC, IB4-TRITC und DAPI erfolgten alle weiteren Schritte im Dunkeln.

Herstellung der 20-fach konzentrierten Tris-gepufferten Salzlösung
(tris-buffered saline, TBS)

- 122 g Trizma Base
- 180 g NaCl
- mit *Aqua dest.* auf 1000 ml auffüllen

Die 20-fache Lösung wurde als Einmalpuffer verdünnt und der pH-Wert auf 8,4 eingestellt.

2.2.9.3.2.2 Analyse der Anzahl der Kardiomyozyten und Kapillaren

Zum Auszählen der Anzahl der Kardiomyozyten und Kapillaren wurden Horizontalschnitte durch das Herz verwendet. Pro rechtem Ventrikel wurden in einem Abstand von je 20 μm drei Schnitte gefertigt und mit der oben beschriebenen Lectin-Histochemie markiert. Diese basiert darauf, dass Fluoreszenzfarbstoffe an meist pflanzliche Proteine, die hochspezifisch an Zuckerreste binden, sogenannte Lectine, gekoppelt werden. Wheat germ agglutinin (WGA) ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein Isothiocyanat (FITC) konjugiert und bindet an N-Acetyl-D-Glucosamin Reste. Es lässt die Zellwände der Kardiomyozyten bei 488 nm Anregungswellenlänge grün leuchten. Das Isolectin B4 (IB4) aus der afrikanischen Staude *Griffonia simplicifolia* ist mit Tetramethylrhodamin-5(-6)-Isothiocyanat (TRITC) gelabelt und bindet an α -Galactosyl-Reste. Es lagert sich an Endothelzellen an und lässt Kapillaren bei einer Anregungswellenlänge von 594 nm rot erscheinen. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI), das als interkalierendes Agens an DNA bindet, angefärbt. Sie erschienen bei ultraviolettem Licht blau.

Von jedem Schnitt wurden bei 630-facher Vergrößerung mit der Leica Q Win Standard Analyzing Software 9-15 Bilder fotografiert. Diese wurden anschließend mit Hilfe des „Stepanizer[®] Stereology Tool“, einer im Internet frei erhältlichen Software (<http://www.stepanizer.com>), ausgewertet. Die am Mikroskop fotografierten Bilder wurden dazu in das Programm importiert und nach dem Skalieren der Reihenfolge nach analysiert. Zuerst wurden die Kardiomyozyten in jedem Bild markiert und gezählt (Abb. 2.2.9c, d). Die Anzahl wurde automatisch in eine Exceldatei exportiert und für alle Bilder addiert. Anschließend wurde die Zahl der Kapillaren in der gleichen Weise bestimmt (Abb. 2.2.9a, b). Die Anzahl der Kardiomyozyten bzw. Kapillaren aus allen drei Schnitten wurden addiert und der Quotient aus der Gesamtkapillarenanzahl geteilt durch die Gesamtkardiomyozytenanzahl für jeden rechten Ventrikel ermittelt.

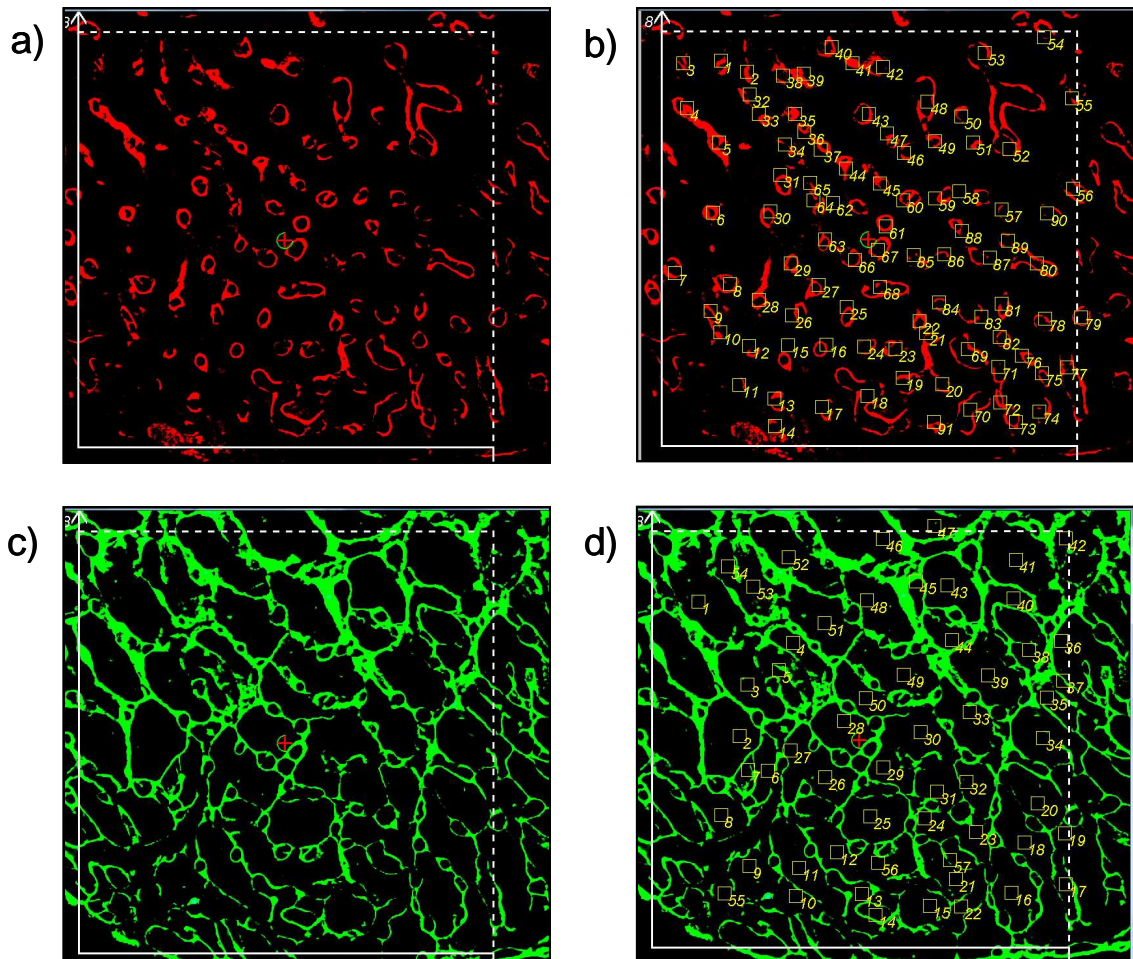


Abbildung 2.2.9: Bestimmung der Anzahl der Kapillaren und Kardiomyozyten

a) Kapillaren, b) gezählte Kapillaren, c) Kardiomyozyten, d) gezählte Kardiomyozyten
 Das Areal innerhalb des weißen Koordinatensystemes wurde ausgewertet. Kapillaren und Kardiomyozyten, welche die durchgezogene Linie berührten, wurden dabei nicht erfasst, während diejenigen, die an der gestrichelten Linie lagen, mit ausgezählt wurden (630-fache Vergrößerung).

2.2.10 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.10.1 RNA-Isolation, Reinheitsbestimmung und c-DNA-Synthese

Die Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus Gewebehomogenat der linken Lungen und rechten Ventrikel wurde mit Hilfe des peqGOLD total RNA Kits durchgeführt. Das Gewebe wurde direkt aus der Kühlung bei -80°C in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Verarbeitung darin aufbewahrt. Für die RNA-Gewinnung wurde ein Drittel der rechten Lungen und die Hälfte der rechten Ventrikel verwendet. Das Gewebe wurde direkt nach Entnahme aus dem Stickstoff in 2 ml Schraubverschluss-Gefäße mit 400 µl RLT-Lysepuffer (peqGOLD total RNA Kit) und ca. 20 Keramikkügelchen (Ø 1,4 mm) gegeben und für 2 x 30 Sekunden im Homogenisator aufbereitet. Anschließend wurde die entstandene Gewebesuspension für 10 Minuten bei 10.000 rpm in einer Mikrozentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet mit den Zelltrümmern wurde verworfen und der Überstand mit der gelösten RNA weiter, nach Protokoll, verwendet. Zusätzlich wurde ein Desoxyribonuklease (DNase) Verdau nach Anleitung durchgeführt.

Im Anschluss an die Isolierung wurde die Konzentration der RNA spektrophotometrisch mittels NanoDrop bestimmt. Weiterhin erfolgte automatisch eine Bestimmung der Reinheit. Dazu wurde die Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen und ein Quotient aus den ermittelten Werten gebildet. Das Absorptionsmaximum von reinen Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, während Phenolreste und Proteine, die eine Kontamination darstellen, ein Absorptionsmaximum bei 280 nm zeigen. Bei reinen Isolaten liegt der Quotient von 260/280 zwischen 1,8 und 2,0, bei Kontamination ist er geringer.

Die Herstellung von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) erfolgte durch reverse Transkription mit Hilfe des iScript cDNA-Synthese Kits. Es wurden jeweils 500 ng RNA eingesetzt. Die nach Protokoll pipettierte Ansätze wurden in einen Thermocycler verbracht und unter folgenden Bedingungen umgeschrieben:

- 1 Zyklus bei 25°C für 5 Minuten
- 1 Zyklus bei 42° für 30 Minuten
- 1 Zyklus bei 85°C für 5 Minuten

Die entstandene DNA wurde für real-time Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) eingesetzt.

2.2.10.2 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktionen

Genexpressionsanalysen der Hypoxie- und „banding“-Tiere, sowie ihrer Kontrollgruppen wurden mittels real-time (RT) PCR durchgeführt. Dabei werden die Nukleinsäuren, wie bei einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, vervielfältigt und die gewonnene DNA durch Fluoreszenz-Messungen quantifiziert. Die Fluoreszenz entsteht durch Interkalation des verwendeten Farbstoffes, SYBR[®] Green I in die doppelsträngige DNA und nimmt folglich proportional zur Menge der PCR-Produkte zu.

Zur Überprüfung der Reaktion auf Spezifität, Verunreinigungen und Primer-Dimere wurde am Ende jedes PCR-Laufs eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde die doppelsträngige DNA, durch kontinuierliche Temperaturerhöhung von 55°C bis 95°C aufgeschmolzen und der SYBR[®] Green I Farbstoff wieder frei gesetzt. Spezifische PCR-Produkte haben eine größere Fragmentlänge und somit eine höhere Schmelztemperatur als unspezifische Produkte oder Primer-Dimere, was eine Differenzierung ermöglicht.

Die Durchführung der RT-PCR erfolgte mit dem Mx3000P[®] QPCR System. Für die Reaktion wurde der iTaq[™] SYBR[®] Green Supermix with Rox nach Protokoll des Herstellers verwendet:

- 12,5 µl SYBR Green Supermix
- 0,5 µl Vorwärts-Primer
- 0,5 µl Rückwärts-Primer
- 2,0 µl DNA (Template)
- 9,5 µl steriles *Aqua dest.*

Die aus den Lungen gewonnene DNA wurde vor ihrem Einsatz in einem Verhältnis von 1:3 und die DNA der rechten Ventrikel von 1:2 mit sterilem *Aqua dest.* verdünnt. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde in jedem Lauf eine non-template Kontrolle (als Negativkontrolle) für jeden Mastermix mitgeführt.

Programm des RT-PCR-Laufes

	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	<u>Zyklen</u>
Enzymaktivierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	10 sec	} 40 x
Annealing	59°C	10 sec	
Elongation	72°C	10 sec	
Denaturierung	95°C	1 min	
Schmelzkurve	55°C - 95°C		
Abkühlen	25°C	∞	

Die „cycle threshold“ Werte (ct-Werte) der Lungenproben wurden zum Referenz-Gen Beta2-Mikroglobulin (B2M) und die ct-Werte der rechten Ventrikel zum Referenz-Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) normalisiert. Diese Referenz-Gene wurden ausgewählt, da sie in den verwendeten Tiermodellen nicht reguliert werden.

Die Auswertung der RT-PCR erfolgte nach der Δ ct-Methode mit folgender Formel:

$$ct(\text{Referenzgen}) - ct(\text{untersuchtes Gen}) = \Delta ct$$

Der ct-Wert beschreibt dabei den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

2.2.10.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Überprüfen der Primer (auf Größe der detektierten Produkte, Verunreinigungen, Primerdimere etc.) wurden die PCR-Produkte nach der real-time PCR in einem Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt.

Dazu wurden 1,6% Gele aus Agarose und 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer: Tris-Acetat 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) hergestellt. Nach kurzem Aufkochenlassen in der Mikrowelle, anschließendem Abkühlen auf 50-60°C und Versetzen mit 3 µl SYBR safe DNA gel stain wurden die Gele in einem abgedichteten Gelschlitten ausgegossen. SYBR safe ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich als Interkalator in die große bzw. kleine Furche der DNA-Doppelhelix legt und diese dadurch im UV-Bereich sichtbar macht. Nach dem Erstarren des Geles wurden jeweils 12 µl Probe mit 2 µl 6x loading dye (Fermentas) vermischt und in jede Tasche pipettiert. Zusätzlich wurde ein DNA-Standard (GeneRuler™ 100 bp Ladder) aufgetragen. Die Produkte wurden bei 120 Volt in einer

Elektrophoresekammer mit TAE-Laufpuffer aufgetrennt und nach dem Lauf unter UV-Licht bei 320 nm mit dem Bio imaging System „ChemiGenius“ fotografiert.

2.2.10.4 Proteinisolierung

Für die Isolierung der Proteine wurde ein weiteres Drittel der rechten Lungen und die zweite Hälfte der rechten Ventrikel verwendet. Das Gewebe wurde direkt aus der Kühlung bei -80°C in flüssigen Stickstoff überführt und nach Entnahme daraus in 2 ml Schraubverschluss-Gefäße mit 150 µl kalten Lysepuffer und ca. 20 Keramikkügelchen gegeben, und für 2 x 30 Sekunden im Homogenisator aufbereitet.

Rezept des Lysepuffers:

- 1000 µl Ripa- Puffer
(für 100ml: 99ml 1x PBS, 1ml Igepal NP40, 0,5 g Natriumdeoxycholat, 100 µl 10% SDS)
- 40 µl Complete
- 5 µl Na-Orthovanadat (200 mM)
- 1 µl PMSF (100 mM)

Anschließend wurden die Proben 5 Minuten lang bei 10.000 rpm zentrifugiert, 15 Minuten auf Eis ruhen gelassen und der Überstand in Eppendorf Tubes überführt. Vor Lagerung bei -20°C wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.10.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit dem DC protein assay, nach dem Prinzip des Lowry-Assays. Die Proben wurden vor der Konzentrationsmessung 1:20 mit Ripa-Puffer verdünnt. Als Referenz wurde eine Standardreihe (von 0,2 mg/ml bis 1,6 mg/ml) aus boviner Serumalbumin (BSA) -Lösung hergestellt und als Leerwert purer Ripa-Puffer verwendet. Fünf µl des Leerwertes, der Standards und der Proteinproben wurden als Doppelansätze in 96-well Mikroplatten pipettiert. Anschließend wurde 25 µl Reagenz A' (= 1 ml Reagenz A mit 20 µl Reagenz S) und 200 µl Reagenz B in jedes Well gegeben. Die fertig pipettierte Platte wurde in das Mikroplattenlesegerät Elx808 gestellt, das die Proben unter Schütteln gut durchmischte, anschließend die Absorption bei 750 nm maß und die Standardkurve sowie die Proteinkonzentration mittels einer Software berechnete.

2.2.10.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in einem Gel, an das ein elektisches Feld angelegt wird, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS, engl. sodium dodecyl sulfate) in den Gelen denaturiert die Proteine und lagert sich in einem konstanten Gewichtsverhältnis an diese an. Die Komplexe wandern aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Das Gel wurde aus zwei Anteilen gefertigt. Den oberen Part bildete das Sammelgel (5%) mit den Taschen für die Proteinansätze. Der untere Teil bestand aus dem Trenngel (15%) in dem die Proteine nach Anlegen des elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt wurden.

Zusammensetzung der Gele:

	Sammelgel	Trenngel
Gelkonzentration	5%	15%
<i>Aqua dest.</i>	5,7 ml	2,4 ml
30% Acrylamid/Bis.	1,7 ml	5,0 ml
Tris-Puffer*	2,5 ml	2,5 ml
10% w/v SDS	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

*Tris-Puffer:

Trenngel: 1,5 M Tris pH 8,8

Sammelgel: 0,5 M Tris pH 6,8

Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurden zugesetzt, um die Polymerisationsreaktion zu beschleunigen.

Vor Beginn der SDS-PAGE wurde die Proteinkonzentration aller Proben durch Zugabe von Ripa-Puffer angeglichen. Anschließend wurden die Ansätze mit 2,6 µl β-Mercaptoethanol pro 100 µl Probenvolumen (zum Aufspalten von Disulfidbrücken) und 4-fach konzentriertem NuPage LDS Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden danach 10 Minuten bei 99°C in einem Thermoblock erhitzt. Durch anschließende kurze Zentrifugation wurden kondensierte Probenbestandteile wieder in Lösung gebracht. Nun wurden die Ansätze auf das Gel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch bei 100 Volt, 400 Milliampère und 150 Watt für 90 Minuten in Laufpuffer (Lämmli-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin und

0,1% SDS) aufgetrennt. Als Skala für die Molekülmasse wurde, zusätzlich zu den Proben, 5 µl eines Proteinstandards (Precision Plus Protein™ Standard) aufgetragen.

2.2.10.7 Western Blot

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern quantitativ bestimmen zu können, wurden sie durch das Western- bzw. Immunoblotverfahren auf eine Polyvinylidendifluorid - (PVDF) Membran übertragen. Dieser Transfer erfolgte elektrophoretisch mit Hilfe eines Semidry-Blot-Systems. Membran und Whatman-Filter wurden zunächst auf 8,5 x 5,5 cm Größe zugeschnitten. Die Membran wurde dann durch Eintauchen in Methanol für eine Sekunde aktiviert und in Transferpuffer (2,9 g Glycin, 5,8 g Tris, 1,85 ml 20% SDS, 200 ml Methanol, mit *Aqua dest* auf 1 Liter auffüllen) eingelegt. Die Filter wurden ebenfalls mit Transferpuffer durchtränkt (semidry). Anschließend wurden Filter, Membran und das SDS-Gel sandwichartig übereinander gestapelt. (Aufbau von unten nach oben: 3x Filter – Membran – Gel – 3x Filter). Schließlich wurden die Stromkabel so angelegt, dass die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld von oben nach unten (von minus nach plus) wanderten. Die Übertragung dauerte 75 Minuten bei 100 Volt, 115 Milliampère und 150 Watt.

Anschließend wurde die Membran in 6% (w/v) Milchpuffer (skim milk-Pulver gelöst in TBST) für eine Stunde geblockt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Danach erfolgte über Nacht die Inkubation im Primärantikörper (gelöst in 6% (w/v) Milchpuffer).

Am Folgetag wurde die Membran 3 x 10 Minuten in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20) gewaschen und danach für 1 Stunde mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (gelöst in 6% (w/v) Milchpuffer) inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBST (3-5x für 10 Minuten) wurde die Membran mit dem Peroxidase-Substrat ECL Plus (1ml Lösung A + 25 µl Lösung B pro Membran) für 5 Minuten inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase reagiert mit dem ECL Plus Substrat unter Erzeugung von Chemilumineszenz. Anschließend wurden, je nach Bedarf, mehrere Chemilumineszenzfilme auf die Membran für 1 Sekunde bis zu 15 Minuten aufgelegt und danach mit einer Entwicklermaschine entwickelt.

Nach dem Fotografieren der Filme mit dem Bio-imaging System erfolgte die densitometrische Quantifizierung mit einer Software von Gene-Tools.

Um die Membranen erneut mit einem anderen Antikörper inkubieren zu können, wurde sie „gestrippt“. Bei diesem Vorgang wurden gebundene Antikörper durch Einwirken von

Strippingpuffer (90 ml *Aqua dest.*, 10 ml 1 M Glycin, 2-3 ml HCl 37%) für eine Stunde entfernt („strippen“). Nach erneutem Waschen mit TBST (3 x 10 Minuten) und Blocken in 6% (w/v) Milchpuffer für eine Stunde erfolgte die Zugabe der neuen Primär- und Sekundärantikörper sowie die Entwicklung der Membran, wie oben beschrieben.

2.2.10.8 Enzyme-linked immunosorbent assay

Die Konzentration an vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in den Lungen und rechten Ventrikeln wurde mittels ELISA bestimmt. Dabei handelt es sich um ein antikörperbasiertes, quantitatives Nachweisverfahren für Proteine. Ein spezifischer Antikörper wird an eine Unterlage (z. B. Mikrotiterplatte) gekoppelt und bindet das gewünschte Protein (Antigen). Anschließend wird ein zweiter, enzym-konjugierter Antikörper (Detektionsantikörper) hinzugegeben, der sich an das bereits gebundene Antigen anlagert. Gibt man nun ein für das gekoppelte Enzym spezifisches Substrat hinzu, so wird dieses umgesetzt und bewirkt einen Farbumschlag. Die Farbintensität ist dabei proportional zu der Menge an gebundenem, enzym-konjugierten Antikörper und folglich auch zu der Menge an gebundenem Antigen. Durch photometrische Messung kann die Proteinmenge quantifiziert werden.

Vor der Durchführung der VEGFA-ELISAs wurden die Proteine aus den rechten Lungen und rechten Ventrikeln, wie in 2.2.10.4 und 2.2.10.5 beschrieben, isoliert und der Proteingehalt bestimmt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration aller Proben durch Zugabe von Ripa-Puffer so angeglichen, dass ihr Proteingehalt 2,5 µg/µl betrug. Zur Durchführung des ELISAs wurde das RayBio® Mouse VEGF ELISA Kit nach Anleitung verwendet. Es wurden Doppelansätze aufgetragen, das eingesetzte Probenvolumen betrug 20 µl und die Proben wurden 1:5 mit sample diluent buffer verdünnt, so dass eine Proteingesamtkonzentration von 0,5 µg/µl verwendet wurde.

Nach der Durchführung des ELISAs wurden die Platten bei 450 nm in dem Mikroplattenlesegerät Molecular Devices Versamax Microplatereader ausgelesen. Anschließend wurde in Excel eine Eichgerade mit der Geradengleichung $y=mx+b$ aus den Werten der Standardreihe bestimmt. Die Werte der Doppelansätze wurden gemittelt, in die Geradengleichung eingesetzt und somit der Proteingehalt errechnet.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die Grafen und die statistische Auswertung der in dieser Arbeit ermittelten Daten wurden mit Hilfe der Datenanalyse Software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., 2236 Avenida de la Playa La Jolla, CA 92037 USA) erstellt. Aufgrund des internationalen Formats dieses Programmes wurden bei Dezimalzahlen der y-Achsenbeschriftungen Punkte (statt Kommata) als Dezimaltrennzeichen verwendet. Die Daten der RT-PCR und ELISA Analysen sind als Einzelwerte mit Mittelwert (MW) dargestellt. Die Daten aller weiteren Experimente der vorliegenden Arbeit sind angegeben als MW \pm Standardfehler (SEM). Der Stichprobenumfang der jeweiligen Gruppen entspricht, soweit nicht anders angegeben, den in Kapiteln „Aufteilung der Tiergruppen“ (2.2.1.1 und 2.2.2.1) angegebenen Tierzahlen. Die Normalverteilung wurde getestet. Bei allen physiologischen und histologischen Untersuchungen wurden die Unterschiede zwischen den Mäusen der *Siah2 Gruppe* und *Siah1/2 Gruppe* in beiden Tiermodellen (Hypoxie und „banding“), soweit nicht anders angegeben, durch Varianzanalyse und einen Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test für multiple Vergleiche ermittelt. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die Auswertung der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen erfolgte durch die Analyse der differentiellen Expression der einzelnen Gene bzw. Proteine unter den Effekten „Sauerstoffgehalt“ bzw. „Operationsmethode“ und „knockout“. Es wurden zweifaktorielle lineare Modelle angewendet. Die Prüfung der Einhaltung der Voraussetzungen (Homoskedastizität und Normalverteilung der Residuen) erfolgte anhand von Residuenplots. Die Auswirkungen der Effekte „Sauerstoffgehalt“ bzw. „Operationsmethode“ und „knockout“ wurden mittels t-Tests geprüft. Die geschätzten Effektstärken sind als MW mit 95%-Konfidenzintervall angegeben. Die Haupteffekte als Differenz der Δ ct-Werte zwischen zwei Bedingungen wurden durch das Symbol $\Delta\Delta$ ct gekennzeichnet.

Zur Angabe der Signifikanzniveaus wurden folgende Symbole verwendet:

Hypoxiemodell	"banding"-Modell	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,001
Nox WT vs. Hox WT	sham WT vs. PAB WT	*	**	***
Nox KO vs. Hox KO	sham KO vs. PAB KO	#	##	###
Nox WT vs. Nox KO	sham WT vs. sham KO	‡	‡‡	‡‡‡
Hox WT vs. Hox KO	PAB WT vs. PAB KO	†	††	†††

Tabelle 2.2.1: In der Arbeit verwendete Signifikanzniveaus.

Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“
 Siah2 Gruppe: WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}, Siah1/2 Gruppe: WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/- 2/-}

3. Ergebnisse

3.1 Siah2 Mäuse im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie

Alle Daten sind angegeben als MW \pm SEM. Eine Ausnahme bilden die Daten der RT-PCR und ELISA Analysen, die als Einzelwerte mit MW dargestellt sind. Der Stichprobenumfang betrug (soweit nicht anders angegeben) für alle Gruppen n=20. Die Analyse der Daten erfolgte wie unter 2.2.11 angegeben.

3.1.1 Auswirkungen der Hypoxie-Exposition

Die Mäuse zeigten während des gesamten Versuchszeitraumes ein ungestörtes Allgemeinbefinden, eine normale Futter- und Wasseraufnahme, sowie ein physiologisches Putz- und Sozialverhalten.

Die Gewichtsentwicklung wird aufgrund stark differierender Ausgangsgewichte (AG) der einzelnen Tiere zu Versuchsbeginn (Siah2WT 18,0 - 29,0 g, Siah2KO 18,0 - 30,0 g) in Prozent zum jeweiligen AG angegeben. Hypoxieexponierte Siah2WT Mäuse zeigten bis zum dritten Versuchstag eine durchschnittliche Gewichtsreduktion von $7,9 \pm 0,9$ % und Siah2KO Mäuse von $8,5 \pm 0,8$ %. Ab dem vierten Tag nahmen die Tiere beider Mauslinien wieder zu. Siah2WT Mäuse erreichten am Versuchsende durchschnittlich $101,4 \pm 0,9$ % und Siah2KO Mäuse $102,8 \pm 2,3$ % ihres Ausgangsgewichtes. Normoxische Siah2WT Kontrolltiere wogen nach vier Wochen $117,1 \pm 1,5$ % und Siah2 KO Kontrollen $120,4 \pm 1,7$ % des jeweiligen Basisgewichtes (Abb. 3.1.1). Es bestand also sowohl zwischen normoxischen als auch zwischen hypoxischen Siah2 WT und KO Mäusen kein signifikanter Unterschied in der Gewichtsentwicklung.

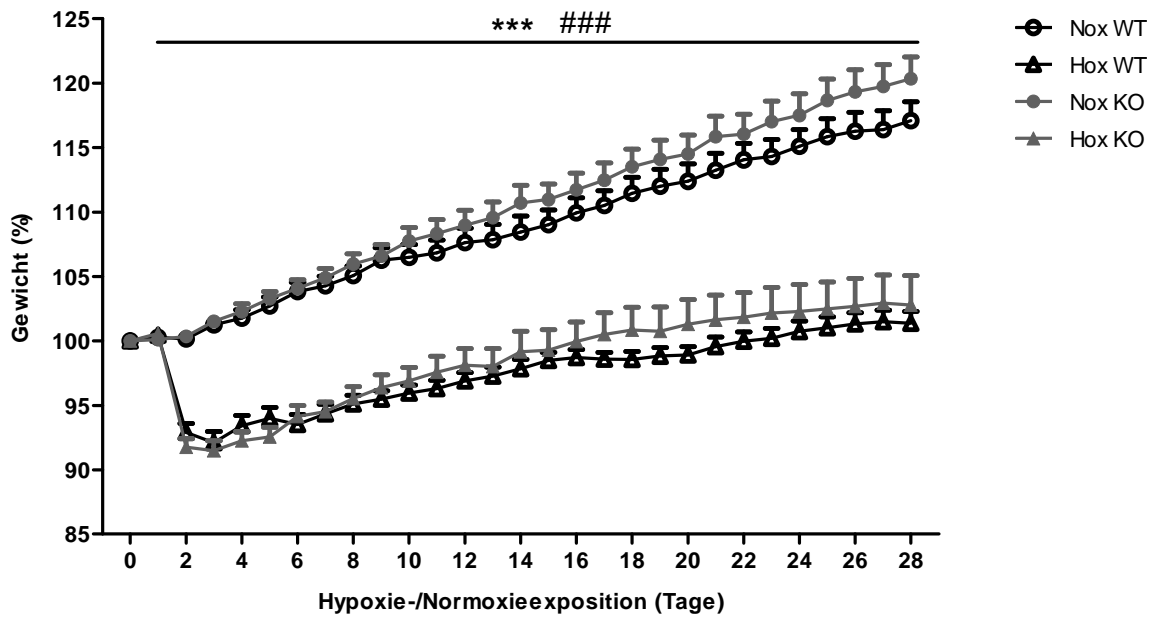


Abbildung 3.1.2: Darstellung des prozentualen Gewichtsverlaufes der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. (von Tag 2-28: *** $p < 0,001$ Nox WT vs. Hox WT, ### $p < 0,001$ Nox KO vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

Zur Charakterisierung der physiologischen Reaktion auf die hypoxischen Bedingungen wurden der Hämatokrit, sowie der systolische arterielle und rechtsventrikuläre Druck am Versuchsende gemessen. Anschließend wurden zur Bestimmung des Ausmaßes der Rechtsherzhypertrophie die Ratios von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* und rechtem Ventrikel zum Körpergewicht bestimmt.

3.1.2 Hämatokritwert

Der Hämatokritwert betrug bei normoxischen Siah2WT Kontrolltieren am Versuchsende $0,38 \pm 0,01$ und bei Siah2KO Mäusen $0,37 \pm 0,01$. Hypoxie-exponierte WT sowie KO Mäuse zeigten deutlich höhere Werte als die Normoxietiere (Siah2WT $0,62 \pm 0,02$ und Siah2 KO $0,61 \pm 0,02$) (Abb. 3.1.2).

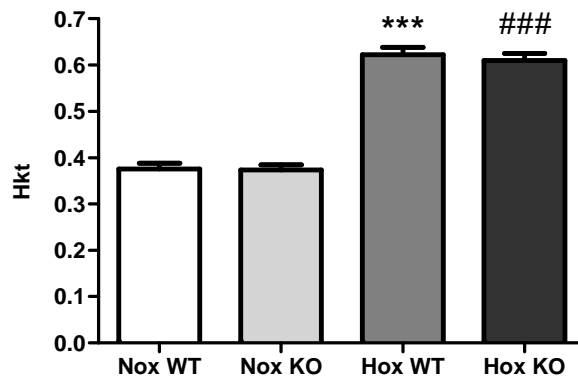


Abbildung 3.1.3: Darstellung des Hämatokritwertes (Hkt) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (**p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, ###p<0,001 Nox KO vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.3 Systolischer arterieller Druck

Der SAP der normoxischen Kontrolltiere betrug bei Siah2WT Mäusen $76,8 \pm 4,3$ mmHg und bei Siah2KO Tieren $79,0 \pm 2,6$ mmHg. Nach vier Wochen Hypoxieexposition zeigten Siah2WT Mäuse einen SAP von $65,6 \pm 1,3$ mmHg und Siah2KO Mäuse einen statistisch nicht signifikant unterschiedlichen Wert von $63,8 \pm 1,5$ mmHg (Abb. 3.1.3).

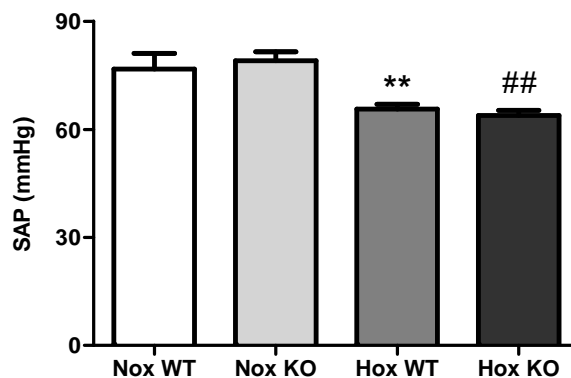


Abbildung 3.1.3: Darstellung des systolischen arteriellen Druckes (SAP) der Siah2 Gruppe (n=10) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (**p<0,01 Nox WT vs. Hox WT, ##p<0,01 Nox KO vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.4 Rechtsventrikulärer systolischer Druck

In Normoxie betrug der RVSP $22,5 \pm 0,5$ mmHg bei Siah2WT Mäusen und $21,9 \pm 0,7$ mmHg bei Siah2KO Tieren. Nach vierwöchiger Hypoxie zeigten KO sowie WT Mäuse signifikant höhere rechtsventrikuläre Drücke als ihre normoxischen Kontrollen (Siah2WT $34,8 \pm 1,0$ mmHg und Siah2KO $33,4 \pm 1,1$ mmHg). Zwischen den RVP der hypoxie-exponierten Siah2 WT und KO Mäuse bestand kein signifikanter Unterschied (Abb 3.1.4).

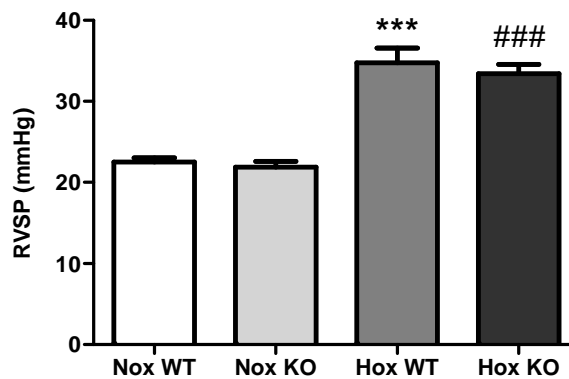


Abbildung 3.1.4: Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) der Siah2 Gruppe (n=10) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***) $p < 0,001$ Nox WT vs. Hox WT, (###) $p < 0,001$ Nox KO vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.5 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus Septum als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Das Verhältnis des Nassgewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* (RV/(LV+S)) betrug bei normoxischen Siah2WT und Siah2KO Mäusen gleichermaßen $0,25 \pm 0,01$. Im Verlauf der Hypoxieexposition entwickelten die Mäuse beider Linien aufgrund der erhöhten Druckbelastung des rechten Ventrikels eine Rechtsherzhypertrophie. Die hypoxischen Siah2WT Mäuse zeigten eine Herzratio von $0,40 \pm 0,01$, während die Siah2KO Tiere eine signifikant niedrigere Herzratio von $0,36 \pm 0,01$ aufwiesen; bei gegenüber den Nox KO Mäusen noch immer markant ($p < 0,001$) erhöhten Werten (Abb. 3.1.5).

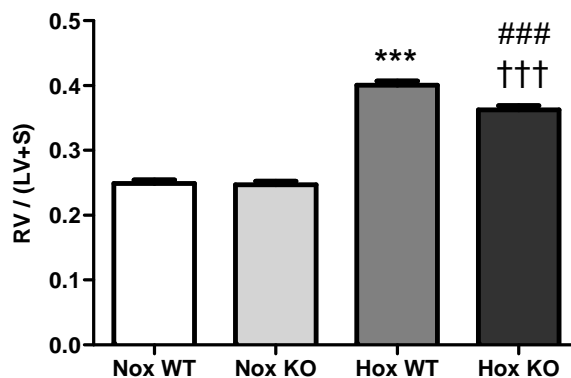


Abbildung 3.1.5: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* (RV/(LV+S)) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***) $p < 0,001$ Nox WT vs. Hox WT, (###) $p < 0,001$ Nox KO vs. Hox KO, (†††) $p < 0,001$ Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.6 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Zusätzlich zur Herzratio wurde das Verhältnis des Gewichtes des rechten Ventrikels zum Körpergewicht bestimmt, um zu untersuchen, ob therapiebedingte Einflüsse auf die Größe des Herzens (wie der Verlust des Siah2 Proteins oder die Hypoxie) den Grad der Hypertrophie verfälschen. Der so ermittelte Hypertrophiegrad stimmte mit dem durch die Herzratio ermittelten Ergebnis überein. Normoxische Siah2WT zeigten eine Ratio des rechten Ventrikels zum Körpergewicht von $0,75 \pm 0,02$ und Siah2KO Mäuse eine Ratio von $0,73 \pm 0,02$. Bei Hypoxie-exponierten Siah2WT Mäusen betrug der Quotient $1,23 \pm 0,03$, während Siah2KO Tiere einen im direkten Vergleich signifikant ($p < 0,001$) niedrigeren Wert von $1,09 \pm 0,03$ aufwiesen; bei gegenüber den Nox KO Mäusen noch immer markant ($p < 0,001$) erhöhten Werten (Abb. 3.1.6).

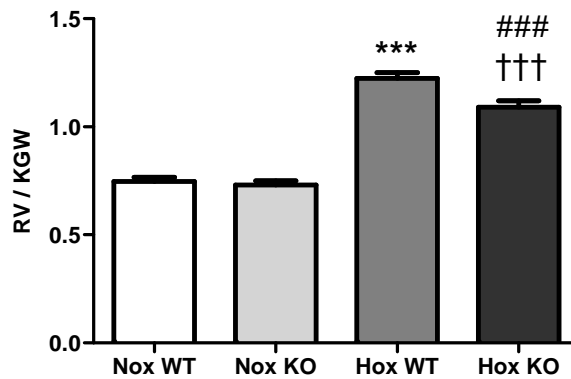


Abbildung 3.1.6: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht (RV/KGW) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***) $p < 0,001$ Nox WT vs. Hox WT, (###) $p < 0,001$ Nox KO vs. Hox KO, (†††) $p < 0,001$ Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.7 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

Im Verlauf der vierwöchigen Exposition unter hypoxischen Bedingungen entwickelten die SiahWT und Siah2KO Mäuse eine Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie mit einem typischen Umbau der kleinen Lungengefäße. Um das Ausmaß dieses Remodeling beurteilen zu können, wurden der Muskularisierungsgrad und die Wandstärke der pulmonalen Gefäße bestimmt.

3.1.7.1 Muskularisierungsgrad

Bezüglich der Gefäßkategorie mit einem Außendurchmesser von 20-70 μm wurden bei normoxischen Siah2WT Kontrolltieren $5,6 \pm 1,0$ % voll-muskularisierte, $40,0 \pm 1,8$ % teil-muskularisierte und $53,8 \pm 2,1$ % nicht muskularisierte Lungengefäße erfasst. Normoxische Siah2KO Tiere wiesen mit $4,9 \pm 0,6$ % voll-muskularisierten, $41,8 \pm 0,9$ % teil-muskularisierten und $53,3 \pm 1,0$ % nicht muskularisierten Lungengefäßen eine vergleichbare, statistisch nicht unterschiedliche Verteilung auf. Nach vierwöchiger Hypoxieexposition stieg der Anteil der teil- und voll-muskularisierten Gefäße in beiden Linien gleichermaßen signifikant an ohne, dass sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Siah2WT und KO Tieren zeigte. Bei Mäusen der Siah2 WT Hypoxiegruppe wurden $27,0 \pm 1,7$ % voll-muskularisierte, $45,6 \pm 1,4$ % teil-muskularisierte und $28,9 \pm 1,4$ % nicht-muskularisierte Gefäße analysiert. Siah2KO Tiere zeigten $24,2 \pm 1,5$ % voll-muskularisierte, $46,2 \pm 1,4$ % teil-muskularisierte und $30,5 \pm 1,5$ % nicht-muskularisierte

Lungengefäße. Die Werte sind in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefasst (Tab. 3.1.1, Abb. 3.1.7).

Gruppe (n=10)	Muskularisierungsgrad in %		
	nicht MW ± SEM	teilweise MW ± SEM	voll MW ± SEM
Nox WT	53,8 ± 2,1	40,0 ± 1,8	5,6 ± 1,0
Nox KO	53,3 ± 1,0	41,8 ± 0,9	4,9 ± 0,6
Hox WT	28,9 ± 1,4 ***	45,6 ± 1,4 *	27,0 ± 1,7 ***
Hox KO	30,5 ± 1,5 ####	46,2 ± 1,4	24,2 ± 1,5 ###

Tabelle 3.1.1: Prozentualer Muskularisierungsgrad kleiner Lungengefäße (Außen-Ø 20 - 70 µm) der Siah2 Gruppe (n=10) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***)p<0,001, *p<0,05 Nox WT vs. Hox WT, ####p<0,001 Nox KO vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

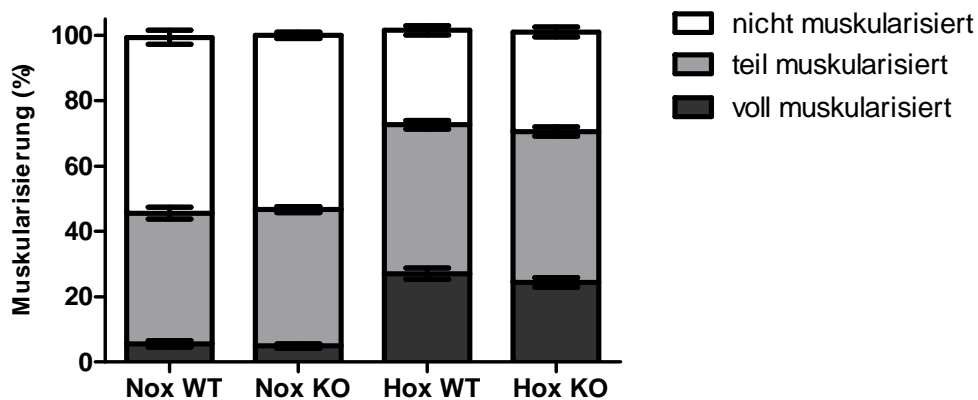


Abbildung 3.1.7: Darstellung des prozentualen Anteils nicht-, partiell- und voll-muskularisierter kleiner Lungengefäße (Außen-Ø 20 – 70 µm) der Siah2 Gruppe (n=10) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.7.2 Mediale Wandstärke

Im Verlauf der pulmonalarteriellen Hypertonie und des vaskulären Remodeling erfolgte eine Verdickung der pulmonalen Gefäßwände von Hypoxie-exponierten *Siah2*WT und KO Mäusen in vergleichbarem Maße. Die mediale Wandstärke der kleinen (20-70 μm) und mittleren (70-150 μm) Pulmonalgefäße war in den Hypoxiegruppen signifikant erhöht, während sich bei den großen Gefäßen keine Unterschiede zwischen normoxischen und hypoxischen Tieren zeigten. Die ermittelten Werte sind in der folgenden Tabelle und Abbildung detailliert dargestellt (Tab. 3.1.2, Abb. 3.1.8).

Gruppe (n=10-14)	Wandstärke in % des Gefäßaußendurchmessers		
	Kleine Gefäße 20-70 μm	Mittlere Gefäße 70-150 μm	Große Gefäße >150 μm
	MW \pm SEM	MW \pm SEM	MW \pm SEM
Nox WT	14,1 \pm 0,5	9,0 \pm 0,4	6,9 \pm 0,4
Nox KO	14,0 \pm 0,4	8,5 \pm 0,4	7,1 \pm 0,5
Hox WT	18,1 \pm 0,4 ***	10,6 \pm 0,4 *	7,6 \pm 0,4
Hox KO	17,4 \pm 0,6 ###	10,3 \pm 0,5 #	7,3 \pm 0,3

Tabelle 3.1.2: Mediale Wandstärke kleiner, mittlerer und großer Blutgefäße der pulmonalen Strombahn für die *Siah2* Gruppe (*Hox* KO n=14, andere n=10) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***)p<0,001, *p<0,05 Nox WT vs. *Hox* WT, ###p<0,001, #p<0,05 Nox KO vs. *Hox* KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

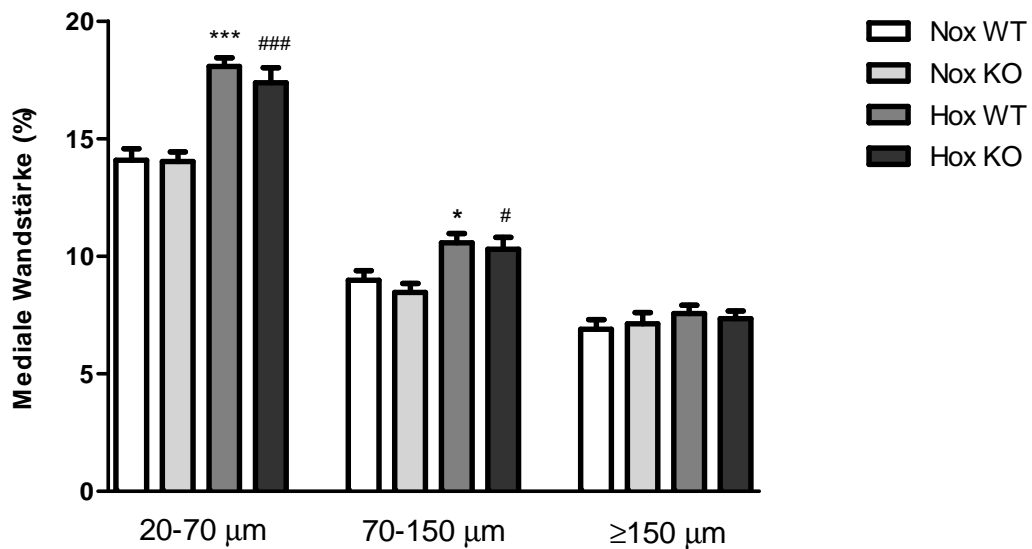


Abbildung 3.1.8: Darstellung der medialen Wandstärke kleiner, mittlerer und großer Blutgefäße der pulmonalen Strombahn für die Siah2 Gruppe (Hox KO n=14, andere n=10) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***) $p < 0,001$, * $p < 0,05$ Nox WT vs. Hox WT, ### $p < 0,001$, # $p < 0,05$ Nox KO vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.8 Echokardiografische Untersuchungen

Zur detaillierten Charakterisierung des kardialen Remodeling und der rechtsventrikulären Funktion wurden echokardiografische Untersuchungen durchgeführt und eine Reihe verschiedener Konstanten berechnet. Sämtliche echokardiografischen Messungen in dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov vorgenommen.

3.1.8.1 Rechter Ventrikel und rechtes Atrium

Als Parameter zur Beurteilung des Ausmaßes der rechtsventrikulären Hypertrophie wurde die Wandstärke des rechten Ventrikels echokardiografisch vermessen. Hypoxische Mäuse beider Linien zeigten im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen deutlich verdickte Wände. Die Zunahme der rechtsventrikulären Wandstärke war bei Siah2WT Mäusen signifikant stärker ausgeprägt als bei Siah2KO Tieren (Abb. 3.1.9, Tab. 3.1.3).

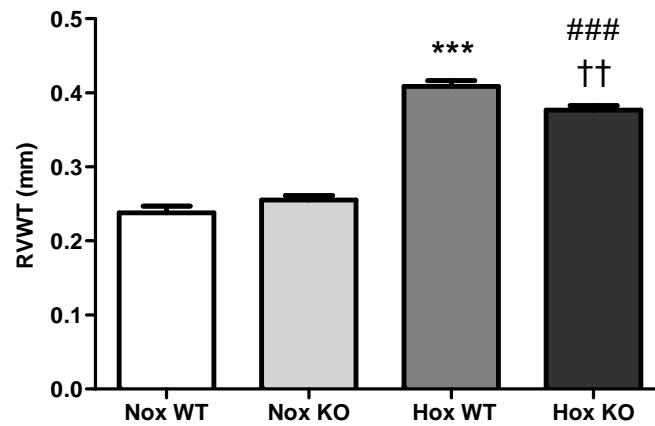


Abbildung 3.1.9: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT, right ventricular wall thickness) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Hox KO n=6, andere n=8. Endpunktmessung nach 4 Wochen. (***) $p < 0,001$ Nox WT vs. Hox WT, (###) $p < 0,001$ Nox KO vs. Hox KO, †† $p < 0,01$ Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

Weiterhin wurde das Maß der rechtsventrikulären Dilatation durch die Ermittlung des inneren rechtsventrikulären Durchmessers bestimmt. Hypoxische Siah2WT Mäuse zeigten eine Dilatation der rechten Herzkammer, während der rechtsventrikuläre Durchmesser der Siah2KO Tiere unverändert blieb (Abb. 3.1.10, Tab 3.1.3).

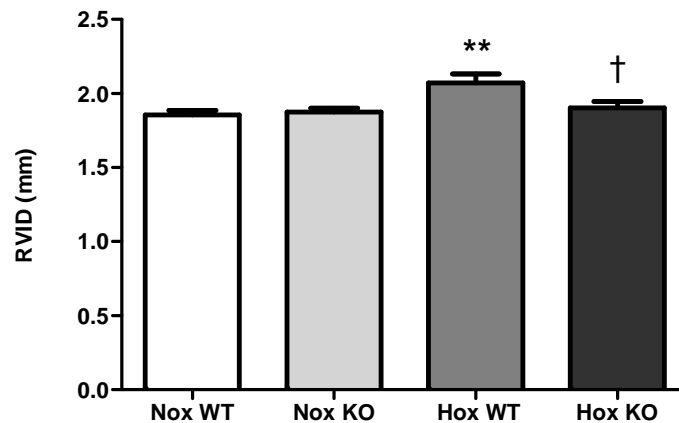


Abbildung 3.1.10: Rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID, right ventricular internal diameter) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Nox WT n=7, Hox WT, Nox KO n=8, Hox KO n=6. Endpunktmessung nach 4 Wochen. (**) $p < 0,01$ Nox WT vs. Hox WT, † $p < 0,05$ Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

Als weiterer Parameter zur Ermittlung einer rechtsventrikulären Beeinträchtigung wurde die Querschnittsfläche des rechten *Atrium* am Ende der Diastole bestimmt. Nach vierwöchiger Hypoxieexposition wiesen Siah2WT Mäuse eine deutliche Vergrößerung des rechten *Atrium* auf, während die atriale Querschnittsfläche der Siah2KO Tiere im Bereich der normoxischen Kontrolltiere lag (Abb. 3.1.11, Tab. 3.1.3).

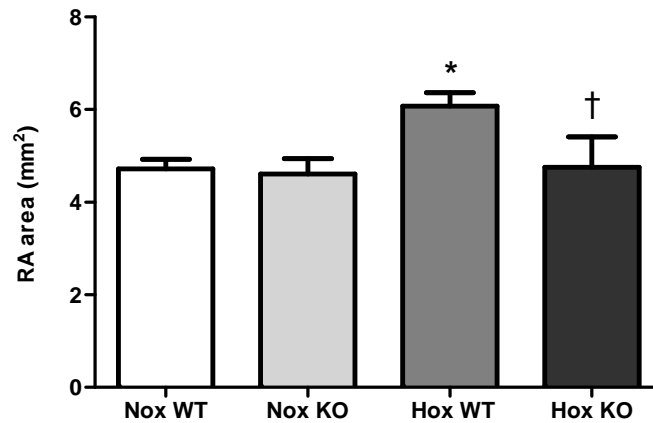


Abbildung 3.1.11: Enddiastolische Querschnittsfläche des rechten *Atrium* (RA area, right atrial area) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Hox KO n=4, andere n=8. Endpunktmessung nach 4 Wochen. (*p<0,05 Nox WT vs. Hox WT, †p<0,05 Hox WT vs Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

In der folgenden Tabelle sind die Messwerte nocheinmal detailliert aufgeführt:

4 Wochen	Siah2WT Nox			Siah2KO Nox			Siah2WT Hox				Siah2KO Hox			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
RVWT (mm)	0,24	0,01	8	0,26	0,01	8	0,41	0,01	8	***	0,38	0,01	6	†† ###
RVID (mm)	1,90	0,04	7	1,86	0,03	8	2,07	0,06	8	**	1,90	0,04	6	†
RA area (mm²)	4,72	0,21	8	4,61	0,33	8	6,07	0,29	8	*	4,75	0,66	4	†

Tabelle 3.1.3: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT), rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID) und enddiastolische Querschnittsfläche des rechten *Atrium* (RA area) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Endpunktmessung nach 4 Wochen. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, Nox WT vs. Hox WT, ###p<0,001 Nox KO vs. Hox KO, †p<0,05, ††p<0,01 Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.8.2 Cardiac output

Um Hypoxie-bedingte Veränderungen der Pumpleistung des Herzens zu erkennen wurde das Herzminutenvolumen ermittelt. Siah2WT Mäuse zeigten ab einer zweiwöchigen Hypoxieexposition einen progredient fallenden cardiac output (CO), während die Leistung des Herzens der Siah2KO Tiere innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes erhalten blieb (Abb. 3.1.12, Tab. 3.1.4).

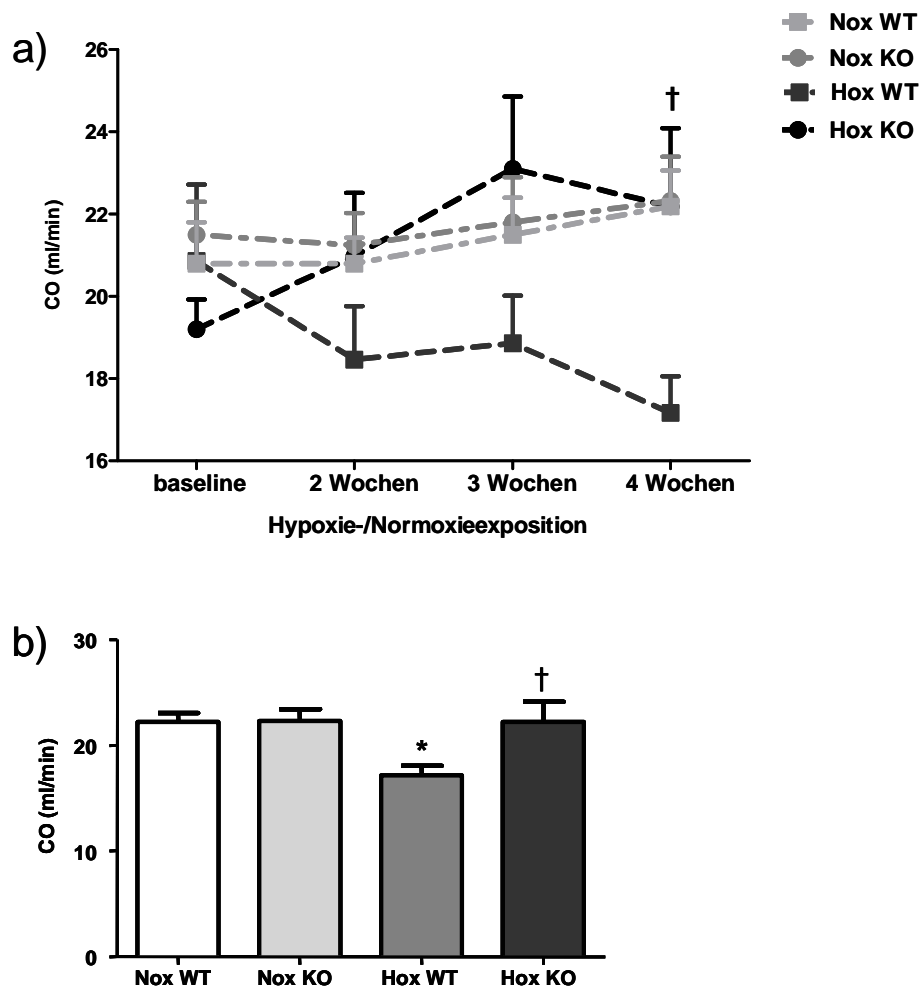


Abbildung 3.1.12: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. **a) Verlaufskontrolle** †p<0,05 Hox WT vs. Hox KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur Hox WT vs. Hox KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.1.4 zu entnehmen. **b) Endpunktmessung** nach 4 Wochen *p<0,05 Nox WT vs. Hox WT, †p<0,05 Hox WT vs. Hox KO. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

CO (ml/min)	Siah2WT Nox			Siah2KO Nox			Siah2WT Hox				Siah2KO Hox			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	20,8	1,0	8	21,5	0,8	8	20,9	1,9	8		19,2	0,7	8	
2 Wochen	20,8	0,6	8	21,2	0,8	8	18,5	1,3	8		21,0	1,5	8	
3 Wochen	21,5	0,9	8	21,8	1,1	8	18,9	1,2	8		23,1	1,8	8	
4 Wochen	22,2	0,9	8	22,3	1,1	8	17,2	0,9	8	*	22,2	1,9	8	†

Tabelle 3.1.4: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Verlaufskontrolle *p<0,05 Nox WT vs. Hox WT, †p<0,05 Hox WT vs. Hox KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.8.3 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels

Zur Untersuchung der systolischen Funktion des rechten Ventrikels wurde die TAPSE (tricuspid annular plane systolic excursion) bestimmt. Hypoxische Siah2KO Mäuse zeigten während des gesamten Versuches eine vollständig erhaltene systolische Funktion, während die TAPSE Werte der Siah2WT Mäuse ab der zweiten Woche in Hypoxie progredient fielen und somit (wie bereits unter Kapitel 2.2.3 beschrieben) eine fortschreitende Verschlechterung der systolischen rechtsventrikulären Funktion offenbarten (Abb. 3.1.13, Tab. 3.1.5).

TAPSE (mm)	Siah2WT Nox			Siah2KO Nox			Siah2WT Hox				Siah2KO Hox			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	1,44	0,05	8	1,45	0,03	8	1,44	0,03	8		1,40	0,04	8	
2 Wochen	1,42	0,02	8	1,47	0,04	8	1,27	0,04	8	**	1,40	0,04	8	†
3 Wochen	1,44	0,03	8	1,45	0,03	8	1,31	0,02	8	*	1,44	0,03	8	†
4 Wochen	1,45	0,03	8	1,46	0,02	8	1,25	0,03	8	***	1,47	0,02	8	†††

Tabelle 3.1.5: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Verlaufskontrolle *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, †p<0,05, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

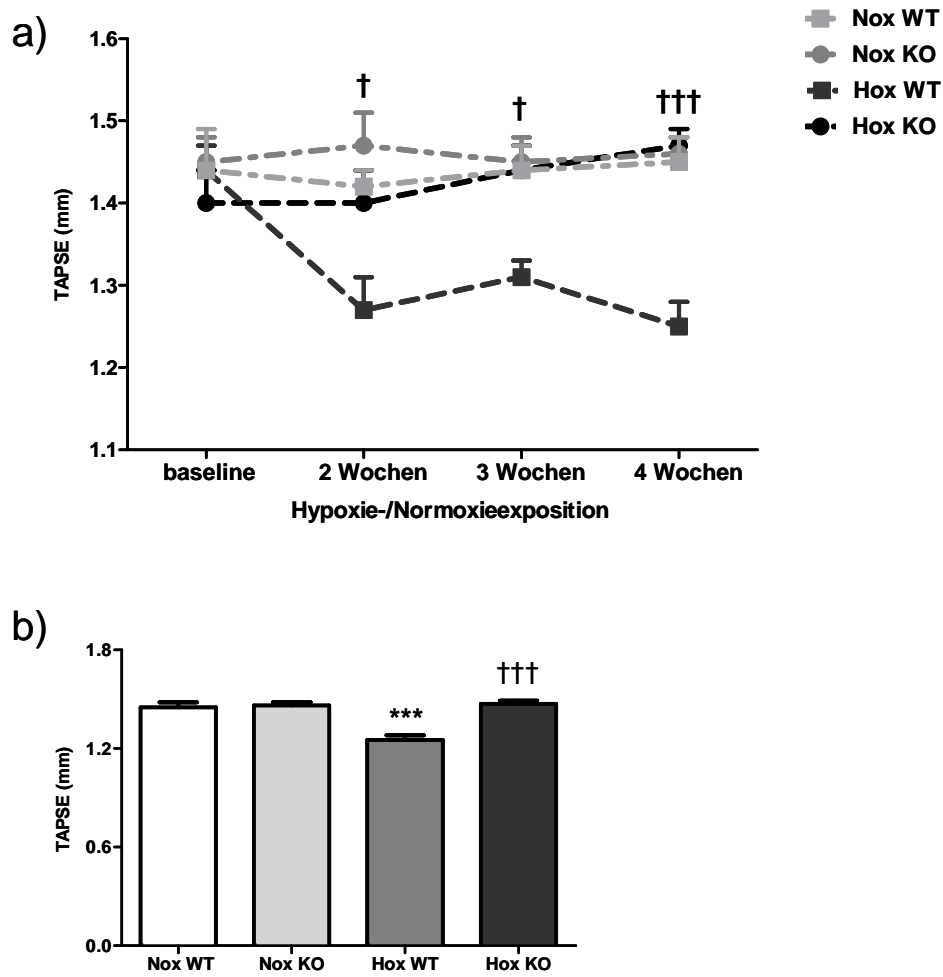


Abbildung 3.1.13: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle †p<0,05, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur Hox WT vs. Hox KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.1.5 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 4 Wochen ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.8.4 IVRT/RR – diastolische Funktion des rechten Ventrikels

Die diastolische Funktion des rechten Ventrikels wurde durch die IVRT/RR (isovolumic relaxation time) charakterisiert. Hypoxische Siah2KO sowie Siah2WT Mäuse zeigten ab der zweiten Versuchswoche ansteigende IVRT/RR Werte und somit (wie bereits unter 2.2.3 beschrieben) eine beeinträchtigte diastolische Funktion. Ab der dritten Woche unter hypoxischen Bedingungen war diese Funktionsminderung bei Siah2WT signifikant stärker ausgeprägt als bei Siah2KO Mäusen (Abb. 3.1.14, Tab. 3.1.6).

IVRT/RR (%)	Siah2WT Nox			Siah2KO Nox			Siah2WT Hox				Siah2KO Hox			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	16,0	0,8	8	15,1	0,5	8	15,0	0,7	8		16,6	1,3	8	
2 Wochen	15,7	0,7	8	15,2	0,6	8	19,3	0,5	8	*	19,2	1,8	8	##
3 Wochen	15,0	0,7	8	15,5	0,7	8	21,6	0,7	8	***	18,4	0,8	8	†
4 Wochen	14,9	0,6	8	15,9	0,7	8	23,7	1,0	8	***	19,9	0,9	8	††##

Tabelle 3.1.6: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Verlaufskontrolle
 *p<0,05, ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, ##p<0,01 Nox KO vs. Hox KO, †p<0,05, ††p<0,01 Hox WT vs. Hox KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

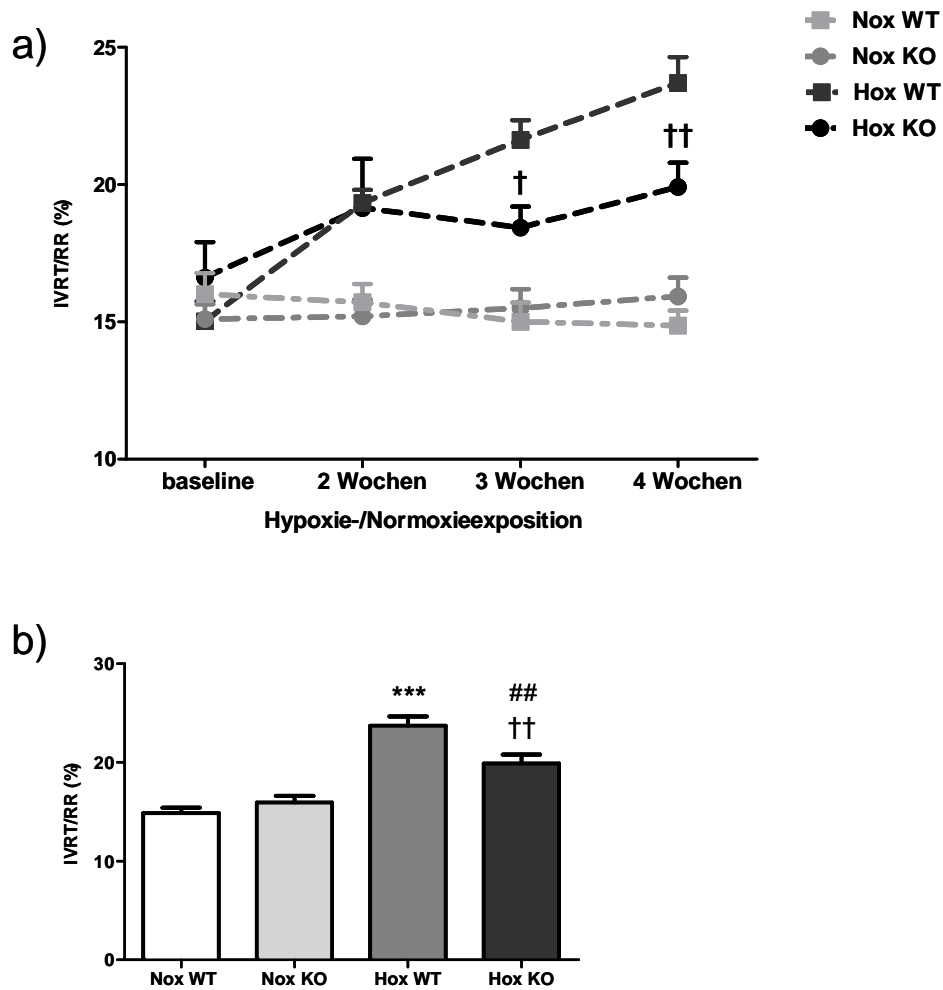


Abbildung 3.1.14: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle †p<0,05, ††p<0,01 Hox WT vs. Hox KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur Hox WT vs. Hox KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.1.6 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 4 Wochen ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, ##p<0,01 Nox KO vs. Hox KO, ††p<0,01 Hox WT vs. Hox KO. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.8.5 MPI – globale Funktion des rechten Ventrikels

Die Darstellung der globalen Funktion des rechten Ventrikels erfolgte durch die Kalkulation des MPI (myocardial performance index). Nach zweiwöchiger Hypoxie zeigten sowohl Siah2KO, als auch Siah2WT Mäuse eine Zunahme der MPI Werte und damit (wie bereits unter 2.2.3 beschrieben) eine herabgesetzte globale rechtsventrikuläre Funktion. Ab der dritten Woche unter hypoxischen Bedingungen war diese Funktionseinschränkung bei Siah2WT signifikant stärker ausgeprägt als bei Siah2KO Mäusen (Abb. 3.1.15, Tab. 3.1.7).

MPI	Siah2WT Nox			Siah2KO Nox			Siah2WT Hox				Siah2KO Hox			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	0,78	0,03	8	0,80	0,02	8	0,75	0,04	8		0,80	0,03	8	
2 Wochen	0,80	0,02	8	0,84	0,03	8	1,01	0,01	8	***	0,99	0,05	8	###
3 Wochen	0,78	0,03	8	0,83	0,02	8	1,08	0,02	8	***	0,96	0,03	8	†##
4 Wochen	0,76	0,03	8	0,82	0,02	8	1,09	0,02	8	***	0,99	0,02	8	†###

Tabelle 3.1.7: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Verlaufskontrolle ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, ##p<0,01, ###p<0,001 Nox KO vs. Hox KO, †p<0,05 Hox WT vs. Hox KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

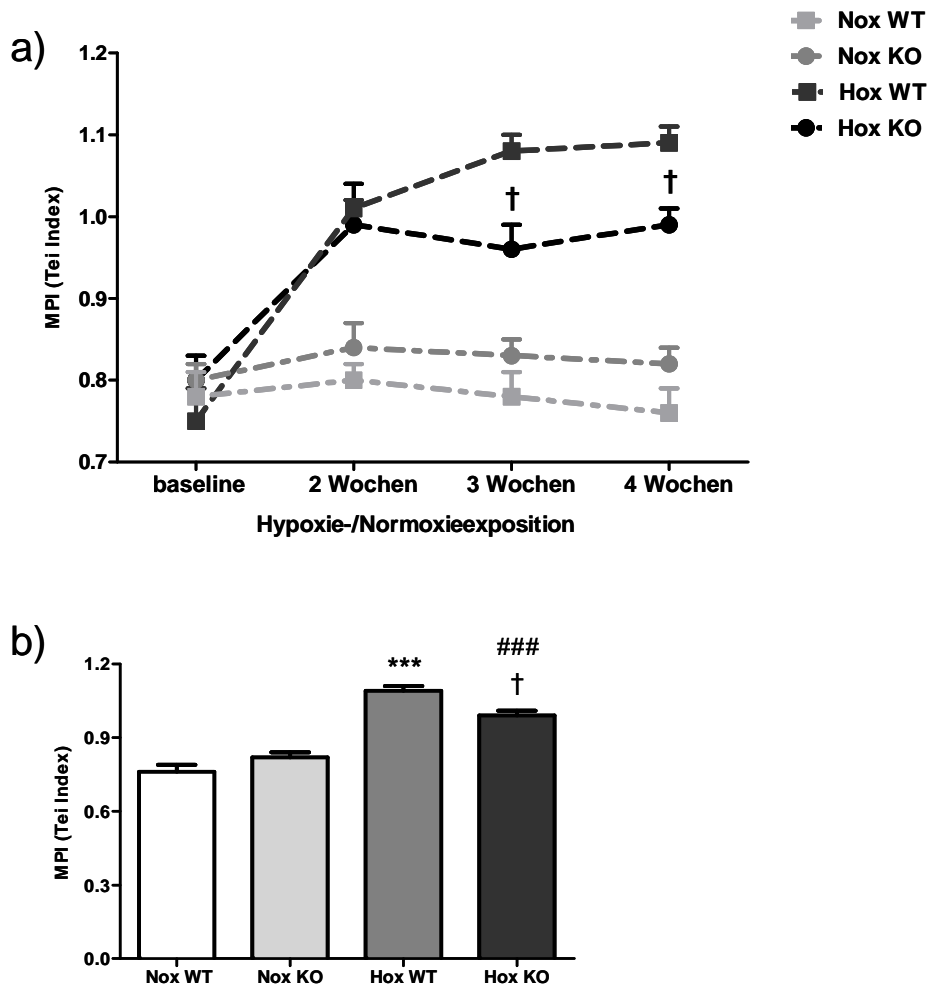


Abbildung 3.1.15: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. **a) Verlaufskontrolle** †p<0,05 Hox WT vs. Hox KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur Hox WT vs. Hox KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.1.7 zu entnehmen. **b) Endpunktmessung** nach 4 Wochen ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, ###p<0,001 Nox KO vs. Hox KO, †p<0,05 Hox WT vs. Hox KO. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.8.6 Zusammenfassung der echokardiografischen Befunde

Siah2KO Mäuse zeigten unter Hypoxie eine wesentlich besser erhaltene Funktion und eine geringere Hypertrophie des rechten Ventrikels als Siah2WT Tiere. Hypoxische Siah2WT zeigten eine Vergrößerung des rechtsventrikulären Durchmessers und der Querschnittsfläche des rechten *Atrium*, wohingegen hypoxische Siah2KO Mäuse Werte im Bereich der normoxischen Kontrollen aufwiesen. Hypoxische Mäuse beider Linien zeigten eine Verschlechterung der globalen Rechtsherzfunktion; deren Ausmaß bei Hypoxie-exponierten Siah2KO Mäusen signifikant geringer ausgeprägt war als bei Siah2WT. Lediglich die rechtsventrikuläre diastolische Funktion der KO Tiere war unter hypoxischen Bedingungen herabgesetzt, während die systolische Leistung vollständig erhalten blieb.

3.1.9 Prozentualer Kollagenanteil des rechten Ventrikels

Um den Grad der Fibrose des rechten Ventrikels zu bestimmen, wurde der prozentuale Anteil an Kollagenfasern bezogen auf die Gesamtfläche ermittelt. Im Rahmen der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie zeigten weder hypoxische Siah2WT Mäuse noch Siah2KO Tiere einen Anstieg des rechtsventrikulären Gehaltes an kollagenen Fasern und somit auch keinen Hinweis auf eine Fibrose des rechten Ventrikels.

Der Kollagenanteil der normoxischen Kontrolltiere betrug bei Siah2WT $0,45 \pm 0,09$ % und bei Siah2KO Tieren $0,53 \pm 0,05$ %. Nach vierwöchiger Hypoxieexposition zeigten Siah2WT Tiere einen Kollagengehalt von $0,55 \pm 0,08$ % und Siah2KO Mäuse von $0,55 \pm 0,06$ % (Abb. 3.1.16).

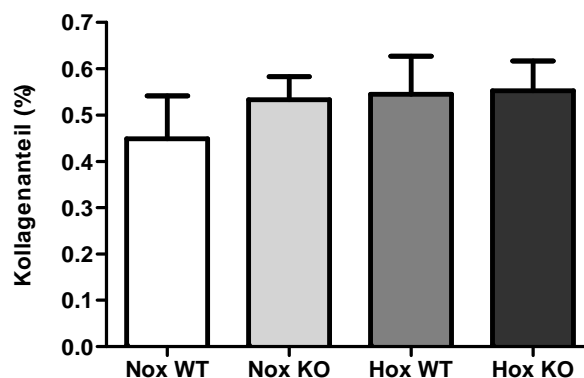


Abbildung 3.1.16: Darstellung des prozentualen Kollagenanteils (%) des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe (n=5) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2^{+/+}*, KO = *siah2^{-/-}*.

3.1.10 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Auswertung der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen erfolgte durch die Analyse der differentiellen Expression der einzelnen Gene bzw. Proteine unter den Effekten „Sauerstoffgehalt“ und „knockout“ von *siah2*.

3.1.10.1 Genexpression von *siah2* und *siah1a/b* in der Lunge und im rechten Ventrikel

Aus der Literatur ist bekannt, dass Siah-Ubiquitinligasen in akuter Hypoxie vermehrt exprimiert werden (Nakayama et al., 2004; Nakayama and Ronai, 2004; Wang et al., 2011). Deshalb sollte durch RT-PCR Analysen untersucht werden, ob dies auch unter chronischer Hypoxie zutrifft. Die Genexpression von *siah2* wurde im Lungenhomogenat und im Homogenat des rechten Ventrikels der WT Mäuse untersucht. Die Expression von *siah1a/b* wurde im Lungenhomogenat und im Homogenat des rechten Ventrikels der WT und KO Tiere analysiert. Keiner der beiden untersuchten Effekte „Sauerstoffgehalt“ und „knockout“ von *siah2* hatte eine nachweisbare Auswirkung auf die Regulation von *siah2* bzw. *siah1a/b*. (Abb 3.1.17, 3.1.18).

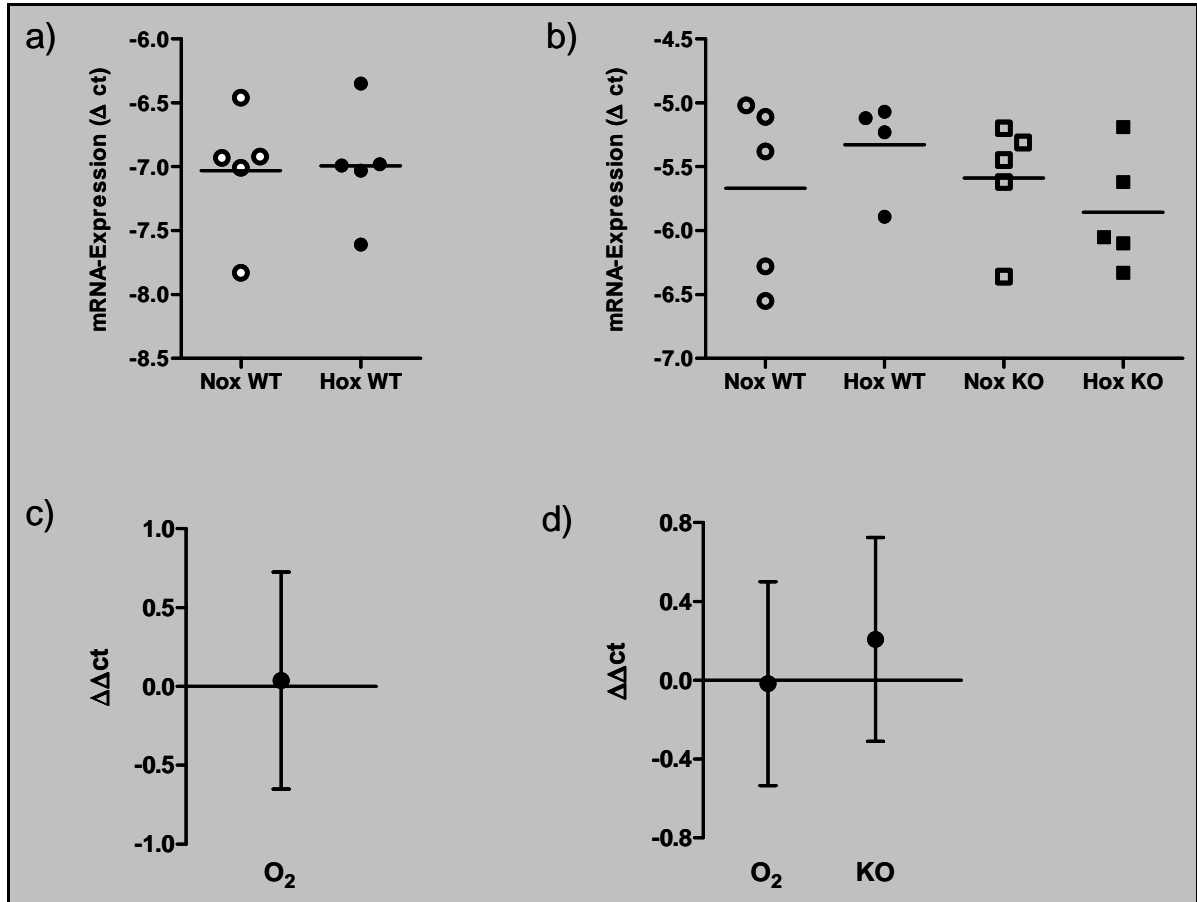


Abbildung 3.1.17: Darstellung der Genexpression a) von *siah2* im Lungenhomogenat von *Siah2*WT Mäusen und b) von *siah1a/b* im Lungenhomogenat der *Siah2*WT und KO Tiere im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Δ ct = cycle threshold, Querbalken = Mittelwert. (n-Anzahlen: a) n=5, b) Hox WT n=4, andere n=5). c) Effektstärke des Sauerstoffgehaltes für die Expression von *siah2* im Lungenhomogenat von *Siah2*WT Mäusen. d) Effektstärke von Sauerstoffgehalt und knockout für die Expression von *siah1a/b* im Lungenhomogenat der *Siah2*WT und KO Tiere. MW mit 95% Konfidenzintervall. O_2 = Sauerstoffgehalt, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

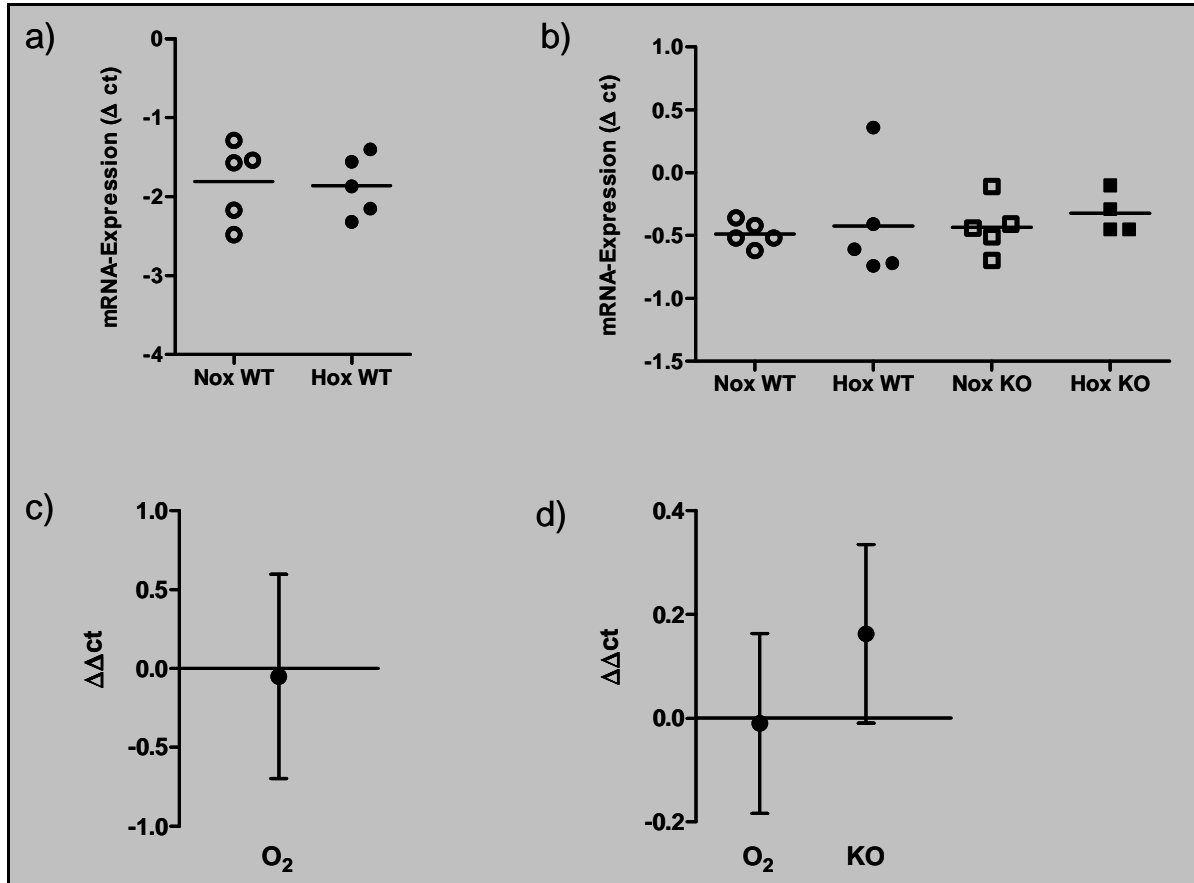


Abbildung 3.1.18: Darstellung der Genexpression a) von *siah2* im Homogenat des rechten Ventrikels von *Siah2*WT Mäusen und b) von *siah1a/b* im Homogenat des rechten Ventrikels der *Siah2*WT und KO Tiere im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Δ ct = cycle threshold, Querbalken = Mittelwert. (n-Anzahlen: a) n=5, b) Hox KO n=4, andere n=5). c) Effektstärke des Sauerstoffgehaltes für die Expression von *siah2* im Homogenat des rechten Ventrikels von *Siah2*WT Mäusen. d) Effektstärke von Sauerstoffgehalt und knockout für die Expression von *siah1a/b* im Homogenat des rechten Ventrikels der *Siah2*WT und KO Tiere. MW mit 95% Konfidenzintervall. O_2 = Sauerstoffgehalt, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.10.2 Proteinexpression der Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD)1, PHD2 und PHD3 in der Lunge und im rechten Ventrikel

Die physiologischen und histologischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Siah2KO Mäuse anders als ihre WT-Kontrollen auf hypoxische Bedingungen reagieren. Ein Schlüsselprotein der Anpassungsmechanismen in Hypoxie repräsentiert HIF1 α . Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe 1.5.4), ist Siah2 an der Regulation der verfügbaren Menge von HIF1 α durch Ubiquitinylierung und dem daraus resultierenden Abbau von PHD1 und PHD3 maßgeblich beteiligt. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich die Proteinmenge der PHDs in diesem Modell verändert.

Die Proteinexpression der PHDs in der Lunge und im rechten Ventrikel der Siah2 Gruppe wurde mittels Westernblotverfahren in Gewebehomogenat analysiert. Die Proteinmenge im Lungenhomogenat wurde bezogen auf β -Aktin und im Homogenat des rechten Ventrikels bezogen auf α -Tubulin normalisiert. Da die Westernblotanalysen (aufgrund des hohen Stichprobenumfangs) auf mehreren Membranen durchgeführt wurden, erfolgte die Normalisierung der Einzelwerte nach der Formel: Einzelwert der Probe – Mittelwert der Membran + Gesamtmittelwert aller Membranen.

Die Westernblotanalysen von PHD1, PHD2 und PHD3 im Lungenhomogenat werden in Abb 3.1.19 und 3.1.20 grafisch dargestellt. Keiner der beiden untersuchten Effekte „Sauerstoffgehalt“ und „knockout“ von *siah2* hatte eine statistisch abgesicherte Auswirkung auf die Proteinmengen von PHD1 und PHD2. Der Haupteffekt „Sauerstoffgehalt“ hatte ebenfalls keinen nachweisbaren Einfluss auf den Proteingehalt von PHD3 im Lungenhomogenat, während der knockout von *siah2* zu einem signifikanten Anstieg der PHD3-Proteinmenge führte (Abb 3.1.20).

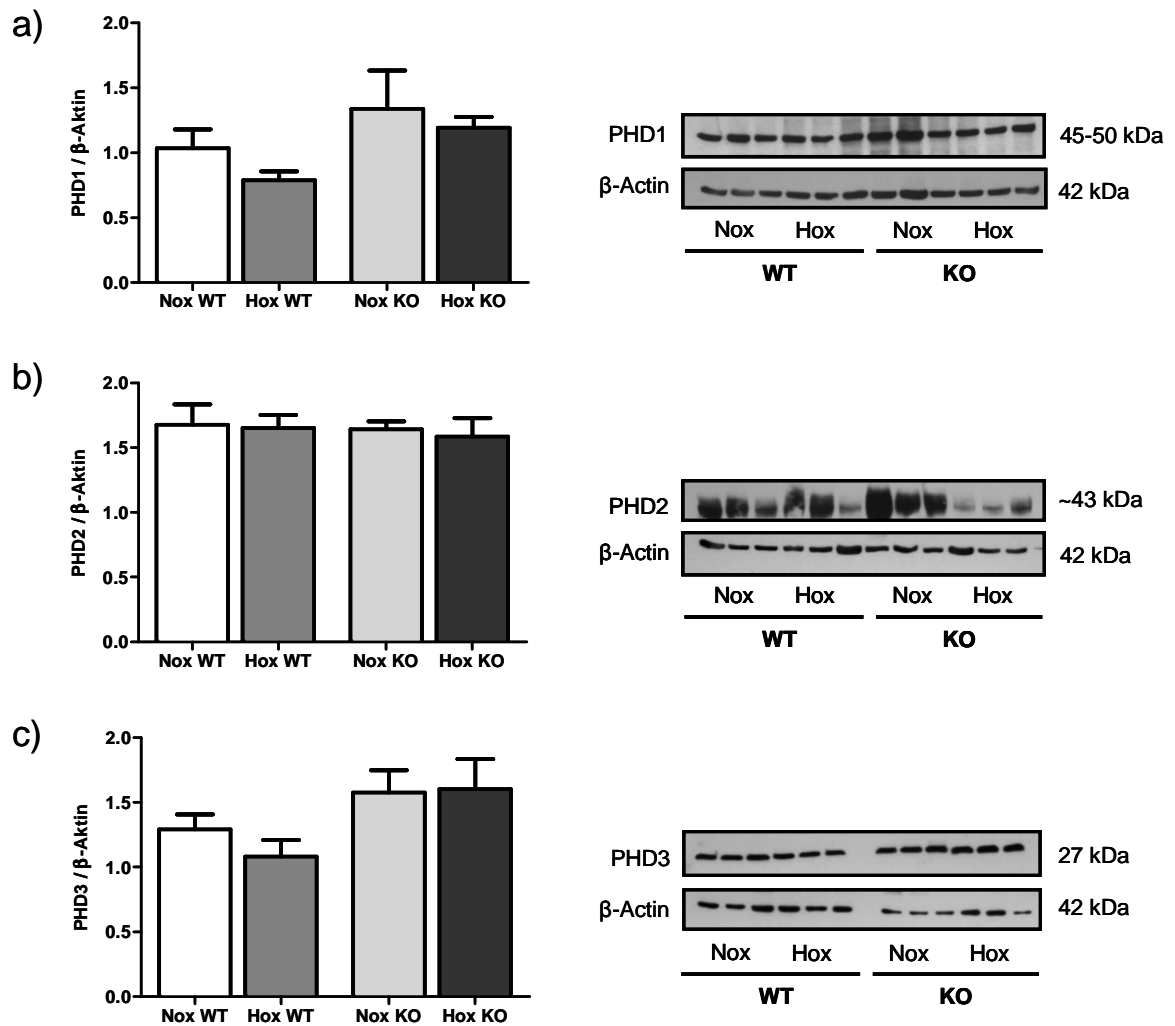


Abbildung 3.1.19: Darstellung der Proteinmenge der Prolyl-4-Hydroxylasen a) PHD1, b) PHD2 und c) PHD3 im Lungenhomogenat der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (n-Anzahlen: a) und c) n=9, b) n=6). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

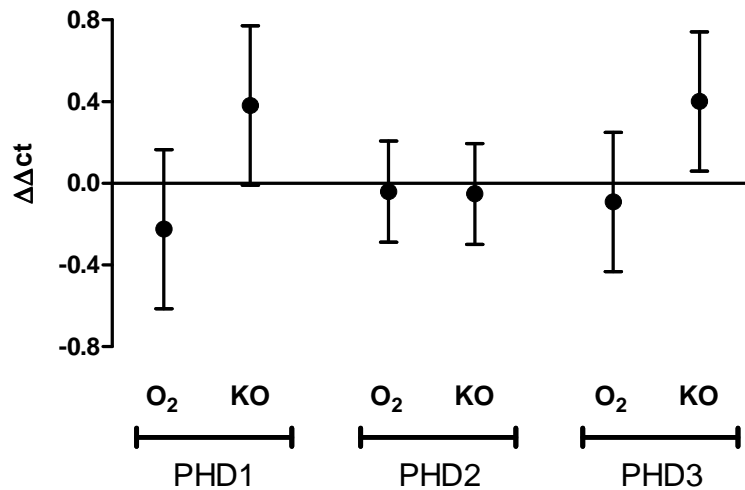


Abbildung 3.1.20: Effektstärken von Sauerstoffgehalt und knockout für die Expression der Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 im Lungenhomogenat der *Siah2* Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. MW mit 95% Konfidenzintervall. (n-Anzahlen: a) und c) n=9, b) n=6). O₂ = Sauerstoffgehalt, KO = *siah2*^{-/-}.

Die Westernblotanalysen von PHD1 und PHD2 im Homogenat des rechten Ventrikels werden in Abb 3.1.21 und 3.1.22 grafisch dargestellt. Keiner der beiden untersuchten Effekte „Sauerstoffgehalt“ und „knockout“ von *siah2* hatte eine nachweisbare Auswirkung auf die Proteinmenge von PHD1. Der Effekt „knockout“ von *siah2* hatte weiterhin keinen feststellbaren Einfluss auf den Proteingehalt von PHD2 im Homogenat des rechten Ventrikels, während das Absinken des Sauerstoffgehaltes zu einem signifikanten Anstieg der PHD2-Proteinmenge führte (Abb 3.1.21). Die Expression von PHD3 konnte im Homogenat des rechten Ventrikels im Hypoxiemodell bedauerlicherweise nicht untersucht werden, da sich in den Westernblotanalysen keine Banden zeigten.

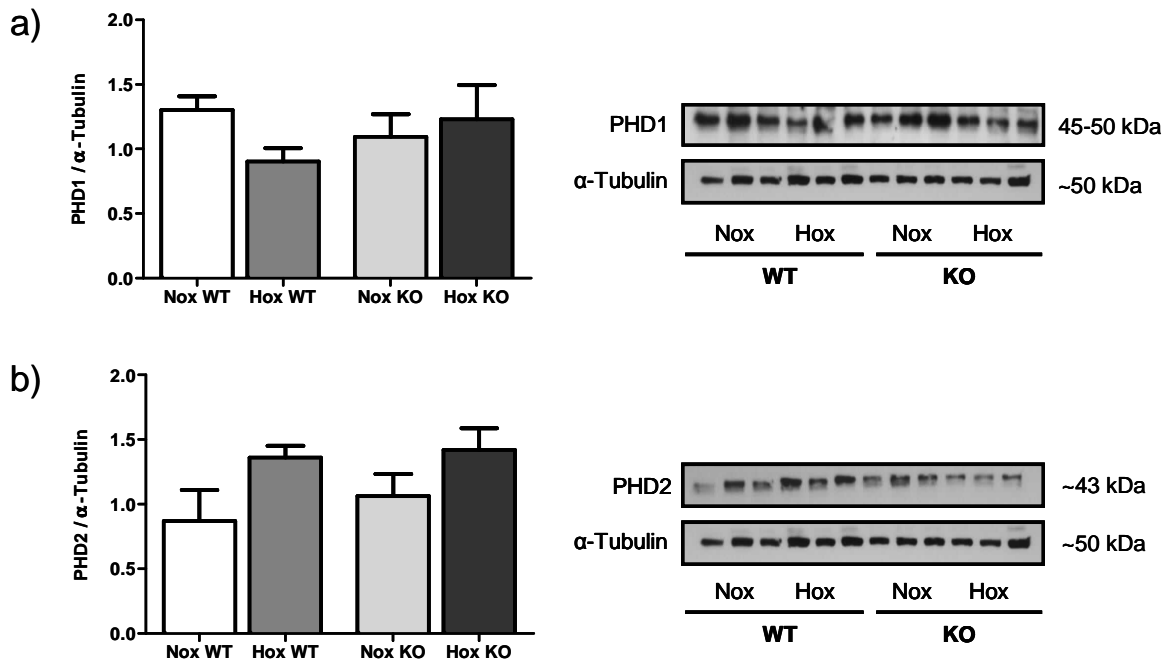


Abbildung 3.1.21: Darstellung der Proteinmenge der Prolyl-4-Hydroxylasen a) PHD1 und b) PHD2 im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (n-Anzahlen: a) n=6, b) Nox WT n=7, andere n=9). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

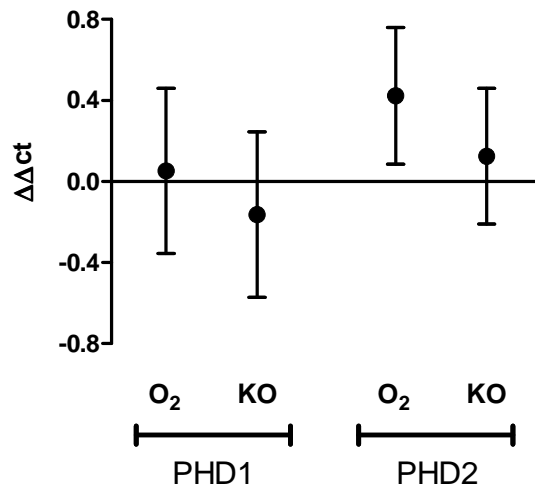


Abbildung 3.1.22: Effektstärken von Sauerstoffgehalt und knockout für die Expression der Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1 und PHD2 im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. MW mit 95% Konfidenzintervall. (n-Anzahlen: a) und c) n=9, b) n=6). O₂ = Sauerstoffgehalt, KO = *siah2*^{-/-}.

3.1.10.3 Proteinexpression von vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in der Lunge und im rechten Ventrikel

Auf der Suche nach einem downstream-Zielprotein von Siah2, das für die abweichende Reaktion der Siah2KO Mäuse im Hypoxiemodell verantwortlich gemacht werden könnte, rückte VEGFA in den Fokus der Untersuchungen. Aus der Literatur ist bekannt, dass VEGFA im Rahmen der Entstehung der pulmonalen Hypertonie eine wichtige Funktion in der Lunge besitzt (Christou et al., 1998; Hänze et al., 2007; Tuder et al., 1995; Tuder and Yun, 2008). Weiterhin ist publiziert, dass VEGFA eine Rolle im Rahmen der Anpassungsmechanismen des Herzens im myokardialen Infarktmodell und im Modell der transaortalen Konstriktion spielt (Carmeliet et al., 1999; Izumiya et al., 2006; Kajdaniuk et al., 2011b; Madonna and De Caterina, 2009).

Die Proteinexpression in der Lunge und im rechten Ventrikel der Siah2 Gruppe wurde mittels ELISA-Verfahren in Gewebehomogenat untersucht. Das Lungenhomogenat von normoxischen Siah2 WT Tieren enthielt durchschnittlich $107,5 \pm 5,9$ pg/ μ l VEGFA und das der Siah2KO Tiere $107,1 \pm 13,5$ pg/ μ l VEGFA. Die mittleren VEGFA-Proteingehalte der Hypoxie-exponierten Mäuse betragen bei Siah2WT $108,7 \pm 11,5$ pg/ μ l und bei Siah2KO Tieren $89,2 \pm 8,0$ pg/ μ l. Keiner der beiden Effekte „Sauerstoffgehalt“ und „knockout“ zeigte einen statistisch abgesicherten Einfluss auf die Expression von VEGFA (Abb. 3.1.23).

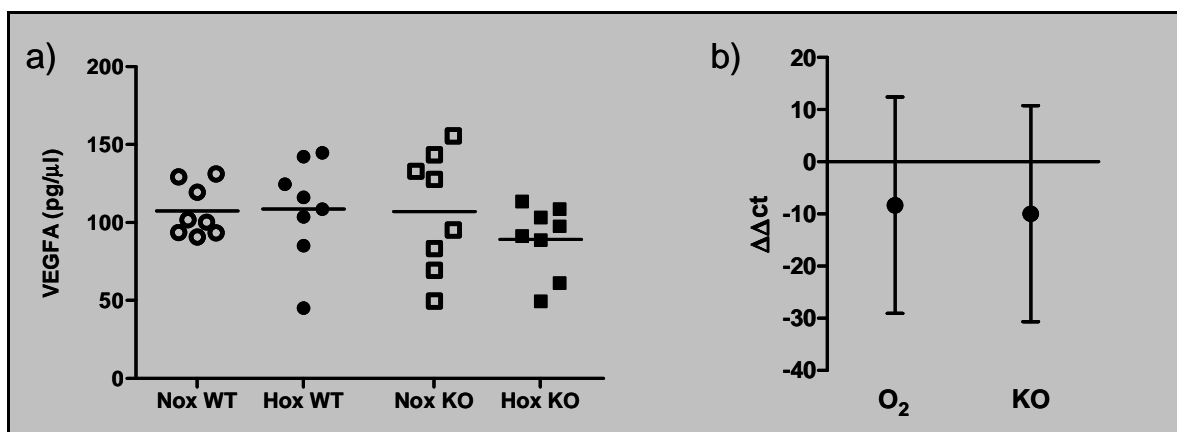


Abbildung 3.1.23: a) Darstellung der immunreaktiven VEGFA-Proteinmenge im Lungenhomogenat der Siah2 Gruppe (n=8) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Querbalken = Mittelwert. b) Effektstärke von Sauerstoffgehalt und knockout für die immunreaktive VEGFA-Proteinmenge im Lungenhomogenat. MW mit 95% Konfidenzintervall. O₂ = Sauerstoffgehalt, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

Das Homogenat des rechten Ventrikels enthielt ebenfalls bei allen Gruppen vergleichbare VEGFA-Proteinmengen (normoxische Siah2WT Mäuse: $56,4 \pm 4,8$ pg/ μ l, Siah2KO Tiere: $58,9 \pm 7,8$ pg/ μ l, Hypoxie-exponierte Siah2WT Mäuse: $53,7 \pm 3,4$ pg/ μ l und Siah2KO Tiere: $50,1 \pm 3,1$ pg/ μ l). Weder der Effekt „Sauerstoffgehalt“ noch der Effekt „knockout“ hatten eine konklusive Auswirkung auf die Regulation von VEGFA (Abb. 3.1.24).

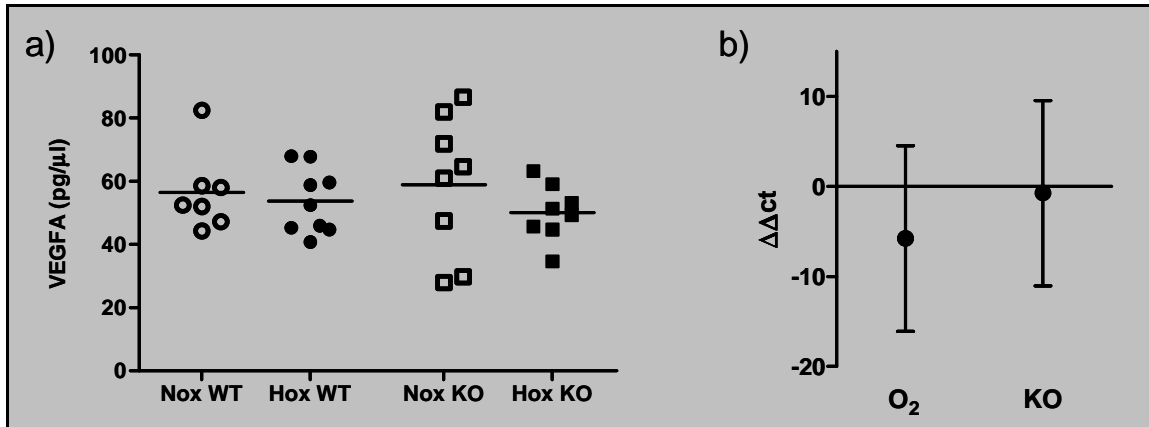


Abbildung 3.1.24: a) Darstellung der immunreaktiven VEGFA-Proteinmenge im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe (Nox WT n=7, Hox WT n=9, Nox/Hox KO n=8) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Querbalken = Mittelwert. b) Effektstärke von Sauerstoffgehalt und knockout für die immunreaktive VEGFA-Proteinmenge im Homogenat des rechten Ventrikels. MW mit 95% Konfidenzintervall. O₂ = Sauerstoffgehalt, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

Sowohl im Homogenat der Lungenproben als auch in dem des rechten Ventrikels fielen hohe individuelle Abweichungen hinsichtlich der VEGFA-Expression auf.

3.1.10.4 Genexpression von vascular endothelial growth factor a, vegf-rezeptor 1 und vegf-rezeptor 2 in der Lunge und im rechten Ventrikel

Um die Ergebnisse der ELISAs zu komplettieren, wurden RT-PCR Analysen von DNA aus Lungen und rechtem Ventrikel der Siah2 Gruppe durchgeführt. Es wurde die Genexpression von *vegfa* und seiner beiden Rezeptoren, *vegfr1* und *vegfr2*, mittels RT-PCR Analysen in der Lunge und im rechten Ventrikel der Siah2 Gruppe untersucht.

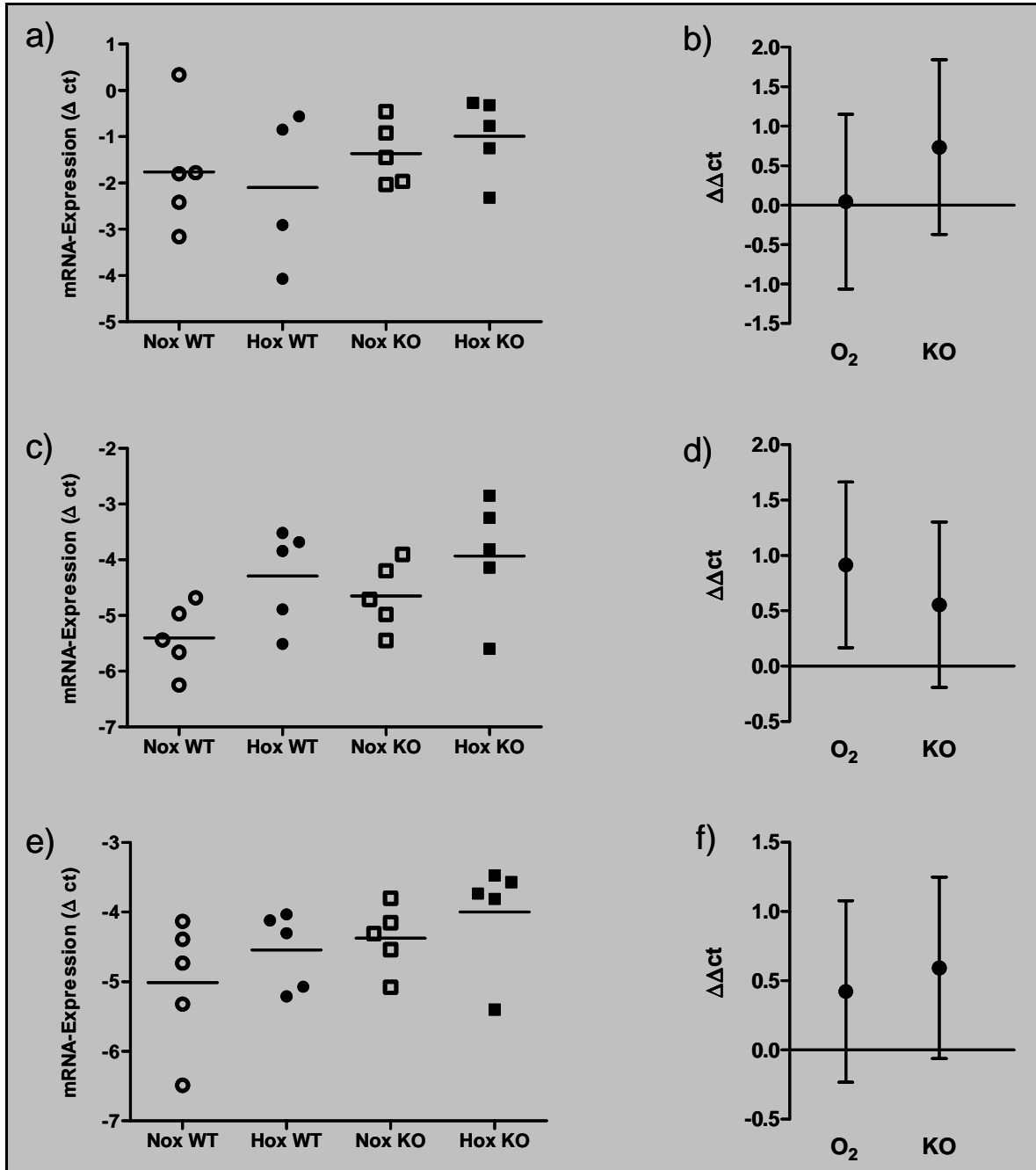


Abbildung 3.1.25: Darstellung der a) *vegfa*, c) *vegf-rezeptor 1* und e) *vegf-rezeptor 2* Genexpression im Lungenhomogenat der *Siah2* Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Δct = cycle threshold, Querbalken = Mittelwert. (n-Anzahlen: a) Hox WT n=4, andere n=5, b) und c) n=5). Effektstärken von Sauerstoffgehalt und knockout für die Expression von b) *vegfa*, d) *vegf-rezeptor 1* und f) *vegf-rezeptor 2*. MW mit 95% Konfidenzintervall. O₂ = Sauerstoffgehalt, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

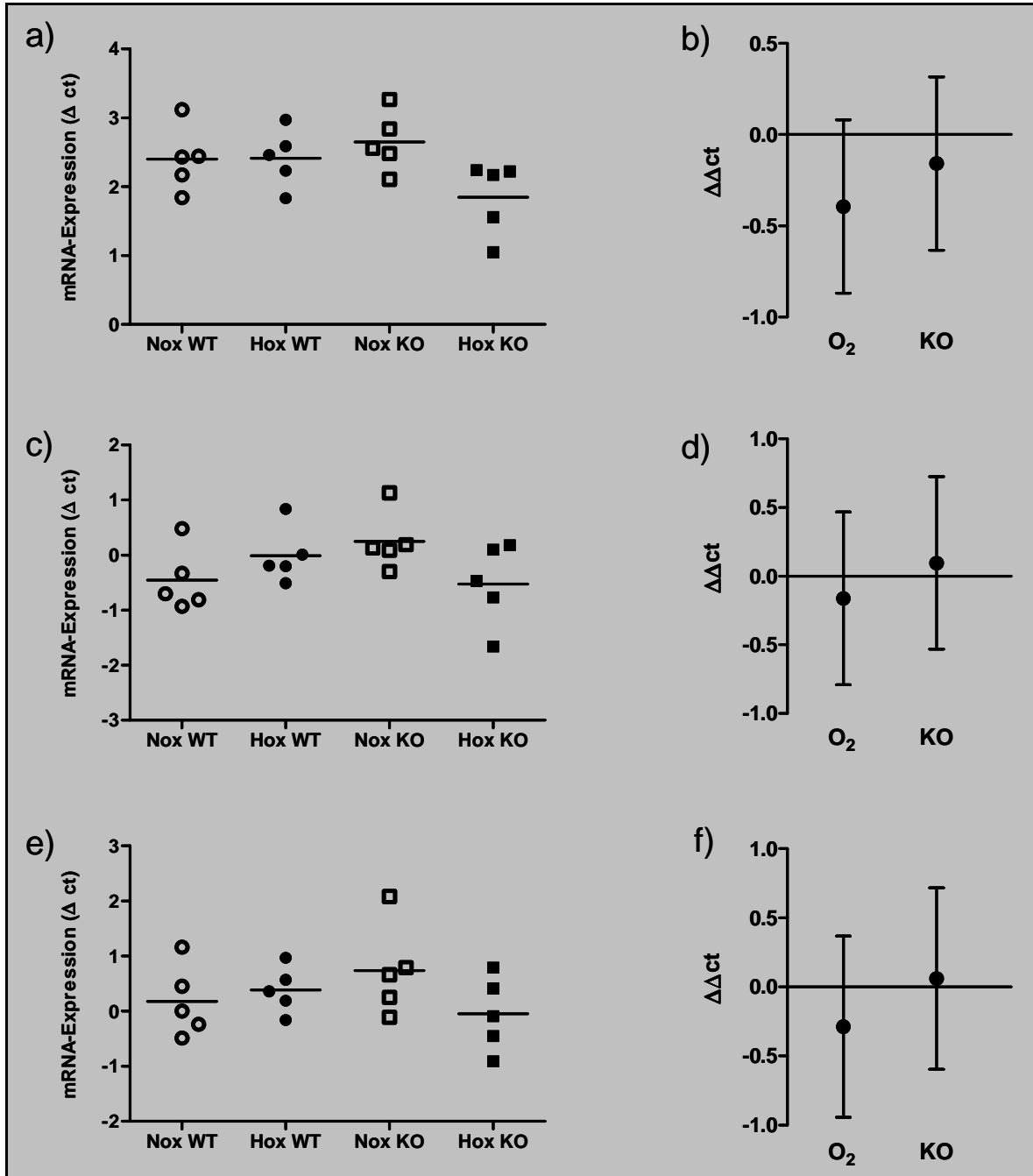


Abbildung 3.1.26: Darstellung der a) *vegfa*, b) *vegf-rezeptor 1* und c) *vegf-rezeptor 2* Genexpression im Homogenat des rechten Ventrikels der *Siah2* Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Δct = cycle threshold, Querbalken = Mittelwert. (n-Anzahl n=5). Effektstärken von Sauerstoffgehalt und knockout für die Expression von b) *vegfa*, d) *vegf-rezeptor 1* und f) *vegf-rezeptor 2*. MW mit 95% Konfidenzintervall. O₂ = Sauerstoffgehalt, Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

In der Lunge der Siah2 Hypoxiegruppe hatte der Effekt „knockout“ keinen erkennbaren Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene. Die Absenkung des Sauerstoffgehaltes führte zu einem Anstieg der Expression des *vegfr1*; hatte allerdings keinen ersichtlichen Effekt auf die Expression von *vegfa* und *vegfr2* (Abb 3.1.25).

Die Untersuchung der Effektstärken der Effekte „Sauerstoffgehalt“ und „knockout“ im rechten Ventrikel der Siah2 Hypoxiegruppe ergab keine nachweisbaren Auswirkungen auf die Expression von *vegfa* und seinen beiden Rezeptoren *vegfr1* und *vegfr2* (Abb. 3.1.26).

3.2 Siah2 Mäuse im Modell des pulmonalarteriellen „banding“

Das Modell des pulmonalarteriellen „banding“ wurde verwendet, um eine von der pulmonalen Gefäßstrombahn unabhängige rechtsventrikuläre Hypertrophie zu erzeugen und zu untersuchen.

Alle Daten sind angegeben als MW \pm SEM. Eine Ausnahme bilden die Daten der RT-PCR und ELISA Analysen, die als Einzelwerte mit MW dargestellt sind. Der Stichprobenumfang betrug (soweit nicht anders angegeben) für Siah2WT sham n=10, Siah2WT PAB n=15, Siah2KO sham n=8, Siah2KO PAB n=15. Die Analyse der Daten erfolgte wie unter 2.2.11 angegeben.

3.2.1 Auswirkungen des pulmonalarteriellen „banding“

Die Tiere waren zehn bis fünfzehn Minuten nach den operativen Eingriffen wieder bei vollem Bewußtsein, liefen durch den Käfig und begannen sich zu putzen. Sie wurden für weitere 3-5 Tage, je nach individuellem Allgemeinzustand, analgetisch versorgt. Einen Tag *post operationem* war das Fell am Kopf noch etwas durch die *intra operationem* aufgetragene Augensalbe verklebt, am zweiten Tag war das Haarkleid völlig sauber. Die Mäuse zeigten ab dem ersten Tag *post operationem* ein ungestörtes Allgemeinbefinden, eine normale Futter- und Wasseraufnahme, sowie ein physiologisches Putz- und Sozialverhalten. Die Gewichtsentwicklung wird aufgrund stark differierender Ausgangsgewichte der einzelnen Tiere (Siah2WT 19,0 – 31,5 g, Siah2KO 21,0 – 31,5 g) in Prozent zum jeweiligen AG angegeben. „Banding“-operierte Siah2WT und KO Mäuse zeigten am ersten Tag *post operationem* eine durchschnittliche Gewichtsreduktion von $8,8 \pm 0,6$ %. Die „sham“-operierten Kontrollen wiesen niedrigere Gewichtsabnahmen von $5,7 \pm 0,6$ % bei Siah2WT und $5,5 \pm 0,5$ % bei Siah2KO Mäusen auf. Bereits ab dem zweiten Tag *post operationem* begannen alle Tiere wieder zuzunehmen. „Banding“-operierte Siah2WT Mäuse erreichten ihr durchschnittliches Ausgangsgewicht nach 10 Tagen und Siah2KO Tiere nach 12 Tagen, während „sham“-operierte Siah2WT bereits nach 7 Tagen und Siah2KO Mäuse nach 8 Tagen 100% ihres anfänglichen Gewichts aufwiesen. Am Versuchsende besaßen „banding“-operierte Siah2WT Mäuse durchschnittlich $104,4 \pm 0,8$ % und Siah2KO Mäuse $103,9 \pm 0,9$ % ihres Ausgangsgewichtes. „Sham“-operierte Siah2WT Kontrolltiere wogen nach drei Wochen $106,8 \pm 1,9$ % und Siah2KO Kontrollen $105,9 \pm 1,1$ % des Ursprungsgewichtes (Abb. 3.2.1).

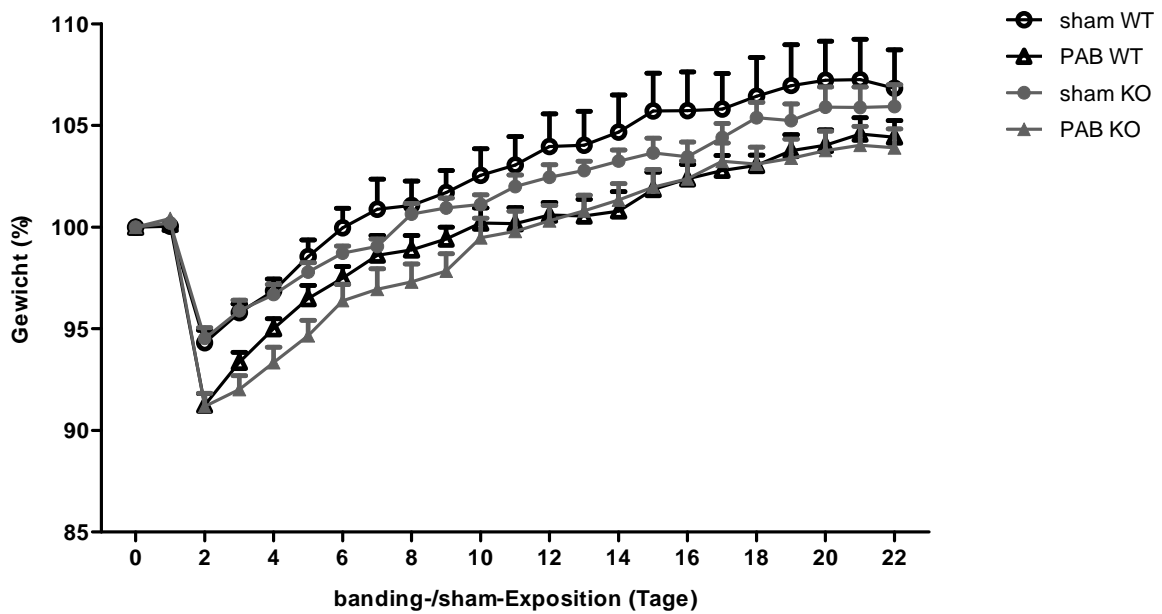


Abbildung 3.2.1: Darstellung des prozentualen Gewichtsverlaufes der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

Zur Charakterisierung der physiologischen Reaktion auf die Drucküberladung des rechten Ventrikels wurden der systolische arterielle und rechtsventrikuläre Druck am Versuchsende gemessen. Anschließend wurden zur Bestimmung des Ausmaßes der Rechtsherzhypertrophie die Ratios von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* und rechtem Ventrikel zum Körpergewicht bestimmt.

3.2.2 Systolischer arterieller Druck

Der SAP betrug drei Wochen *post operationem* $81,0 \pm 4,0$ mmHg bei „sham“-operierten Siah2WT Mäusen und $82,6 \pm 4,2$ mmHg bei Siah2KO Tieren. Pulmonalarteriell „banding“-operierte Siah2WT zeigten einen SAP von $84,6 \pm 4,1$ mmHg und Siah2KO Mäuse einen SAP von $85,3 \pm 3,6$ mmHg. Somit traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den SAP der einzelnen Gruppen auf (Abb. 3.2.2).

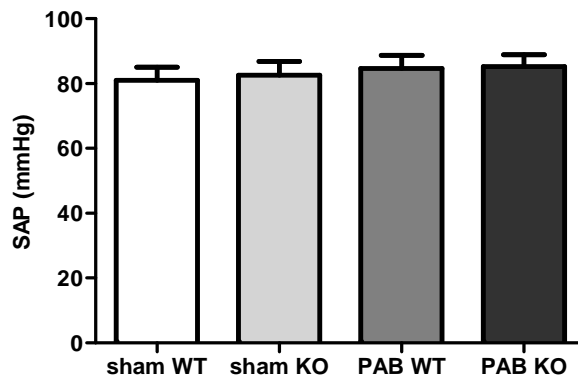


Abbildung 3.2.2: Darstellung des systolischen arteriellen Druckes (SAP) der Siah2 Gruppe (sham KO n=8, andere n=10) im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.3 Rechtsventrikulärer systolischer Druck

Drei Wochen *post operationem* betrug der RVSP der scheinoperierten Siah2WT Mäuse $24,9 \pm 1,3$ mmHg und der RVSP der Siah2KO Tiere $25,1 \pm 1,3$ mmHg. „Banding“-operierte KO sowie WT Mäuse zeigten mehr als doppelt so hohe rechtsventrikuläre Drücke mit Werten von $51,1 \pm 3,2$ mmHg bei Siah2WT und $51,0 \pm 3,0$ mmHg bei Siah2KO Tieren (Abb. 3.2.3).

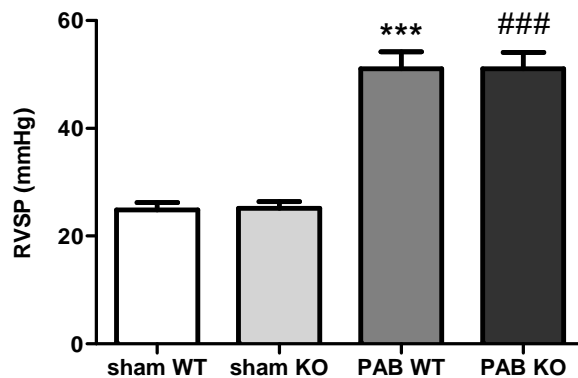


Abbildung 3.2.3: Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) der Siah2 Gruppe (sham KO n=8, andere n=10) im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.4 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus *Septum* als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Im Verlauf des pulmonalarteriellen „banding“ entwickelten sowohl WT als auch KO Mäuse aufgrund der erheblichen Druckbelastung eine starke Rechtsherzhypertrophie. Das Verhältnis des Nassgewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* (RV/(LV+S)) betrug bei „sham“-operierten Siah2WT ebenso wie bei „sham“-Siah2KO Mäusen $0,27 \pm 0,01$. PAB-Siah2WT zeigten eine Herzratio von $0,51 \pm 0,02$, während Siah2KO Tiere eine im Verhältnis zur PAB-Siah2WT Gruppe signifikant niedrigere ($p < 0,01$) Herzratio von $0,44 \pm 0,02$ aufwiesen (Abb. 3.2.4).

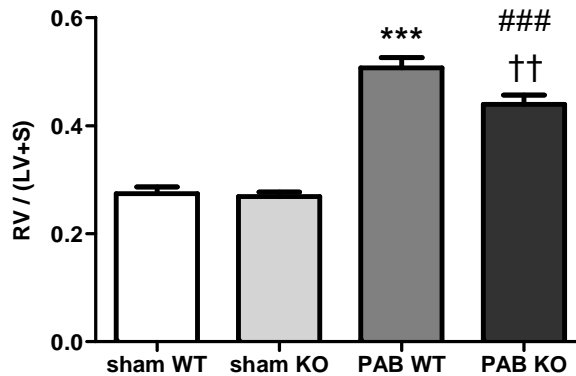


Abbildung 3.2.4: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* (RV/(LV+S)) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO, (††) $p < 0,01$ PAB WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.5 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Auch im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ wurde das Verhältnis des Gewichts des rechten Ventrikels zum Körpergewicht bestimmt, um auszuschließen, dass therapiebedingte Einflüsse auf die Größe des Herzens (wie der Verlust des Siah2 Proteins oder die Operation) den Grad der Hypertrophie verfälschen. Der so ermittelte Hypertrophiegrad stimmte auch bei dieser Versuchsgruppe mit dem durch die Herzratio ermittelten Ergebnis überein.

Scheinoperierte Siah2WT zeigten eine Ratio des rechten Ventrikels zum Körpergewicht von $0,77 \pm 0,03$ und Siah2KO Mäuse von $0,73 \pm 0,02$. Nach dreiwöchigem „banding“ betrug die Ratio bei Siah2WT $1,33 \pm 0,06$, während Siah2KO Tiere im Verhältnis dazu einen signifikant niedrigeren ($p < 0,05$) Wert von $1,21 \pm 0,04$ aufwiesen. Die Werte beider PAB-Tiergruppen erwiesen sich als hoch signifikant gegenüber denjenigen der Sham-Gruppen erhöht ($p < 0,001$) (Abb. 3.2.5).

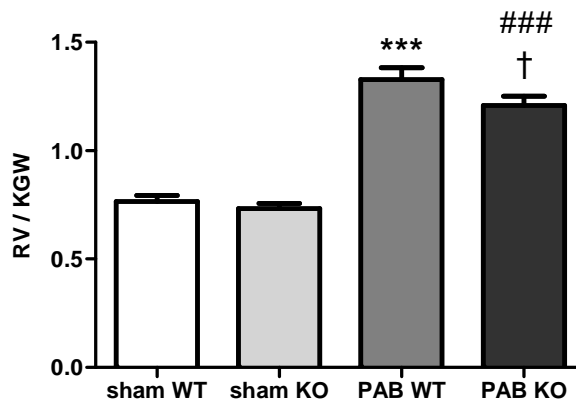


Abbildung 3.2.5: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht (RV/KGW) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO, (†) $p < 0,05$ PAB WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.6 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem *Atrium* und Körpergewicht als Maß des Rechtsherzversagens

Im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ wurde das Verhältnis des Geichts des rechten *Atrium* zum Körpergewicht bestimmt. Eine Gewichtszunahme des rechten Vorhofes dient als Indikator für eine Dekompensation des rechten Ventrikels. Ein Rückstau in der rechten Herzkammer und eine folgende Insuffizienz der Atrioventrikularklappe führen zu einer vermehrten Druckbelastung des *Atrium* mit resultierender Dilatation und Hypertrophie.

„Sham“-Siah2WT Mäuse zeigten eine Ratio des rechten Vorhofes zum Körpergewicht von $0,12 \pm 0,01$ und Siah2KO Mäuse von $0,11 \pm 0,01$. Nach drei-wöchigem „banding“ betrug die Ratio bei Siah2WT $0,28 \pm 0,02$, während Siah2KO Tiere einen dazu signifikant niedrigeren Wert ($p < 0,05$) von $0,23 \pm 0,01$ aufwiesen (Abb. 3.2.6).

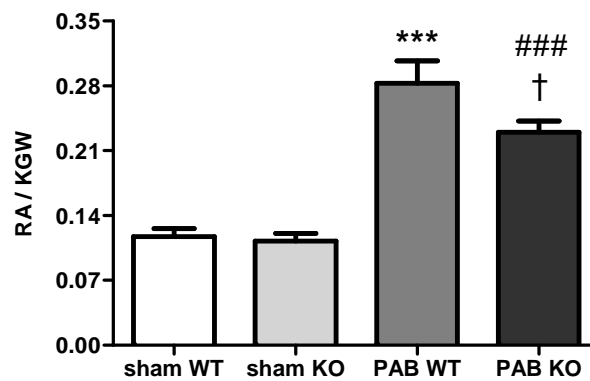


Abbildung 3.2.6: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem *Atrium* zum Körpergewicht (RA/KGW) der *Siah2* Gruppe im Modell des pulmonalerteriellen „banding“. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO, (†) $p < 0,05$ PAB WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalerteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.7 Echokardiografische Untersuchungen

Auch im Modell des pulmonalerteriellen „banding“ wurden zur Analyse des kardialen Remodeling und der rechtsventrikulären Funktion echokardiografische Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov durchgeführt.

3.2.7.1 Rechter Ventrikel und rechtes Atrium

„Banding“-operierte Mäuse beider Linien zeigten im Vergleich zu ihren jeweiligen „sham“-Kontrollen eine hoch signifikante ($p < 0,001$) Zunahme der rechtsventrikulären Wanddicke (Abb. 3.2.7, Tab. 3.2.1).

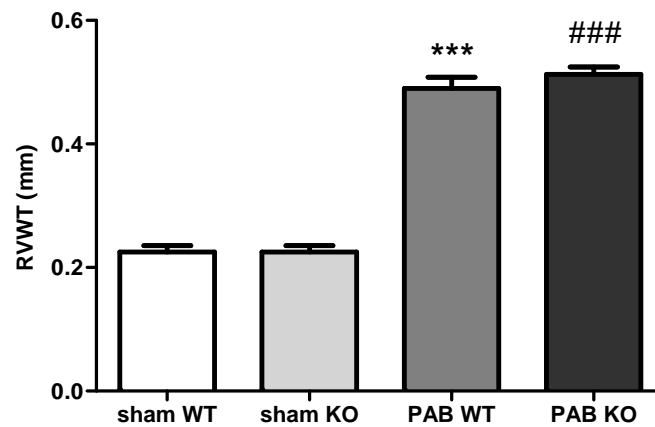


Abbildung 3.2.7: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT, right ventricular wall thickness) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Sham WT/KO n=4, PAB WT n=8, PAB KO n=7. Endpunktmessung nach 3 Wochen. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

Weiterhin wiesen „banding“-operierte Siah2WT und KO Mäuse im Vergleich zu ihren jeweiligen „sham“-operierten Kontrollen einen hoch signifikanten Anstieg des rechtsventrikulären Durchmessers auf (Abb. 3.2.8, Tab. 3.2.1).

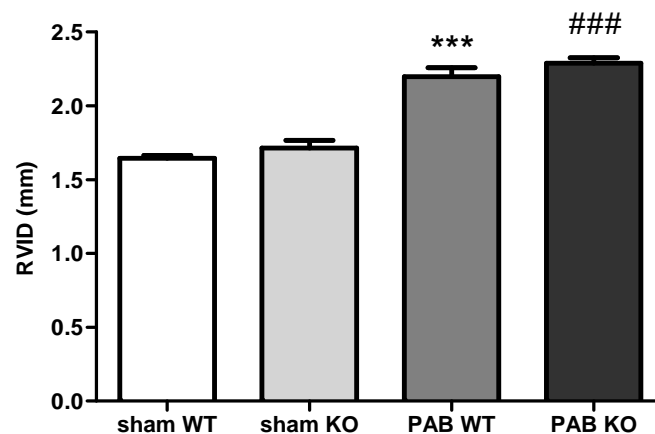


Abbildung 3.2.8: Rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID, right ventricular internal diameter) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Sham WT/KO n=4, PAB WT n=9, PAB KO n=8. Endpunktmessung nach 3 Wochen. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

Am Ende des Versuchszeitraumes zeigten „banding“-operierte Siah2WT sowie Siah2KO Mäuse einen vergrößerten rechten Vorhof. Die rechtsatriale Querschnittsfläche war bei Siah2WT signifikant größer ($p < 0,01$) als bei Siah2KO Tieren (Abb. 3.2.9, Tab. 3.2.1).

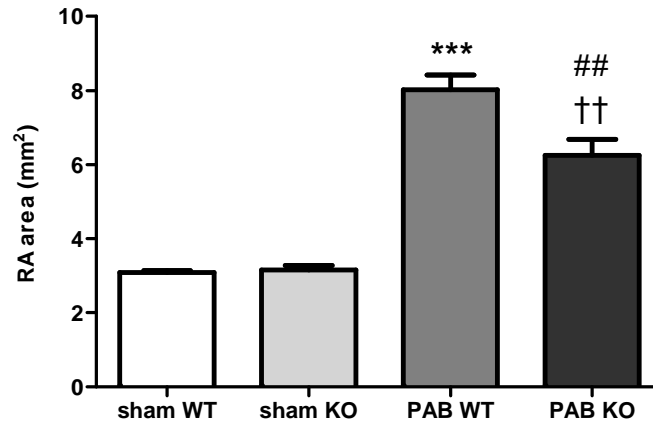


Abbildung 3.2.9: Enddiastolische Querschnittsfläche des rechten *Atrium* (RA area, right atrial area) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Sham WT/KO n=5, PAB WT n=9, PAB KO n=4. Endpunktmessung nach 3 Wochen. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, (##) $p < 0,01$ sham KO vs. PAB KO, (††) $p < 0,01$ PAB WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

In der folgenden Tabelle sind die Messwerte noch einmal detailliert aufgeführt:

3 Wochen	Siah2WT sham			Siah2KO sham			Siah2WT PAB				Siah2KO PAB			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
RVWT (mm)	0,23	0,01	4	0,23	0,01	4	0,49	0,02	8	***	0,51	0,01	7	###
RVID (mm)	1,65	0,02	4	1,71	0,05	4	2,20	0,06	9	***	2,30	0,04	8	###
RA area (mm²)	3,09	0,05	5	3,16	0,11	5	8,02	0,41	9	***	6,25	0,43	4	††###

Tabelle 3.2.1: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT), rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID) und enddiastolische Querschnittsfläche des rechten *Atrium* (RA area) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Endpunktmessung nach 3 Wochen. (***) $p < 0,001$, sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO, (††) $p < 0,01$ PAB WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.7.2 Cardiac output

Sowohl Siah2WT als auch Siah2KO Mäuse zeigten nach dem pulmonalarteriellen „banding“ ein progredient fallendes Herzminutenvolumen. Der cardiac output (CO) der „banding“-operierten Siah2KO Tiere war tendenziell höher, jedoch statistisch nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zum CO der Siah2WT (Abb. 3.2.10, Tab. 3.2.2).

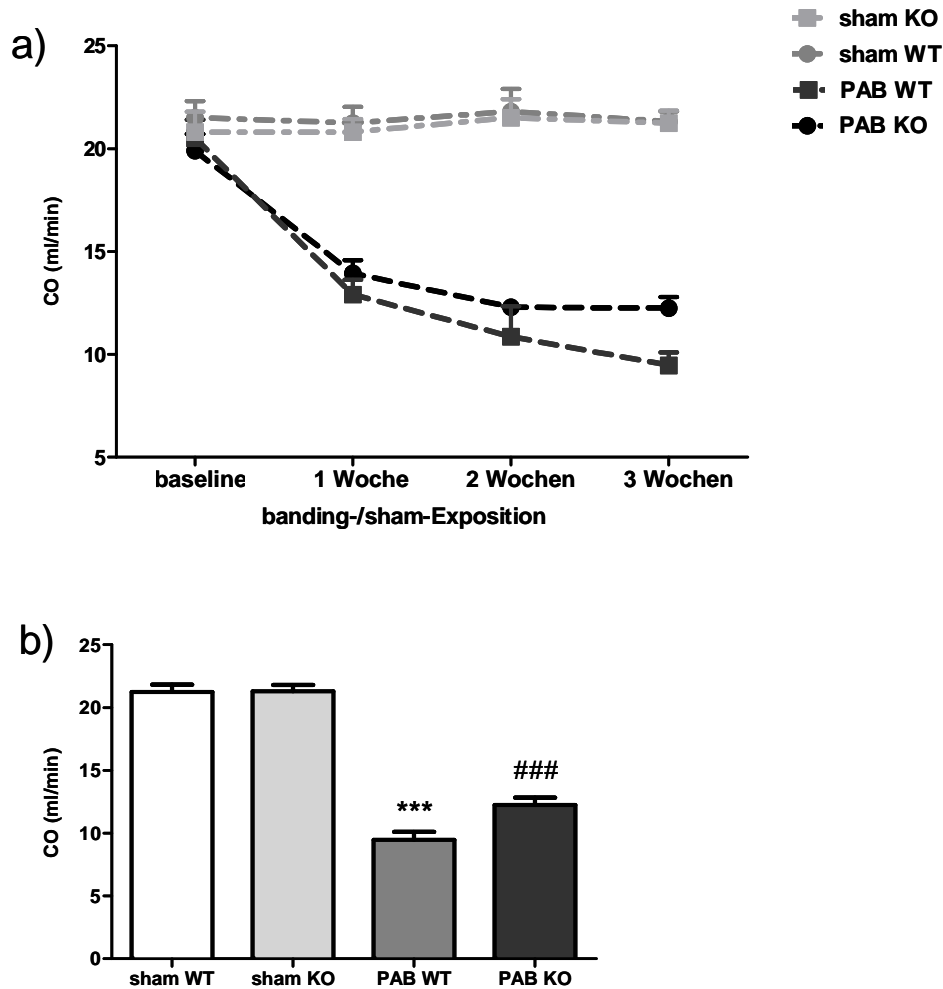


Abbildung 3.2.10: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ (PAB KO n=7, andere n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle aus Gründen der Übersicht wurde nur PAB WT vs. PAB KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.2.2 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 3 Wochen ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

CO (ml/min)	Siah2WT sham			Siah2KO sham			Siah2WT PAB				Siah2KO PAB			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	21,5	0,8	8	20,8	1,0	8	20,5	0,9	8		19,9	0,8	7	
1 Woche	21,2	0,8	8	20,8	0,6	8	12,9	0,7	8	***	13,9	0,6	7	###
2 Wochen	21,8	1,1	8	21,5	0,9	8	10,9	1,5	8	***	12,3	0,4	7	###
3 Wochen	21,3	0,5	8	21,2	0,6	8	9,5	0,6	8	***	12,2	0,6	7	###

Tabelle 3.2.2: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Verlaufskontrolle ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.7.3 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels

„Banding“-operierte Siah2WT sowie Siah2KO Mäuse zeigten eine Woche *post operationem* eine fortschreitend eingeschränkte systolische Funktion des rechten Ventrikels. Zum Versuchsende (nach drei Wochen) war die beide „banding“-Gruppen betreffende Funktionsminderung bei Siah2WT Tieren signifikant (p< 0,05) stärker ausgeprägt als bei Siah2KO Mäusen (Abb. 3.2.11, Tab. 3.2.3).

TAPSE (mm)	Siah2WT sham			Siah2KO sham			Siah2WT PAB				Siah2KO PAB			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	1,45	0,05	4	1,50	0,03	4	1,49	0,03	9		1,48	0,03	8	
1 Woche	1,43	0,03	4	1,52	0,03	4	1,01	0,04	9	***	1,09	0,01	8	###
2 Wochen	1,47	0,03	4	1,52	0,06	4	0,88	0,05	9	***	0,93	0,04	8	###
3 Wochen	1,47	0,04	4	1,45	0,02	4	0,80	0,03	9	***	0,93	0,05	8	† ###

Tabelle 3.2.3: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Verlaufskontrolle ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, †p<0,05 PAB WT vs. PAB KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

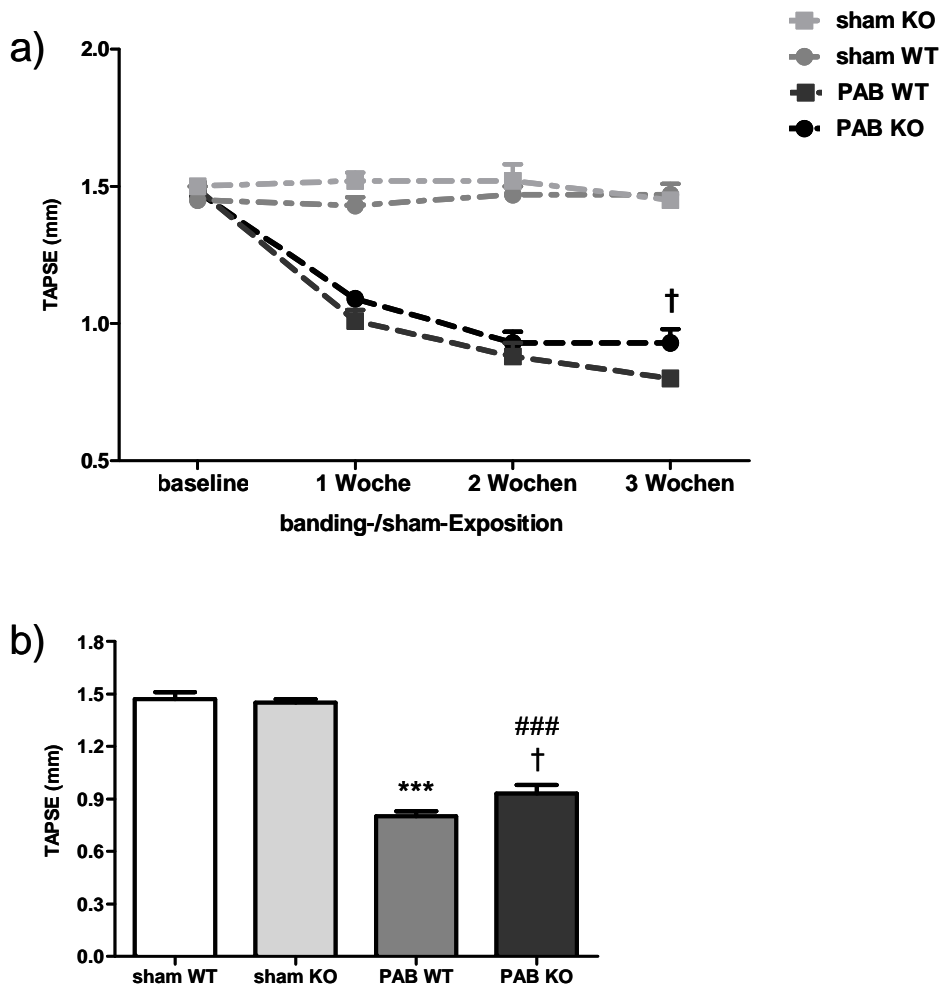


Abbildung 3.2.11: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ (sham WT/KO n=4, PAB WT n=9, PAB KO n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. **a) Verlaufskontrolle** †p<0,05 PAB WT vs. PAB KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur PAB WT vs. PAB KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.2.3 zu entnehmen. **b) Endpunktmessung** nach 3 Wochen ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, †p<0,05 PAB WT vs. PAB KO. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.7.4 IVRT/RR – diastolische Funktion des rechten Ventrikels

Die diastolische Funktion des rechten Ventrikels war eine und zwei Wochen *post operationem* bei „banding“-operierten Siah2WT und Siah2KO Mäusen in gleichem Maße herabgesetzt. Nach drei Wochen zeigten „banding“-operierte Siah2WT eine signifikant stärkere ($p < 0,05$) Funktionseinschränkung als Siah2KO Tiere (Abb. 3.2.12, Tab. 3.2.4).

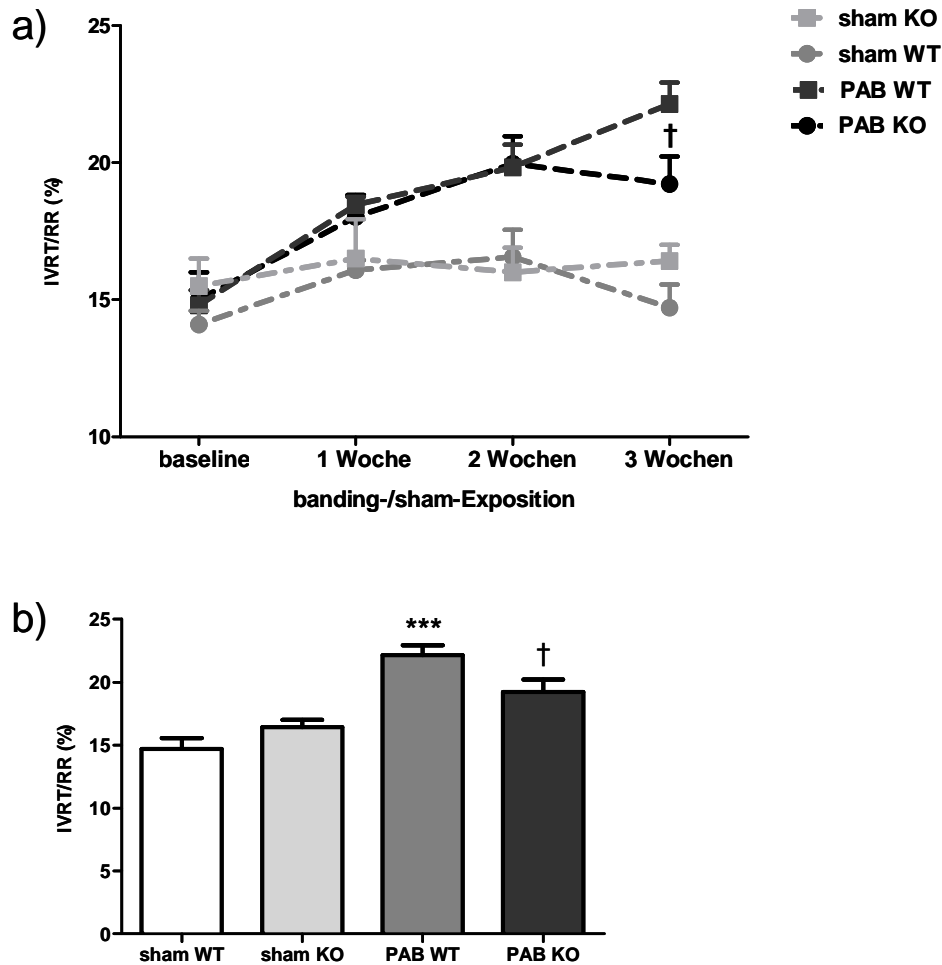


Abbildung 3.2.12: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ (sham WT/KO n=4, PAB WT n=9, PAB KO n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. **a) Verlaufskontrolle** † $p < 0,05$ PAB WT vs. PAB KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur PAB WT vs. PAB KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.2.4 zu entnehmen. **b) Endpunktmessung** nach 3 Wochen *** $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, † $p < 0,05$ PAB WT vs. PAB KO. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

IVRT/RR (%)	Siah2WT sham			Siah2KO sham			Siah2WT PAB			Siah2KO PAB				
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	14,1	0,5	4	15,5	1,0	4	14,8	0,6	9		15,0	1,0	8	
1 Woche	16,1	0,4	4	16,5	1,4	4	18,5	0,3	9		18,0	0,8	8	
2 Wochen	16,6	1,0	4	16,0	0,9	4	19,8	0,8	9		20,0	1,0	8	#
3 Wochen	14,7	0,9	4	16,4	0,6	4	22,1	0,8	9	***	19,2	1,0	8	†

Tabelle 3.2.4: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Verlaufskontrolle ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, #p<0,05 sham KO vs. PAB KO, †p<0,05 PAB WT vs. PAB KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.7.5 MPI – globale Funktion des rechten Ventrikels

Eine Woche *post operationem* wiesen „banding“-operierte Siah2WT und Siah2KO Mäuse gleichermaßen eine deutliche Verschlechterung der globalen Funktion des rechten Ventrikels auf. Am Versuchsende war diese die „banding“-Gruppen betreffende Funktionsminderung bei Siah2WT signifikant (p<0,001) stärker ausgeprägt als bei Siah2KO Tieren (Abb. 3.2.13, Tab. 3.2.5).

MPI	Siah2WT sham			Siah2KO sham			Siah2WT PAB			Siah2KO PAB				
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	0,68	0,05	4	0,68	0,04	4	0,68	0,05	9		0,65	0,03	8	
1 Woche	0,73	0,03	4	0,74	0,04	4	1,10	0,04	9	***	1,10	0,03	8	###
2 Wochen	0,65	0,03	4	0,79	0,03	4	1,41	0,03	9	***	1,36	0,03	8	###
3 Wochen	0,73	0,03	4	0,83	0,02	4	1,42	0,02	9	***	1,23	0,03	8	††† ###

Tabelle 3.2.5: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Verlaufskontrolle ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

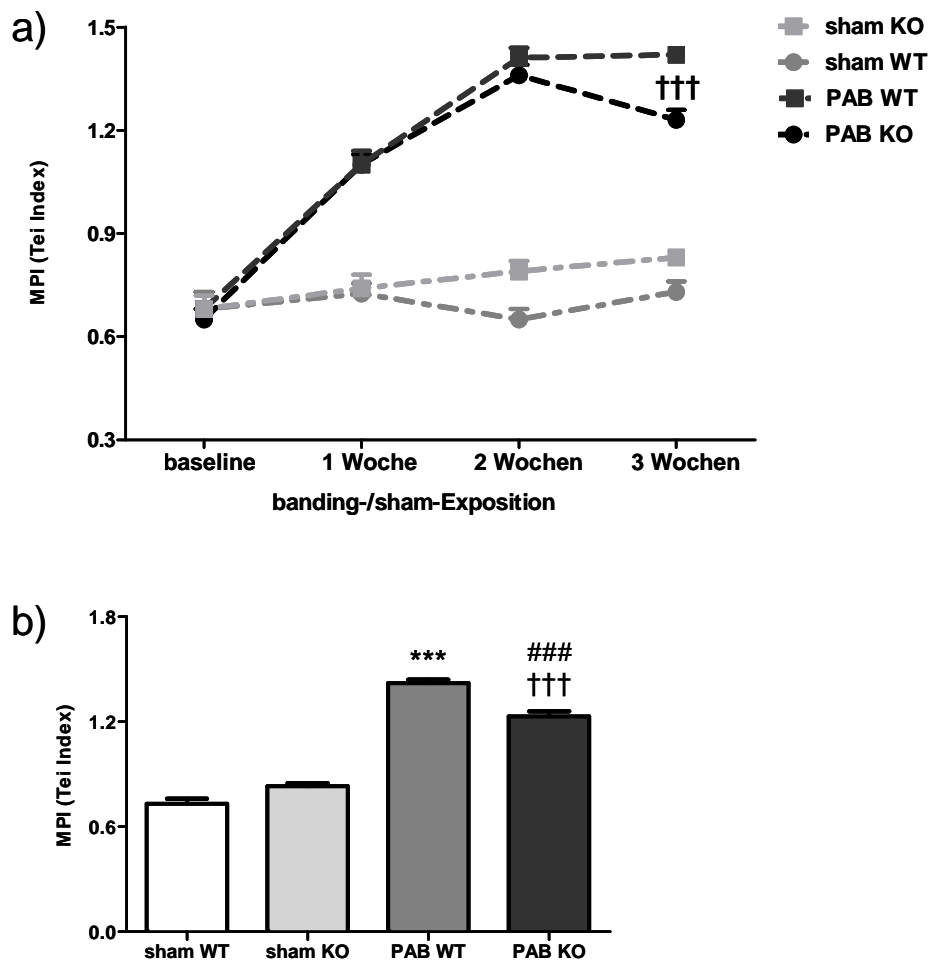


Abbildung 3.2.13: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ (sham WT/KO n=4, PAB WT n=9, PAB KO n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur PAB WT vs. PAB KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.2.5 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 3 Wochen ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.7.6 Zusammenfassung der echokardiografischen Befunde

Sowohl „banding“-operierte Siah2WT als auch Siah2KO Mäuse zeigten eine erhebliche Beeinträchtigung der globalen rechtsventrikulären Funktion mit Entwicklung einer starken Hypertrophie und Dilatation. Zum Zeitpunkt der letzten echokardiografischen Untersuchung war diese Funktionsminderung bei den Siah2WT signifikant stärker ausgeprägt als bei den Siah2KO Tieren.

3.2.8 Prozentualer Kollagenanteil des rechten Ventrikels

Zur Bestimmung des Grades einer rechtsventrikulären Fibrose wurde auch im „banding“-Modell der Anteil an Kollagenfasern bezogen auf die Gesamtfläche ermittelt. Drei Wochen *post operationem* zeigten „banding“-operierte Siah2WT sowie Siah2KO Tiere einen deutlichen Anstieg des Anteils an kollagenen Fasern und somit eine Fibrose des rechten Ventrikels. Der Kollagengehalt der PAB-Siah2WT Tiere lag dabei mit einem Wert von $8,72 \pm 0,11$ % signifikant höher als derjenige, der Siah2KO Tiere mit $5,40 \pm 0,64$ %. Die „sham“-operierten Tiere wiesen rechtsventrikuläre Kollagenanteile von nur $0,98 \pm 0,14$ % in der Siah2WT und $0,64 \pm 0,09$ % in der Siah2KO Gruppe auf (Abb. 3.2.14). In Abbildung 3.2.15 werden diese enormen Unterschiede zwischen „sham“- und „banding“-operierten Mäusen, sowie zwischen „banding“-operierten Siah2WT und Siah2KO Tieren noch einmal bildlich verdeutlicht.

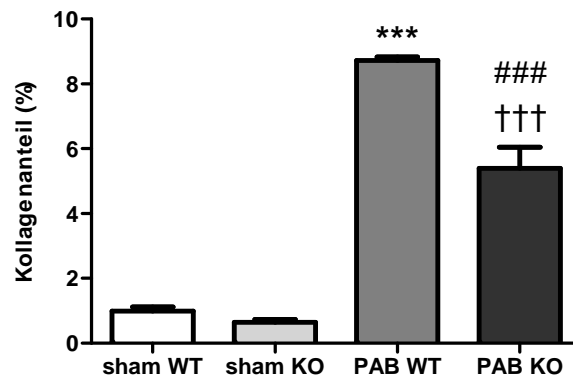


Abbildung 3.2.14: Darstellung des prozentualen Kollagenanteiles (%) des rechten Ventrikels der *Siah2* Gruppe (sham WT n=7, andere n=5) im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, ### $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO, ††† $p < 0,001$ PAB WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

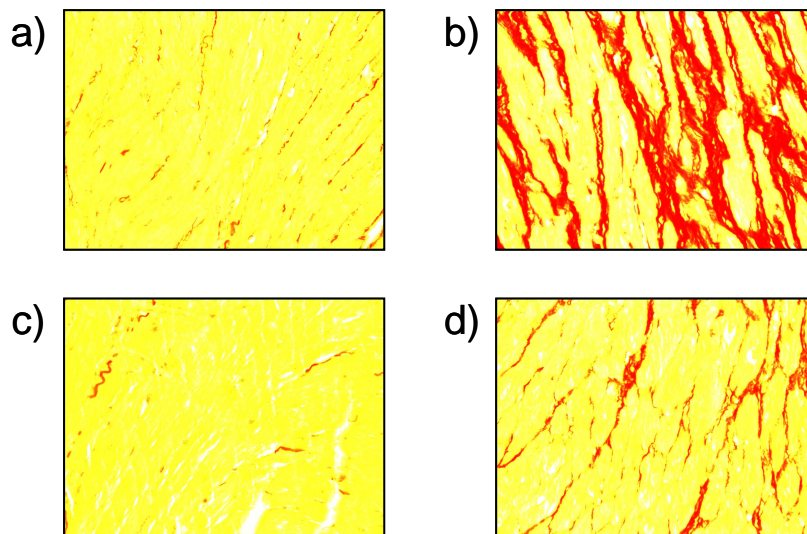


Abbildung 3.2.15: Histologischer Schnitt durch den rechten Ventrikel. Darstellung der kollagenen Fasern mit einer Sirius Red Färbung. a) sham WT, b) PAB WT, c) sham KO, d) PAB KO. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.9 Verhältnis der Anzahl der Kapillaren zur Anzahl der Kardiomyozyten im rechten Ventrikel

Das Verhältnis von Kapillaren zu Kardiomyozyten (Kap/KM) gibt Aufschluss über die Versorgungssituation des Herzmuskels. Je mehr Kapillaren pro Kardiomyozyt vorhanden sind, desto besser sind nutritive Versorgung und Oxygenierung. „Sham“-operierte Siah2WT Mäuse zeigten Werte von $0,96 \pm 0,02$ und Siah2KO „sham“-Kontrollen von $1,01 \pm 0,11$. Nach dreiwöchigem „banding“ wiesen Siah2WT Tiere einen Quotienten von $1,07 \pm 0,07$ und Siah2KO Tiere von $1,21 \pm 0,08$ auf. „Banding“-operierte Siah2KO und Siah2WT Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede in der kapillären Versorgung der Kardiomyozyten (Abb. 3.2.16).

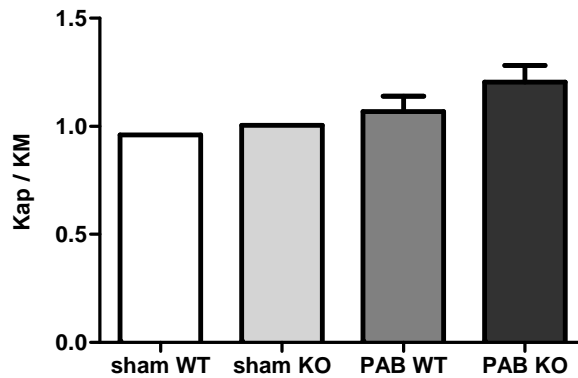


Abbildung 3.2.16: Darstellung des Verhältnisses von Kapillaren zu Kardiomyozyten (Kap/KM) im rechten Ventrikel der Siah2 Gruppe (sham WT/KO n=2, PAB WT n=5, PAB KO n=4) im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.10 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Auswertung der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen erfolgte durch die Analyse der differentiellen Expression der einzelnen Gene bzw. Proteine unter den Effekten „Operationsmethode“ und „knockout“ von *siah2*.

3.2.10.1 Genexpression von *siah2* und *siah1a/b* im rechten Ventrikel

Auch im „banding“-Modell wurde die Genexpression der Siah-Ubiquitinligasen durch RT-PCR Analysen untersucht. Das Vorkommen von *siah2* mRNA wurde im Homogenat der rechten Ventrikel der WT Mäuse gemessen. Die Expression von *siah1a/b* wurde im

Homogenat des rechten Ventrikels der WT und KO Tiere analysiert. Keiner der beiden untersuchten Effekte „Operationsmethode“ und „knockout“ hatte eine nachweisbare Auswirkung auf die Regulation der mRNA-Synthese der Siah-Ubiquitinligasen (Abb 3.2.17).

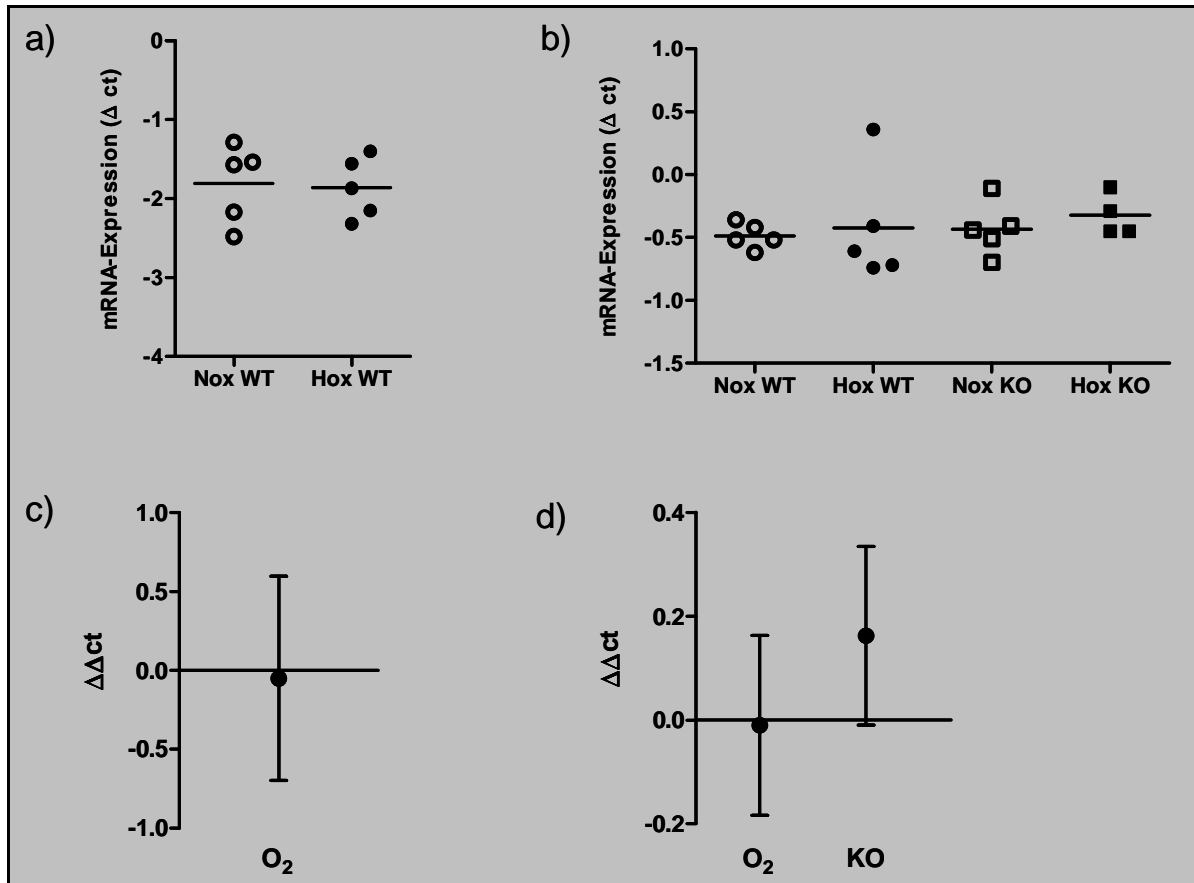


Abbildung 3.2.17: Darstellung der Genexpression a) von *siah2* im Homogenat des rechten Ventrikels von *Siah2*WT Mäusen und b) von *siah1a/b* in Homogenat des rechten Ventrikels der *Siah2*WT und KO Tiere im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Δct = cycle threshold, Querbalken = Mittelwert. (n-Anzahl: n=5). c) Effektstärke der Operationsmethode für die Expression von *siah2* im Homogenat des rechten Ventrikels von *Siah2*WT Mäusen. d) Effektstärke von Operationsmethode und knockout für die Expression von *siah1a/b* im Homogenat des rechten Ventrikels der *Siah2*WT und KO Tiere. MW mit 95% Konfidenzintervall. OP = Operationsmethode, sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.10.2 Proteinexpression der Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD)1, PHD2 und PHD3 im rechten Ventrikel

Die physiologischen und histologischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Siah2KO Mäuse anders als ihre WT-Kontrollen auf ein pulmonalarteriell „banding“ sowie auf hypoxische Bedingungen reagieren. HIF1 α repräsentiert ein Schlüsselprotein der Anpassungsmechanismen an Hypoxie, sowie bei vielen Reaktionskaskaden, die in der Folge eines pulmonalarteriellen „banding“ ablaufen (wie z. B. Vaskularisierung, Zellproliferation und –überleben). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist Siah2 an der Regulation der verfügbaren Menge von HIF1 α durch den Abbau von PHD1 und PHD3 maßgeblich beteiligt. Deshalb sollte auch im PAB-Modell untersucht werden, ob sich die Proteinmenge der Prolyl-4-Hydroxylasen verändert.

Die Proteinexpression der PHDs in den rechten Ventrikeln der Siah2 Gruppe wurde mittels Westernblotverfahren im Gewebehomogenat des rechten Ventrikels untersucht. Die Proteinmenge wurde bezogen auf α -Tubulin normalisiert. Da die Westernblotanalysen (aufgrund des hohen Stichprobenumfangs) auf mehreren Membranen durchgeführt wurden, erfolgte die Normalisierung der Einzelwerte nach der Formel: Einzelwert der Probe – Mittelwert der Membran + Gesamtmittelwert aller Membranen.

Die Westernblotanalysen von PHD1, PHD2 und PHD3 im rechten Ventrikel werden in Abb 3.2.18 und 3.2.19 grafisch dargestellt. Keiner der beiden untersuchten Effekte „Operationsmethode“ und „knockout“ von *siah2* hatte eine ersichtliche Wirkung auf die Proteinmengen von PHD1 und PHD2. Der Effekt „Operationsmethode“ hatte ebenfalls keinen nachweisbaren Einfluss auf die Regulation von PHD3 im Homogenat des rechten Ventrikels, während der knockout von *siah2* zu einem signifikanten Anstieg der PHD3-Proteinmenge führte (Abb 3.2.19).

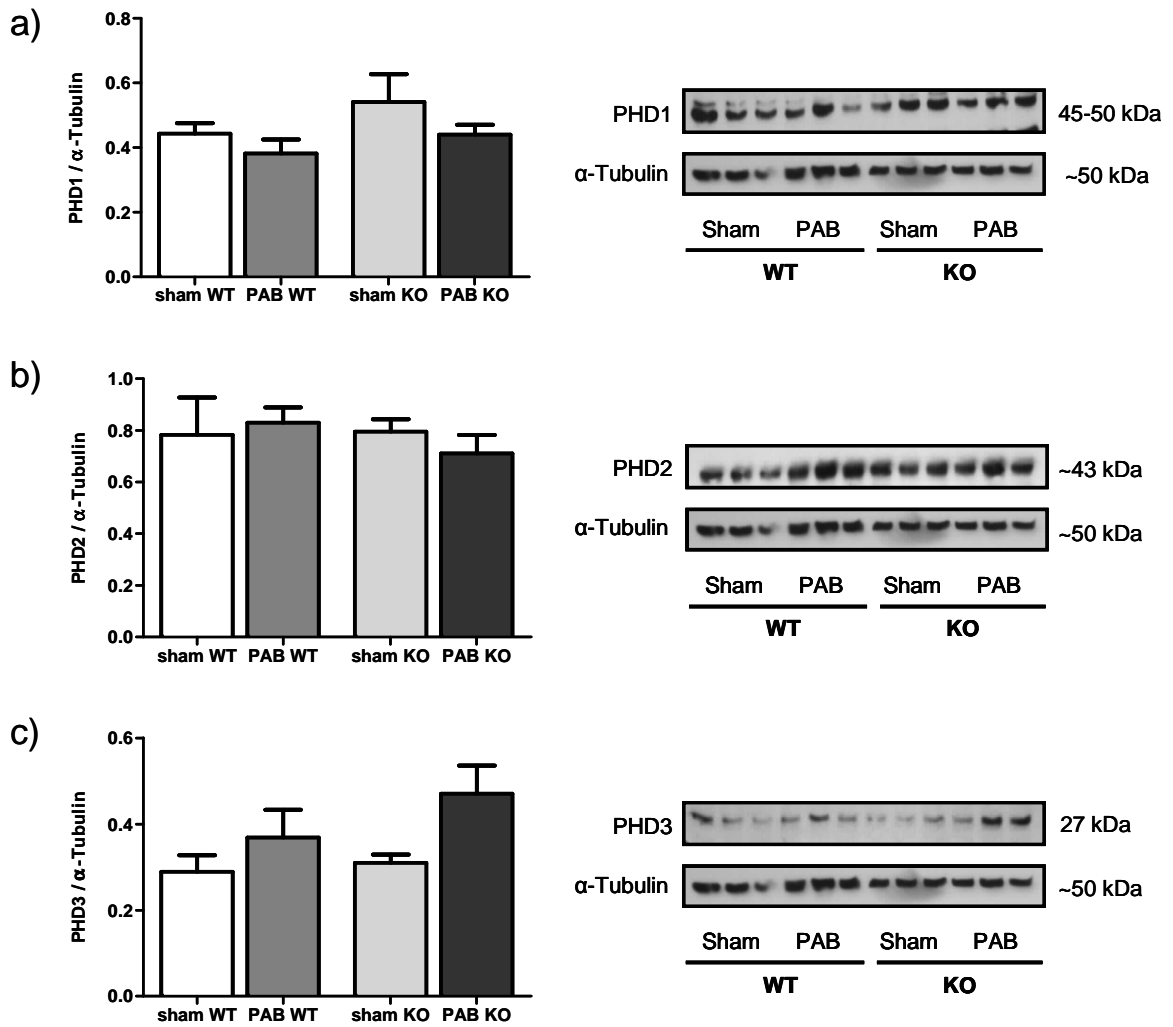


Abbildung 3.2.18: Darstellung der Proteinmenge der Prolyl-4-Hydroxylasen a) PHD1, b) PHD2 und c) PHD3 im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalerteriellen „banding“. (n-Anzahlen: a) n=6, b) sham KO n=8, andere n=9, c) PAB KO n=5, andere n=6) sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalerteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

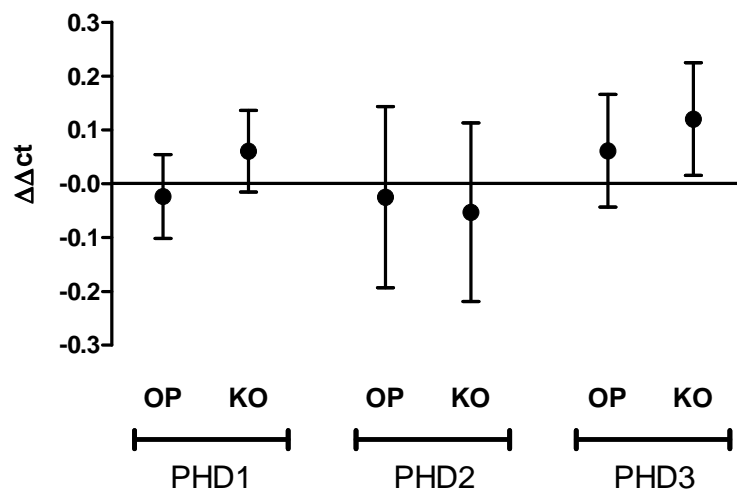


Abbildung 3.2.19: Effektstärken von Operationsmethode und knockout für die Expression der Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. MW mit 95% Konfidenzintervall. (n-Anzahlen: a) n=6, b) sham KO n=8, andere n=9, c) PAB KO n=5, andere n=6). OP = Operationsmethode, sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.10.3 Proteinexpression von vascular endothelial growth factor A im rechten Ventrikel

Wie bereits in 3.1.10.3 beschrieben, repräsentiert VEGFA ein interessantes downstream-Zielprotein von Siah2. Die VEGFA-Proteinexpression im rechten Ventrikel der Tiere aus der Siah2 „banding“-Gruppe wurde mittels ELISA-Verfahren in Gewebehomogenat untersucht. Das Homogenat des rechten Ventrikels von „sham“-operierten Siah2KO Mäusen enthielt durchschnittlich $37,0 \pm 6,7$ pg/ μ l und das der „sham“-Siah2WT $43,8 \pm 7,4$ pg/ μ l VEGFA-Protein. Die mittleren VEGFA-Gehalte der „banding“-operierten Mäuse betragen bei Siah2WT $27,4 \pm 3,7$ pg/ μ l und $36,2 \pm 7,2$ pg/ μ l bei Siah2KO Tieren. Es zeigten sich keine statistisch abgesicherten Auswirkungen der beiden Effekte „Operationsmethode“ und „knockout“ auf den VEGFA-Gehalt (Abb. 3.2.20).

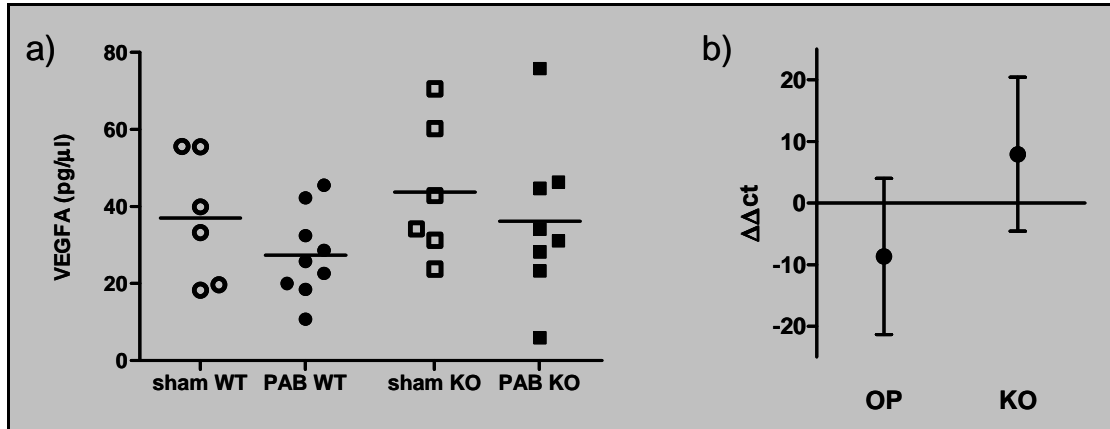


Abbildung 3.2.20: a) Darstellung der immunreaktiven VEGFA-Proteinmenge im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe (sham WT/KO n=6, PAB KO n=8, PAB WT n=9) im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Querbalken =Mittelwert. b) Effektstärke von Operationsmethode und knockout für die VEGFA-Proteinmenge im Homogenat des rechten Ventrikels. OP = Operationsmethode, sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.2.10.4 Genexpression von vascular endothelial growth factor a, vegf-rezeptor 1 und vegf-rezeptor 2 im rechten Ventrikel

Um die Ergebnisse des ELISAs zu komplettieren, wurden RT-PCR Analysen von DNA aus dem rechten Ventrikel der Siah2 „banding“-Gruppe durchgeführt. Es wurde die Expression von *vegfa* und seinen beiden Rezeptoren, *vegfr1* und *vegfr2*, untersucht. Weder der Effekt „Operationsmethode“ noch der knockout von *siah2* hatte einen nachweisbaren Einfluss auf die Regulation der untersuchten Gene (Abb. 3.2.21).

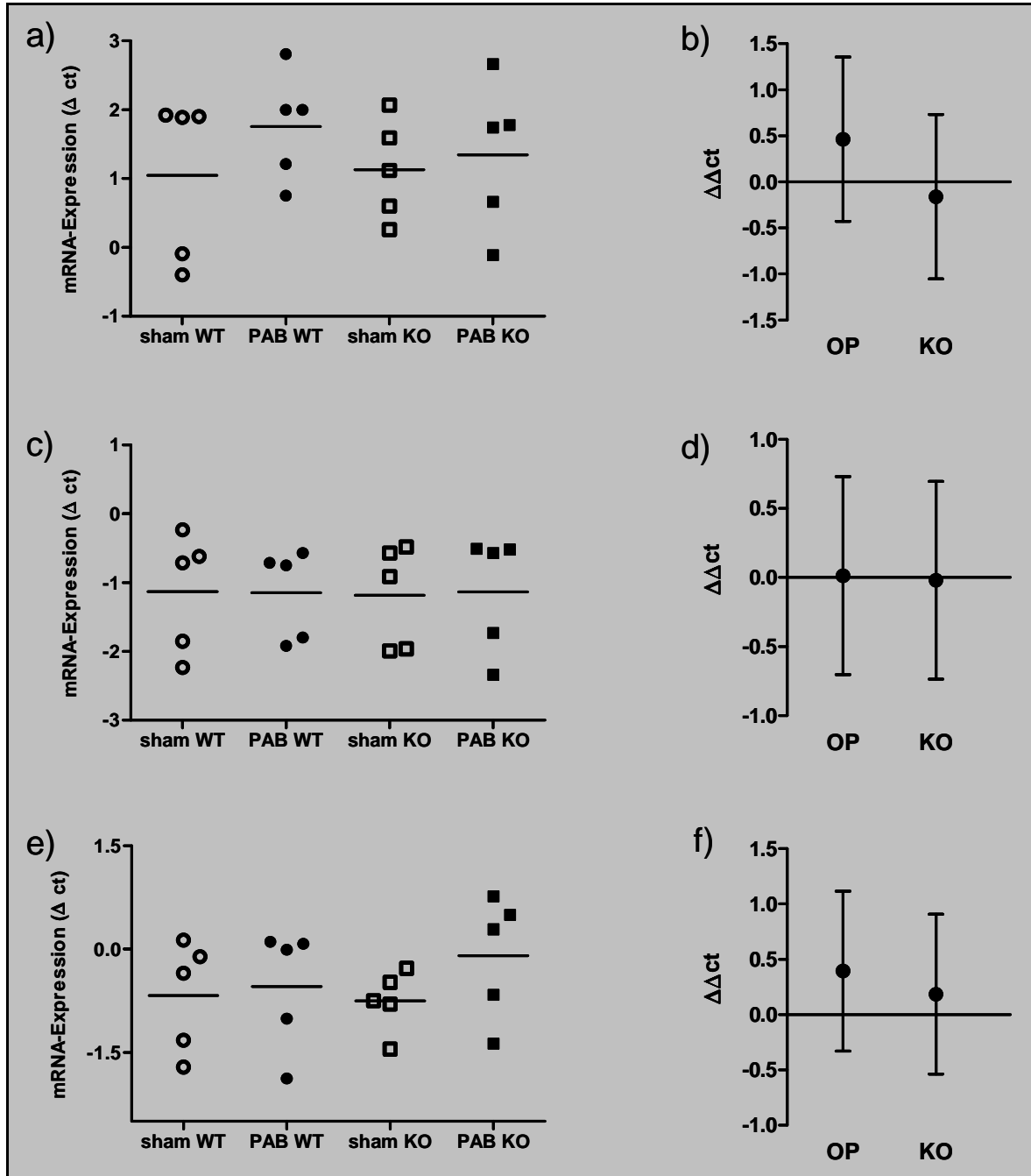


Abbildung 3.2.21: Darstellung der a) *vegfa*, c) *vegf-rezeptor 1* und e) *vegf-rezeptor 2* Genexpression im Homogenat des rechten Ventrikels der *Siah2* Gruppe im Modell des pulmonalerteriellen „banding“. Δ ct = cycle threshold, Querbalken = Mittelwert. (n-Anzahl: n=5). Effektstärken von Operationsmethode und knockout für die Expression von b) *vegfa*, d) *vegf-rezeptor 1* und f) *vegf-rezeptor 2*. MW mit 95% Konfidenzintervall. OP = Operationsmethode, sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalerteriell „banding“, WT = *siah2*^{+/+}, KO = *siah2*^{-/-}.

3.3 Siah1/2 Mäuse im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie

Um zu untersuchen, ob das Fehlen beider Siah-Ubiquitinligasen zu additiven Effekten führt, wurden zusätzlich zu den Siah2 Mäusen Siah1/2KO Mäuse untersucht.

Alle Daten sind angegeben als MW \pm SEM. Der Stichprobenumfang betrug (soweit nicht anders angegeben) für WT Nox n=17, WT Hox n=16, KO Nox n=14, KO Hox n=16. Die Analyse der Daten erfolgte wie unter 2.2.11 angegeben.

3.3.1 Auswirkungen der Hypoxie-Exposition

Die Tiere zeigten während des gesamten Versuchszeitraumes ein ungestörtes Allgemeinbefinden, eine normale Futter- und Wasseraufnahme, sowie ein physiologisches Putz- und Sozialverhalten.

Die Gewichtsentwicklung wird aufgrund stark differierender Ausgangsgewichte der einzelnen Tiere zu Versuchsbeginn (WT 19,0 - 26,0 g, Siah1/2KO 15,0 - 28,5 g) in Prozent zum jeweiligen AG angegeben. Hypoxieexponierte WT Mäuse zeigten bis zum dritten Versuchstag eine durchschnittliche Gewichtsreduktion von $8,7 \pm 0,8$ % und Siah1/2KO Mäuse bis zum vierten Versuchstag von $9,1 \pm 0,6$ %. Anschließend nahmen die Tiere beider Mauslinien wieder zu, so dass WT Mäuse am Versuchsende durchschnittlich $108,9 \pm 1,4$ % und Siah1/2KO Mäuse $104,1 \pm 1,8$ % ihres Ausgangsgewichtes erreichten. Normoxische WT Kontrolltiere wogen nach vier Wochen $122,0 \pm 1,6$ % und Siah1/2 KO Kontrollen $113,1 \pm 1,2$ % des Basisgewichtes. Ab dem zwölften Tag, bis zum Versuchsende, zeigten normoxische WT Mäuse eine signifikant höhere prozentuale Gewichtszunahme als Siah1/2KO Tiere. Das durchschnittliche prozentuale Gewicht der hypoxischen WT Mäuse war an Tag 14 signifikant höher als das, der hypoxischen Siah1/2KO Tiere (Abb. 3.3.1).

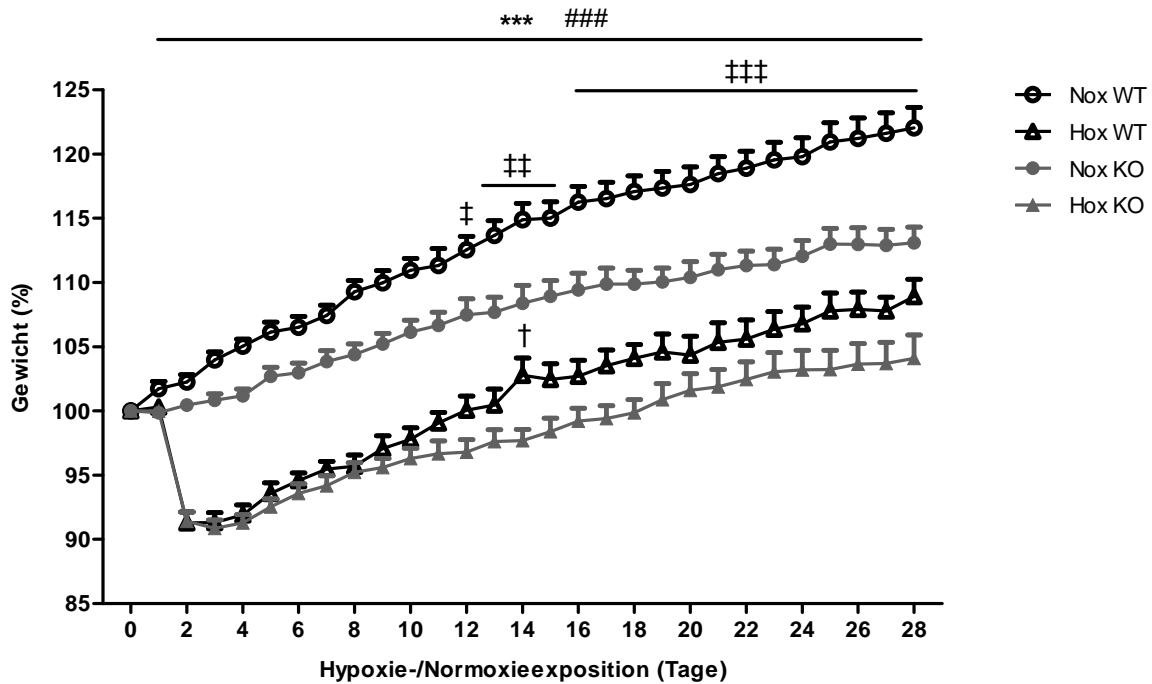


Abbildung 3.3.1: Darstellung des prozentualen Gewichtsverlaufes der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Analyse mit Two-Way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. (von Tag 2-28: *** $p < 0,001$ Nox WT vs. Hox WT, ### $p < 0,001$ Nox KO vs. Hox KO. Tag 12: †† $p < 0,05$, von Tag 13-15: ††† $p < 0,01$, von Tag 16-28: †††† $p < 0,001$ Nox WT vs. Nox KO. Tag 14 † $p < 0,05$ Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

Zur Analyse der physiologischen Reaktion auf die hypoxischen Bedingungen wurden der Hämatokrit, sowie der systolische arterielle und rechtsventrikuläre Druck am Versuchsende gemessen. Anschließend wurden zur Bestimmung des Ausmaßes der Rechtsherzhypertrophie die Ratios von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* und rechtem Ventrikel zum Körpergewicht bestimmt.

3.3.2 Hämatokritwert

Der Hämatokritwert betrug am Versuchsende $0,42 \pm 0,01$ bei normoxischen WT-Kontrolltieren und $0,45 \pm 0,01$ bei Siah1/2KO Mäusen. Hypoxie-exponierte WT sowie KO Mäuse zeigten signifikant ($p < 0,001$) höhere Werte als ihre jeweiligen Normoxiekontrollen (Hox WT $0,62 \pm 0,02$ und Hox Siah1/2 KO $0,60 \pm 0,01$) (Abb. 3.3.2).

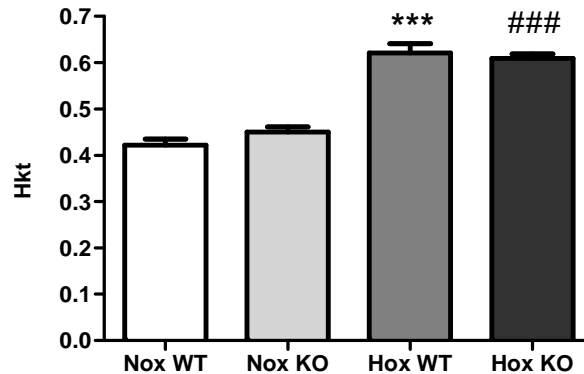


Abbildung 3.3.2: Darstellung des Hämatokritwertes (Hkt) der Siah1/2 Gruppe (Nox WT n=10, Nox KO n=7, Hox WT/KO n=14) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***) $p < 0,001$ Nox WT vs. Hox WT, (###) $p < 0,001$ Nox KO vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.3 Systolischer arterieller Druck

Der SAP der normoxischen Kontrolltiere betrug bei WT Mäusen $84,1 \pm 3,6$ mmHg und bei Siah1/2KO Tieren $76,5 \pm 3,2$ mmHg. Nach vier-wöchiger Hypoxieexposition zeigten WT Tiere einen SAP von $73,1 \pm 2,5$ mmHg und Siah1/2KO Mäuse einen SAP von $69,6 \pm 2,7$ mmHg. Der SAP der hypoxischen WT Mäuse war signifikant ($p < 0,05$) niedriger als derjenige ihrer normoxischen Kontrolltiere während Hypoxie-exponierte Siah1/2KO Mäuse gegenüber ihren Normoxiekontrollen keinen signifikant unterschiedlichen SAP aufwiesen (Abb. 3.3.3).

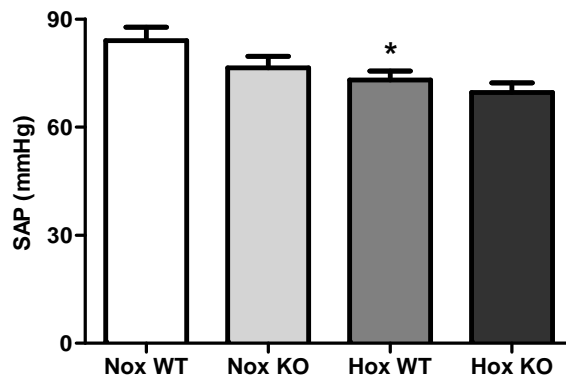


Abbildung 3.3.3: Darstellung des systolischen arteriellen Druckes (SAP) der Siah1/2 Gruppe (Nox WT n=7, andere n=10) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (*p<0,05 Nox WT vs. Hox WT). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.4 Rechtsventrikulärer systolischer Druck

In Normoxie betrug der RVSP der WT Mäuse $23,6 \pm 0,6$ mmHg und der RVSP der Siah1/2KO Tiere $24,4 \pm 0,5$ mmHg. Nach vierwöchiger Hypoxie zeigten WT sowie KO Mäuse signifikant ($p < 0,001$) höhere rechtsventrikuläre Drücke als die normoxischen Kontrollen, wobei WT Tiere mit $36,0 \pm 1,3$ mmHg einen signifikant ($p < 0,05$) höheren RVSP als Siah1/2KO Mäuse ($32,9 \pm 1,1$ mmHg) aufwiesen (Abb. 3.3.4).

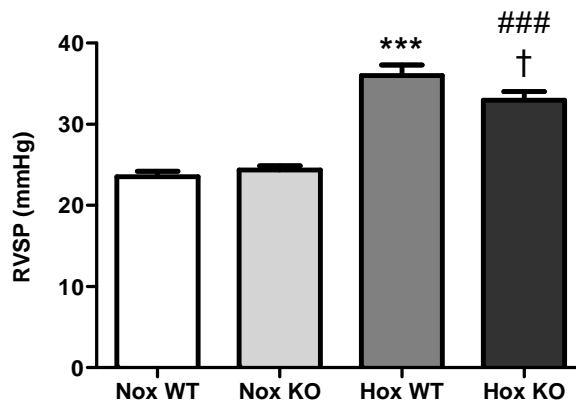


Abbildung 3.3.4: Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) der Siah1/2 Gruppe (Nox WT n=8, andere n=10) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***)p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, (###) p<0,001 Nox KO vs. Hox KO, (†)p<0,05 Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.5 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus *Septum* als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Im Verlauf der Hypoxieexposition entwickelten alle Mäuse aufgrund der erhöhten Druckbelastung des rechten Ventrikels eine Rechtsherzhypertrophie. Das Verhältnis des Nassgewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* (RV/(LV+S)) betrug bei normoxischen WT, ebenso wie bei *Siah1/2*KO Mäusen $0,25 \pm 0,01$. Hypoxische WT Mäuse zeigten eine Herzratio von $0,39 \pm 0,01$, während *Siah1/2*KO Tiere eine signifikant niedrigere Herzratio von $0,36 \pm 0,01$ aufwiesen, bei gegenüber den Nox KO Mäusen noch immer markant ($p < 0,001$) erhöhten Werten (Abb. 3.3.5).

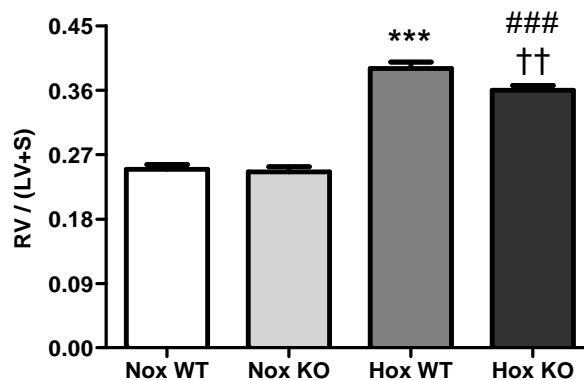


Abbildung 3.3.5: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* (RV/(LV+S)) der *Siah1/2* Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***) $p < 0,001$ Nox WT vs. Hox WT, (###) $p < 0,001$ Nox KO vs. Hox KO, (††) $p < 0,01$ Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.6 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Zusätzlich zur Herzratio wurde das Verhältnis des Gewichts des rechten Ventrikels zum Körpergewicht bestimmt. Der so ermittelte Hypertrophiegrad stimmte mit dem durch die Herzratio ermittelten Ergebnis überein. Normoxische WT Tiere zeigten eine Ratio von $0,82 \pm 0,03$ und *Siah1/2*KO Mäuse eine Ratio von $0,80 \pm 0,02$. Bei vier Wochen Hypoxie-exponierten WT Mäusen betrug der Quotient $1,23 \pm 0,04$, während *Siah1/2*KO Tiere einen signifikant niedrigeren Wert von $1,10 \pm 0,04$ aufwiesen; bei gegenüber den Nox KO Mäusen noch immer markant ($p < 0,001$) erhöhten Werten (Abb. 3.3.6).

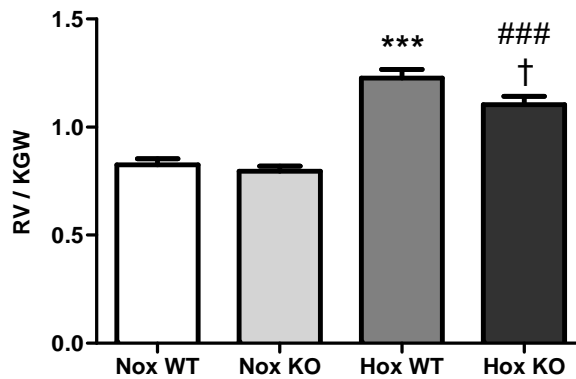


Abbildung 3.3.6: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht (RV/KGW) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***) $p < 0,001$ Nox WT vs. Hox WT, (###) $p < 0,001$ Nox KO vs. Hox KO, (†) $p < 0,05$ Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.7 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

Im Verlauf der vierwöchigen Exposition unter hypoxischen Bedingungen entwickelten sowohl WT, als auch Siah1/2KO Mäuse eine Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie mit einem Umbau der kleinen Lungengefäße. Um das Ausmaß dieses Remodeling beurteilen zu können, wurden der Muskularisierungsgrad und die Wandstärke der pulmonalen Gefäße bestimmt.

3.3.7.1 Muskularisierungsgrad

Bezüglich der Gefäßkategorie mit einem Außendurchmesser von 20-70 μm wurden bei normoxischen WT-Kontrollen $8,6 \pm 1,1$ % voll-muskularisierte, $36,8 \pm 0,9$ % teil-muskularisierte und $54,5 \pm 1,6$ % nicht muskularisierte periphere Lungengefäße erfasst. Normoxische Siah1/2KO Tiere wiesen mit $6,9 \pm 0,7$ % voll-muskularisierten, $37,6 \pm 1,3$ % teil-muskularisierten und $55,5 \pm 1,2$ % nicht muskularisierten Lungengefäßen eine vergleichbare, statistisch nicht unterschiedliche, Verteilung auf. Nach vier-wöchiger Hypoxieexposition stieg der Anteil der teil- und voll-muskularisierten Gefäße in beiden Linien gleichermaßen signifikant an ohne, dass sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen WT und Siah1/2KO Mäusen zeigte. Bei Mäusen der WT Hypoxiegruppe wurden $31,4 \pm 1,9$ % voll-muskularisierte, $43,5 \pm 1,2$ % teil-muskularisierte und $25,1 \pm 1,2$ % nicht-muskularisierte Gefäße analysiert. Siah1/2 KO Tiere zeigten $27,6 \pm 1,6$ % voll-muskularisierte, $47,5 \pm 2,6$ % teil-muskularisierte und $24,9 \pm 2,2$ % nicht-muskularisierte

Lungengefäße. Die Werte sind in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefasst (Tab. 3.3.1, Abb. 3.3.7).

Gruppe	Muskularisierungsgrad in %		
	nicht MW ± SEM	teilweise MW ± SEM	voll MW ± SEM
Nox WT	54,5 ± 1,6	36,8 ± 0,9	8,6 ± 1,1
Nox KO	55,5 ± 1,2	37,6 ± 1,3	6,9 ± 0,7
Hox WT	25,1 ± 1,2 ***	43,5 ± 1,2 *	31,4 ± 1,9 ***
Hox KO	24,9 ± 2,2 ###	47,5 ± 2,6 ###	27,6 ± 1,6 ###

Tabelle 3.3.1: Prozentualer Muskularisierungsgrad kleiner Lungengefäße (Außen-Ø 20 - 70 µm) der Siah1/2 Gruppe (Nox WT n=10, Nox KO n=11, Hox WT/KO n=12) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***)p<0,001, *)p<0,05 Nox WT vs. Hox WT, ###p<0,001 Nox KO vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

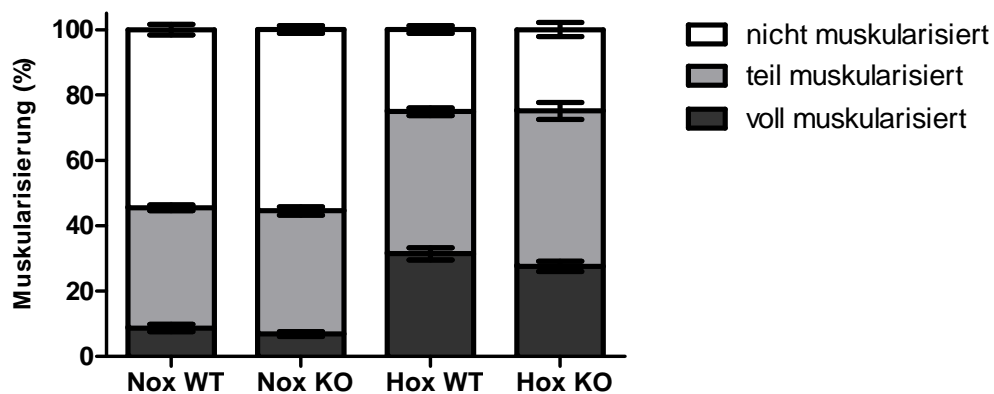


Abbildung 3.3.7: Darstellung des prozentualen Anteils nicht-, partiell- oder voll-muskularisierter kleiner Lungengefäße (Außen-Ø 20 – 70 µm) der Siah1/2 Gruppe (Nox WT n=10, Nox KO n=11, Hox WT/KO n=12) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.7.2 Mediale Wandstärke

Im Verlauf der pulmonalarteriellen Hypertonie und des vaskulären Remodeling erfolgte eine Verdickung der Wände der pulmonalen Blutgefäße der Hypoxie-exponierten WT und Siah1/2KO Mäuse in vergleichbarem Maße. Die mediale Wandstärke der Pulmonalgefäße aller drei Größenkategorien war in den Hypoxiegruppen signifikant erhöht (Tab. 3.3.2, Abb. 3.3.8).

Gruppe	Wandstärke in % des Gefäßaußendurchmessers		
	Kleine Gefäße 20-70µm	Mittlere Gefäße 70-150 µm	Große Gefäße >150µm
	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM
Nox WT	13,3 ± 0,5	8,6 ± 0,5	7,7 ± 0,8
Nox KO	14,4 ± 0,5	9,4 ± 0,4	6,2 ± 0,4
Hox WT	20,1 ± 0,6 ***	12,2 ± 0,5 ***	10,6 ± 0,7 **
Hox KO	19,4 ± 0,7 ###	11,1 ± 0,5 #	10,1 ± 0,5 ###

Tabelle 3.3.2: Mediale Wandstärke kleiner, mittlerer und großer Blutgefäße der pulmonalen Strombahn für die Siah1/2 Gruppe (Nox WT n=10, Nox KO n=11, Hox WT/KO n=12) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (**p<0,01, ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, ###p<0,001, #p<0,05 Nox KO vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

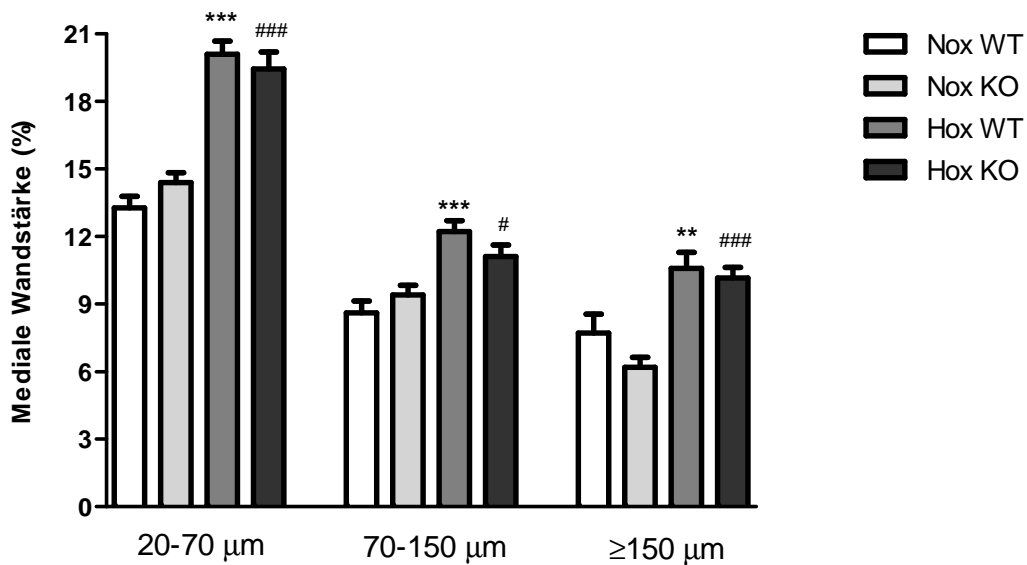


Abbildung 3.3.8: Darstellung der medialen Wandstärke kleiner, mittlerer und großer Blutgefäße der pulmonalen Strombahn für die Siah1/2 Gruppe Gruppe (Nox WT n=10, Nox KO n=11, Hox WT/KO n=12) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ Nox WT vs. Hox WT, (###) $p < 0,001$, (#) $p < 0,05$ Nox KO vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.8 Echokardiografische Untersuchungen

Zur Charakterisierung des kardialen Remodeling und der rechtsventrikulären Funktion wurden auch in der Siah1/2 Gruppe echokardiografische Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov durchgeführt.

3.3.8.1 Rechter Ventrikel und rechtes Atrium

Hypoxische Mäuse beider Linien zeigten im Vergleich zu ihren normoxischen Kontrollen eine signifikante Steigerung der Wanddicke des rechten Ventrikels. Nach vierwöchiger Hypoxieexposition war die Zunahme der Wanddicke bei WT Mäusen signifikant stärker ausgeprägt, als bei Siah1/2KO Tieren (Abb. 3.3.9, Tab. 3.3.3).

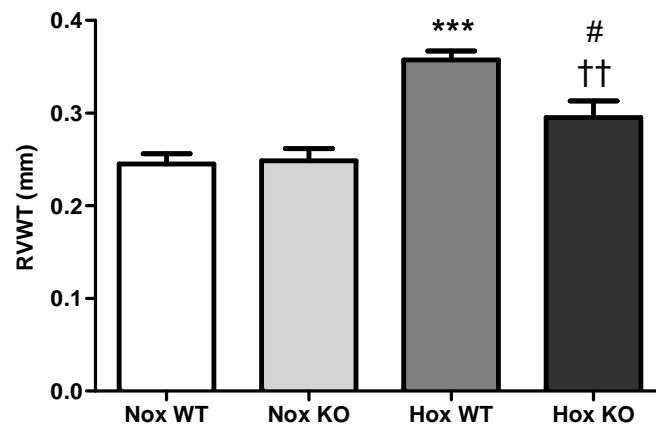


Abbildung 3.3.9: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT, right ventricular wall thickness) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Nox KO n=7, andere n=8. Endpunktmessung nach 4 Wochen. (**p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, #p<0,05 Nox KO vs. Hox KO, ††p<0,01 Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

Weiterhin wiesen hypoxische WT Mäuse eine Dilatation der rechten Herzkammer auf, während der rechtsventrikuläre Durchmesser der Siah1/2KO Tiere unverändert blieb (Abb. 3.3.10, Tab. 3.3.3).

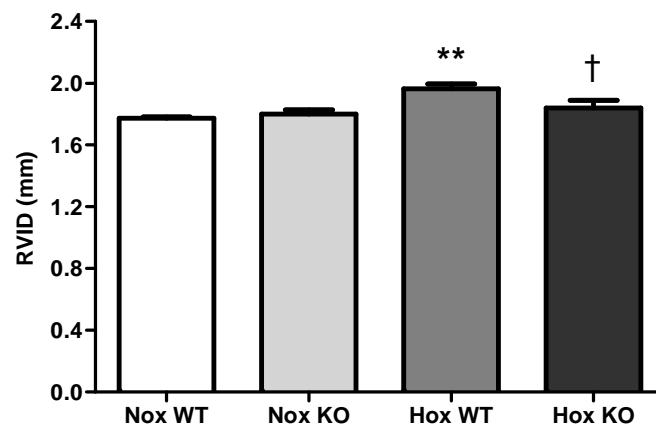


Abbildung 3.3.10: Rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID, right ventricular internal diameter) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Nox KO n=7, Nox WT/ Hox KO n=8, Hox WT n=6. Endpunktmessung nach 4 Wochen. (**p<0,01 Nox WT vs. Hox WT, †p<0,05 Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

Nach vierwöchiger Hypoxieexposition zeigten WT Mäuse eine deutliche Vergrößerung der Querschnittsfläche rechten Vorhofes während die atriale Fläche der Siah1/2KO Tiere im Bereich der normoxischen Kontrollen lag (Abb. 3.3.11, Tab. 3.3.3).

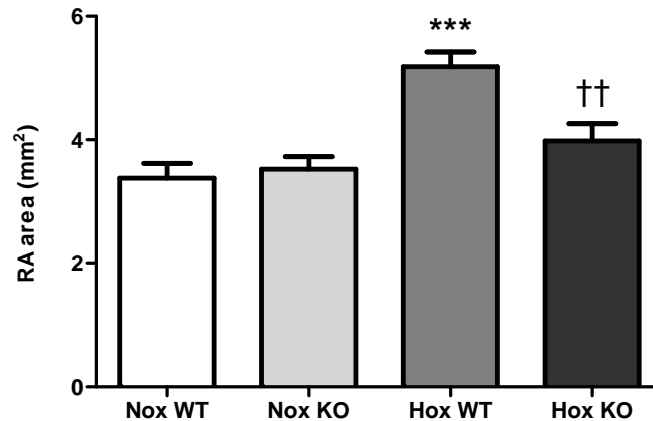


Abbildung 3.3.11: Enddiastolische Querschnittsfläche des rechten *Atrium* (RA area, right atrial area) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Nox WT/Hox KO n=7, Nox KO n=5, Hox WT n=6. Endpunktmessung nach 4 Wochen. (***)p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, ††p<0,01 Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

In der folgenden Tabelle sind die Messwerte nocheinmal detailliert aufgeführt:

4 Wochen	BL/6J Nox			Siah1/2KO Nox			BL/6J Hox			Siah1/2KO Hox				
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
RVWT (mm)	0,25	0,01	8	0,25	0,01	7	0,36	0,01	8	***	0,30	0,02	8	††#
RVID (mm)	1,78	0,01	8	1,80	0,03	7	1,97	0,03	6	**	1,84	0,05	8	†
RA area (mm²)	3,38	0,24	7	3,52	0,21	5	5,19	0,24	6	***	3,98	0,29	7	††

Tabelle 3.3.3: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT), rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID) und enddiastolische Querschnittsfläche des rechten *Atrium* (RA area) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Endpunktmessung nach 4 Wochen. (***)p<0,001, **p<0,01, #p<0,05 Nox WT vs. Hox WT, #p<0,05 Nox KO vs Hox KO, †p<0,05, ††p<0,01 Hox WT vs. Hox KO). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.8.2 Cardiac output

WT Mäuse zeigten ab einer zwei-wöchigen Hypoxieexposition einen signifikant, progredient fallenden CO, während das Herzminutenvolumen der Siah1/2KO Tiere innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes erhalten blieb (Abb. 3.3.12, Tab. 3.3.4).

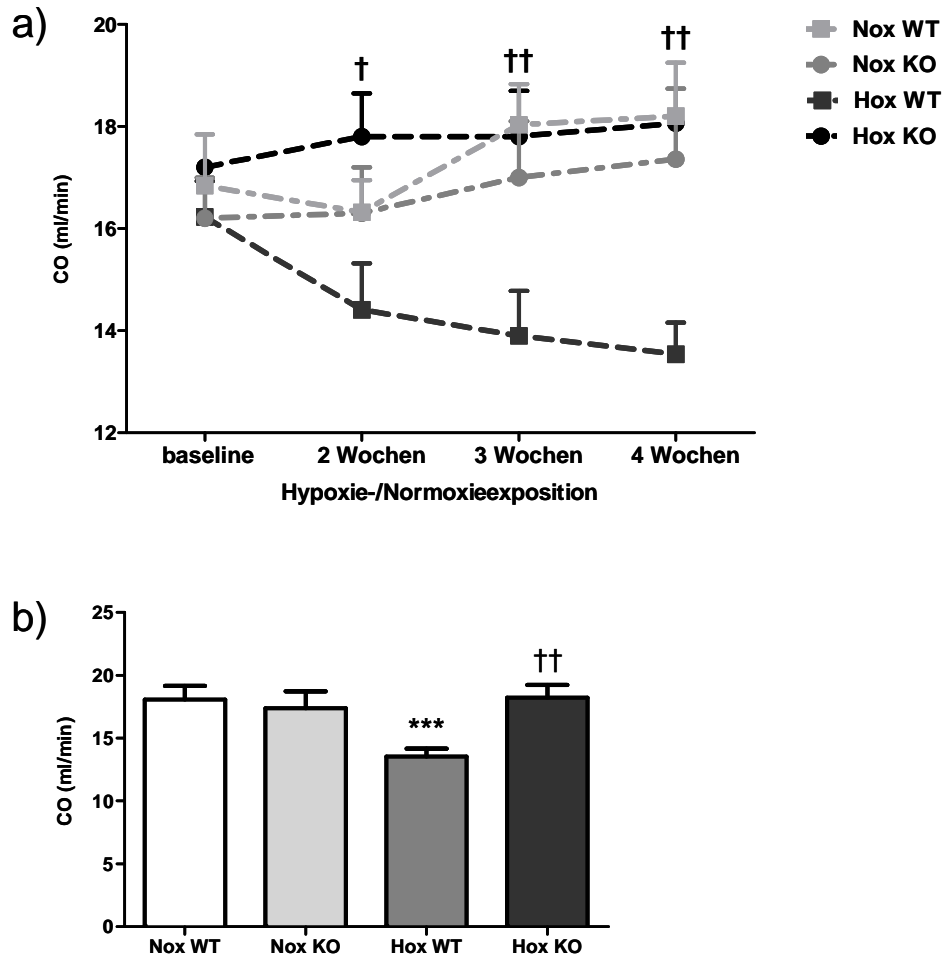


Abbildung 3.3.12: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle †p<0,05, ††p<0,01 Hox WT vs. Hox KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur Hox WT vs. Hox KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.3.4 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 4 Wochen ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, ††p<0,01 Hox WT vs. Hox KO. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

CO (ml/min)	BL/6J Nox			Siah1/2KO Nox			BL/6J Hox				Siah1/2KO Hox			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	16,8	1,0	8	16,2	0,8	8	16,2	0,7	8		17,2	0,1	8	
2 Wochen	16,3	0,6	8	16,3	0,9	8	14,4	0,9	8		17,8	0,9	8	†
3 Wochen	18,0	0,8	8	17,0	1,1	8	13,9	0,9	8	**	17,8	0,9	8	††
4 Wochen	18,2	1,1	8	17,4	1,4	8	13,5	0,6	8	***	18,1	0,0	8	††

Tabelle 3.3.4: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Verlaufskontrolle **p<0,01, ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, †p<0,05, ††p<0,01 Hox WT vs. Hox KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.8.3 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels

Hypoxische Siah1/2KO Mäuse zeigten während des gesamten Versuches eine vollständig erhaltene systolische Funktion, während WT Mäuse ab der zweiten Woche in Hypoxie eine signifikant, progredient schlechter werdende Leistung aufwiesen (Abb. 3.3.13, Tab. 3.3.5).

TAPSE (mm)	BL/6J Nox			Siah1/2KO Nox			BL/6J Hox				Siah1/2KO Hox			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	1,36	0,03	8	1,33	0,02	8	1,33	0,02	8		1,30	0,04	8	
2 Wochen	1,35	0,02	8	1,32	0,03	8	1,18	0,05	8	***	1,30	0,03	8	†
3 Wochen	1,36	0,01	8	1,34	0,03	8	1,10	0,01	8	***	1,36	0,04	8	†††
4 Wochen	1,36	0,03	8	1,35	0,04	8	1,08	0,02	8	***	1,37	0,03	8	†††

Tabelle 3.3.5: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Verlaufskontrolle ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, †p<0,05, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

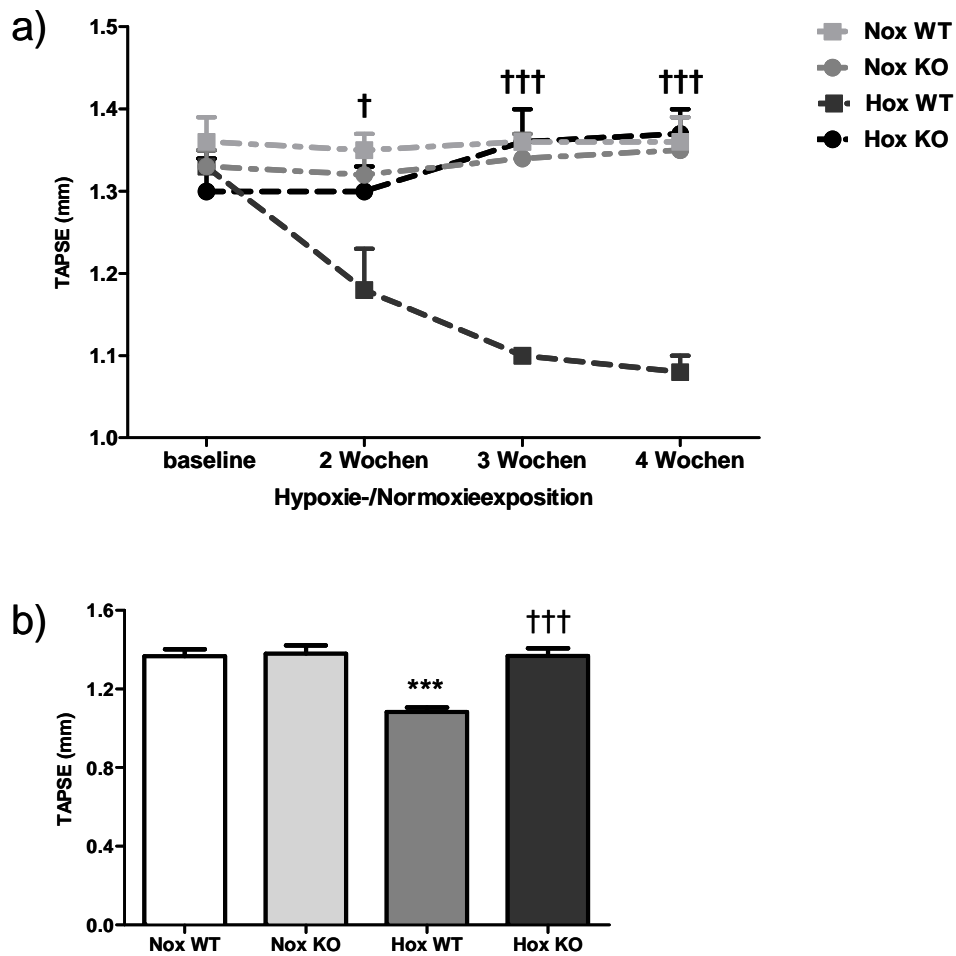


Abbildung 3.3.13: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der *Siah1/2* Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle †p<0,05, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur Hox WT vs. Hox KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.3.5 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 4 Wochen ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.8.4 IVRT/RR – diastolische Funktion des rechten Ventrikels

Siah1/2KO Mäuse zeigten zu Versuchsbeginn („baseline“-Messung) eine tendenziell schlechtere diastolische Funktion als ihre WT-Kontrollen. Nach zweiwöchiger Hypoxie wiesen allerdings die WT Mäuse eine progredient schlechter werdende (ab der dritten Woche in Hypoxie signifikant herabgesetzte) diastolische Funktion auf, während Siah1/2 KO Tiere eine Leistung im Bereich der „baseline“-Messung beibehielten (Abb. 3.3.14, Tab. 3.3.6).

IVRT/RR (%)	BL/6J Nox			Siah1/2KO Nox			BL/6J Hox			Siah1/2KO Hox				
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	14,5	0,5	8	16,6	0,8	8	14,2	0,5	8		17,6	0,8	8	††
2 Wochen	14,8	0,6	8	16,2	0,6	8	18,6	0,7	8	***	18,2	0,7	8	
3 Wochen	15,0	0,4	8	15,4	0,6	8	21,1	0,6	8	***	18,3	0,5	8	††##
4 Wochen	15,8	0,5	8	16,0	1,0	8	23,6	0,6	8	***	18,3	0,8	8	†††

Tabelle 3.3.6: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Verlaufskontrolle ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, ##p<0,01 Nox KO vs. Hox KO, ††p<0,01, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

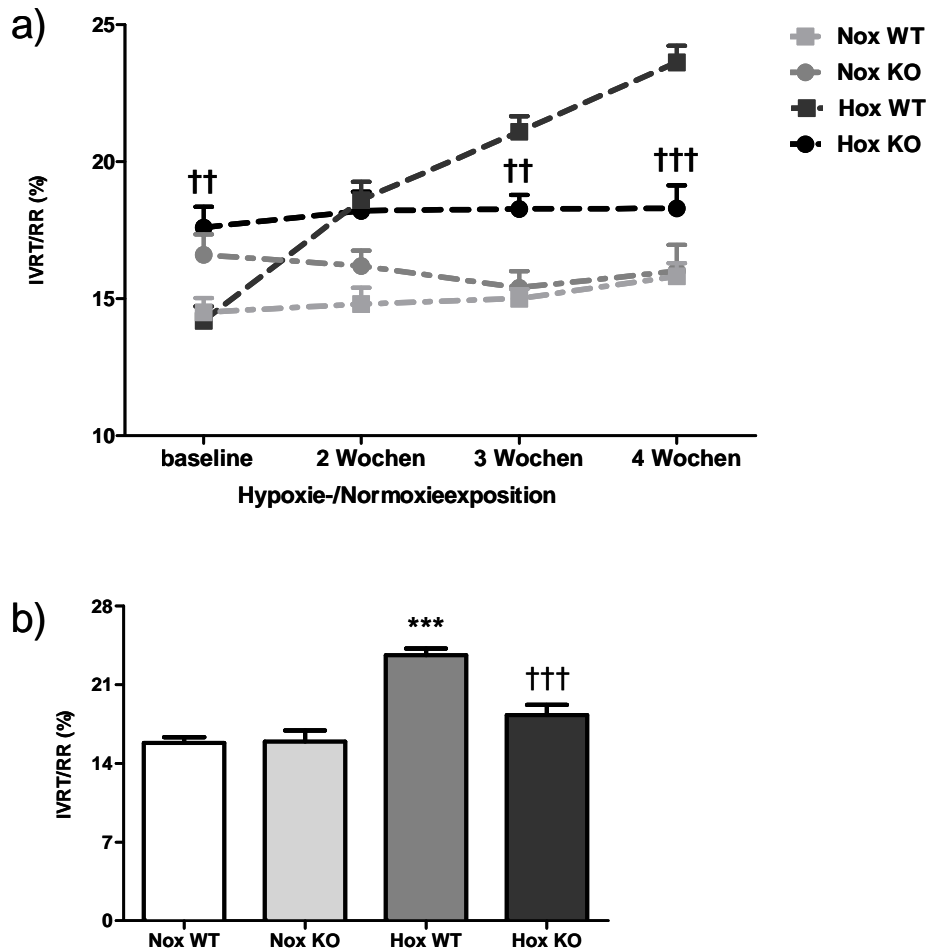


Abbildung 3.3.14: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle ††p<0,01, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur Hox WT vs. Hox KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.3.6 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 4 Wochen ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.8.5 MPI – globale Funktion des rechten Ventrikels

Normoxische Siah1/2KO Tiere zeigten im Vergleich zu ihren WT-Kontrollen zu allen Messzeitpunkten eine signifikant schlechtere globale Herzfunktion. Allerdings wiesen hypoxische WT nach zweiwöchiger Hypoxie eine progredient herabgesetzte (ab der dritten Woche in Hypoxie signifikant schlechtere) globale rechtsventrikuläre Funktion auf, während die Leistung des rechten Ventrikels der Siah1/2 KO Mäuse im Bereich der „baseline“-Messung blieb (Abb. 3.3.15, Tab. 3.3.7).

MPI	BL/6J Nox			Siah1/2KO Nox				BL/6J Hox				Siah1/2KO Hox			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	0,84	0,03	8	0,97	0,03	8	‡‡	0,86	0,03	8		0,99	0,03	8	‡‡
2 Wochen	0,83	0,01	8	0,98	0,01	8	‡‡	1,15	0,01	8	***	1,09	0,04	8	#
3 Wochen	0,84	0,03	8	0,99	0,02	8	‡‡	1,26	0,03	8	***	1,04	0,03	8	‡‡‡
4 Wochen	0,83	0,01	8	0,95	0,04	8	‡	1,32	0,04	8	***	1,01	0,04	8	‡‡‡

Tabelle 3.3.7: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Verlaufskontrolle ‡p<0,05, ‡‡p<0,01 Nox WT vs. Nox KO, ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, #p<0,05 Nox KO vs. Hox KO, ††p<0,01, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

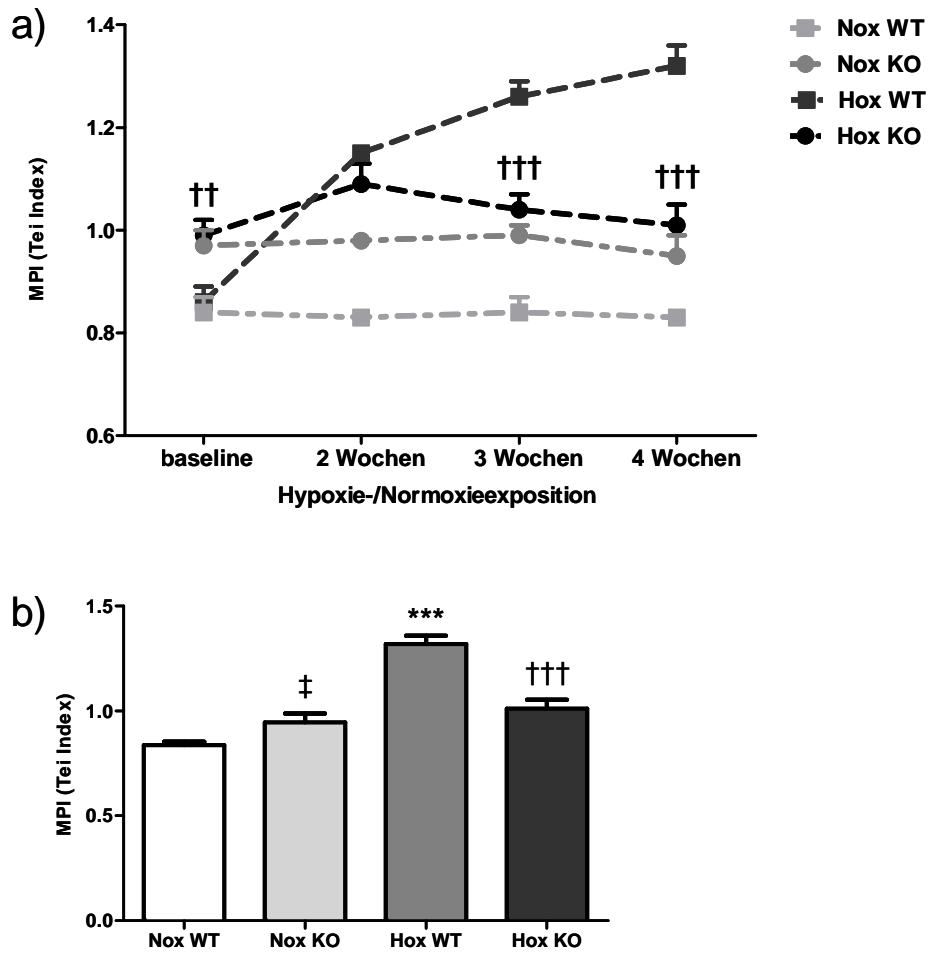


Abbildung 3.3.15: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der *Siah1/2* Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (n=8). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. **a) Verlaufskontrolle** ††p<0,01, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur Hox WT vs. Hox KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.3.7 zu entnehmen. **b) Endpunktmessung** nach 4 Wochen ‡p<0,05 Nox WT vs. Nox KO, ***p<0,001 Nox WT vs. Hox WT, †††p<0,001 Hox WT vs. Hox KO. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.8.6 Zusammenfassung der echokardiografischen Befunde

Trotz einer schlechteren globalen und diastolischen rechtsventrikulären Funktion unter „baseline“- und Normoxiebedingungen zeigten *Siah1/2*KO Mäuse unter Hypoxie eine vollständig erhaltene Funktion des rechten Ventrikels. Alle Parameter lagen im gleichen Bereich wie die der normoxischen Kontrollen, lediglich eine Zunahme der Wandstärke war erkennbar. Hypoxische WT wiesen eine progrediente Beeinträchtigung der rechtsventrikulären Funktion, eine Dilatation des rechten Ventrikels, sowie eine Zunahme der Querschnittsfläche des rechten *Atrium* auf.

3.3.9 Prozentualer Kollagenanteil des rechten Ventrikels

Im Rahmen der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie zeigten weder hypoxische WT noch *Siah1/2*KO Mäuse einen Anstieg des Anteils an kollagenen Fasern und somit auch keinen Hinweis auf eine Fibrose des rechten Ventrikels. Der Kollagengehalt der normoxischen Kontrolltiere betrug bei WT $0,55 \pm 0,06$ % und bei *Siah1/2*KO Tieren $0,67 \pm 0,07$ %. Nach vier Wochen Hypoxieexposition zeigten WT Tiere einen Kollagenanteil von $0,71 \pm 0,15$ % und *Siah1/2*KO Mäuse von $0,62 \pm 0,06$ % (Abb. 3.3.16).

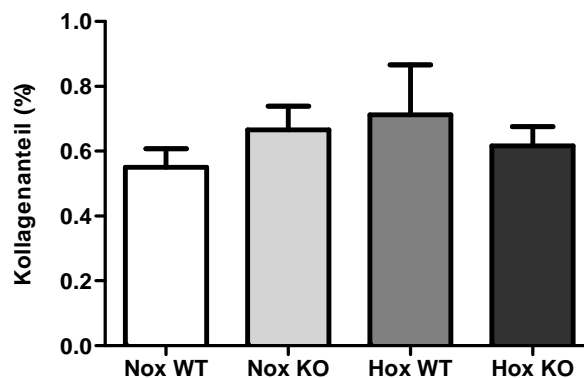


Abbildung 3.3.16: Darstellung des prozentualen Kollagenanteiles (%) des rechten Ventrikels der *Siah1/2* Gruppe (Hox KO n=5, Andere n=4) im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.3.10 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Auswertung der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen erfolgte durch die Analyse der differentiellen Expression der einzelnen Gene bzw. Proteine unter den Effekten „Sauerstoffgehalt“ und „knockout“ von *siah1a* und *siah2*.

3.3.10.1 Proteinexpression der Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD)1, PHD2 und PHD3 in der Lunge

Die physiologischen und histologischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *Siah1/2KO* Mäuse auf hypoxische Bedingungen ebenfalls anders als ihre WT-Kontrollen reagieren. Deshalb sollte auch in dieser Gruppe untersucht werden, ob sich die Proteinmenge der Prolyl-4-Hydroxylasen verändert.

Die Proteinexpression der PHDs in der Lunge der *Siah1/2* Gruppe wurde mittels Westernblotverfahren in Gewebehomogenat untersucht. Die Proteinmenge im Lungenhomogenat wurde bezogen auf β -Aktin normalisiert. Da die Westernblotanalysen (aufgrund des hohen Stichprobenumfangs) auf mehreren Membranen durchgeführt wurden, erfolgte die Normalisierung der Einzelwerte nach der Formel: Einzelwert der Probe – Mittelwert der Membran + Gesamtmittelwert aller Membranen.

Die Westernblotanalysen von PHD1, PHD2 und PHD3 im Lungenhomogenat werden in Abb 3.3.17 und 3.3.18 grafisch dargestellt. Keiner der beiden untersuchten Effekte „Sauerstoffgehalt“ und „knockout“ von *siah1a* und *siah2* hatte eine statistisch abgesicherte Auswirkung auf die Proteinmenge der drei PHDs im Lungenhomogenat der *Siah1/2* Gruppe. Allerdings führte der Effekt „knockout“ zu einer Tendenz zu einem erhöhten PHD3-Proteingehalt (Abb 3.3.18).

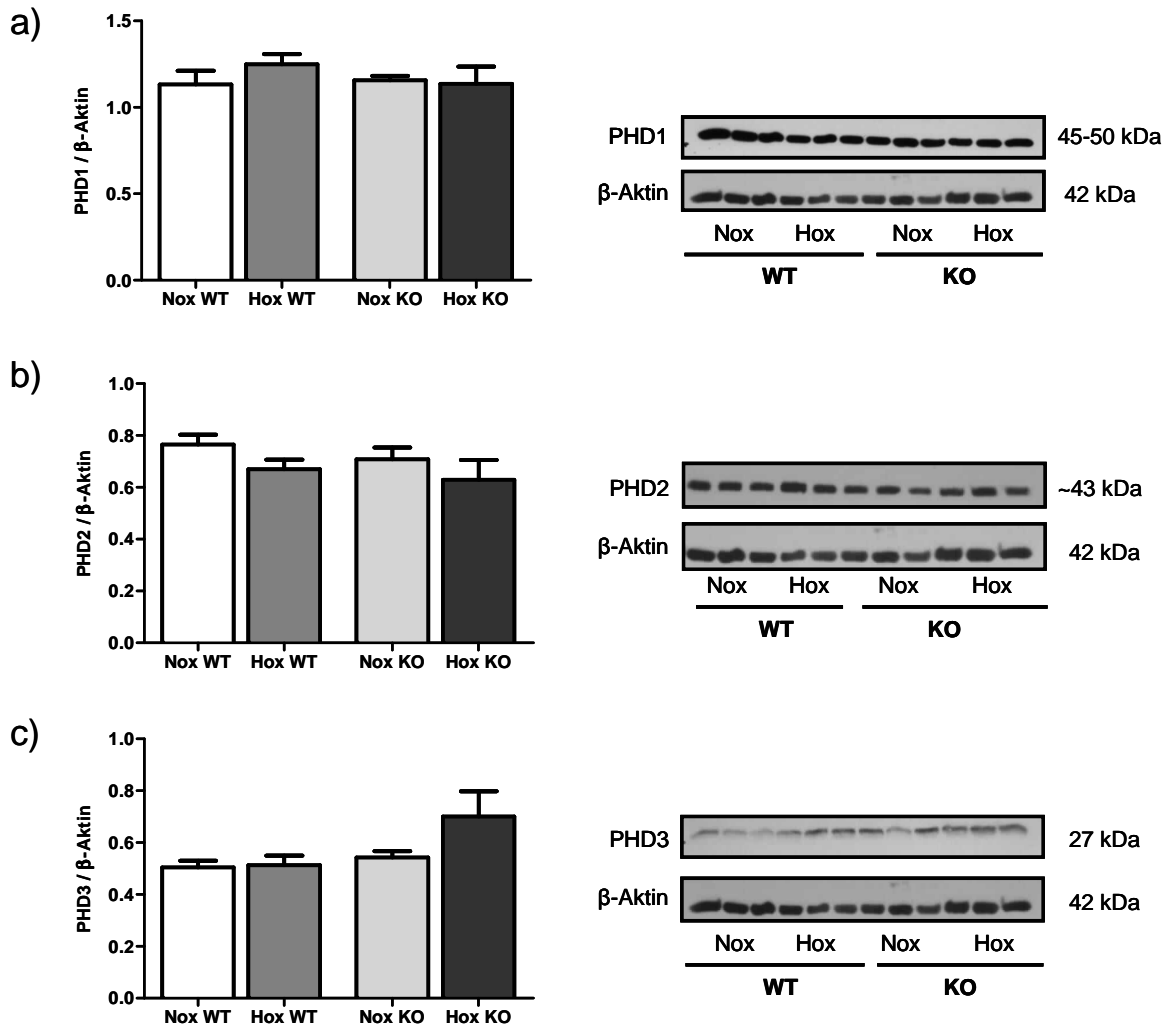


Abbildung 3.3.17: Darstellung der prozentualen Proteinmenge der Prolyl-4-Hydroxylasen a) PHD1, b) PHD2 und c) PHD3 im Lungenhomogenat der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. (n-Anzahlen: a) n=9, b) Nox WT/KO n=6, Hox WT n=5, Hox KO n=4, c) Nox WT n=8, andere n=9). Nox = Normoxie, Hox = Hypoxie, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

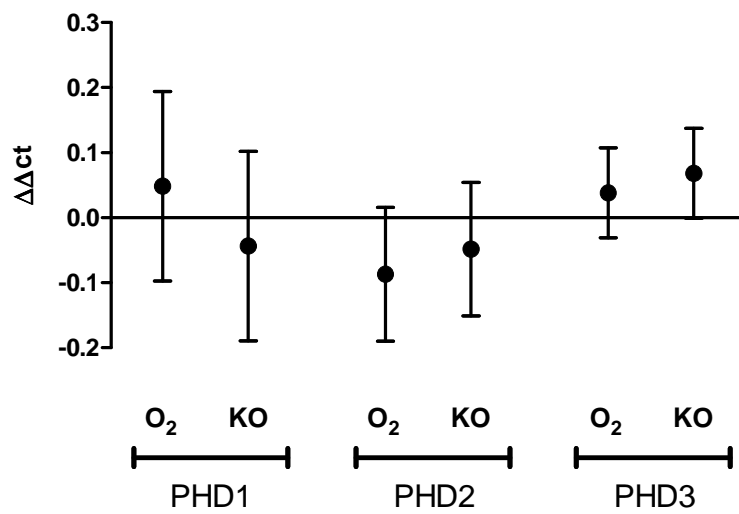


Abbildung 3.3.18: Effektstärken von Sauerstoffgehalt und knockout für die Expression der Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 im Lungenhomogenat der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. MW mit 95% Konfidenzintervall. (n-Anzahlen: a) n=9, b) Nox WT/KO n=6, Hox WT n=5, Hox KO n=4, c) Nox WT n=8, andere n=9). O₂ = Sauerstoffgehalt, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4 Siah1/2 Mäuse im Modell des pulmonalarteriellen „banding“

Auch bei Siah1/2 Mäusen wurde das Modell des pulmonalarteriellen „banding“ angewendet, um eine von der pulmonalen Gefäßstrombahn unabhängige rechtsventrikuläre Hypertrophie zu untersuchen.

Alle Daten sind angegeben als MW \pm SEM. Der Stichprobenumfang betrug (soweit nicht anders angegeben) für WT sham n=15, WT PAB n=15, Siah1/2KO sham n=10, Siah1/2KO PAB n=13. Die Analyse der Daten erfolgte wie unter 2.2.11 angegeben.

3.4.1 Auswirkungen des pulmonalarteriellen „banding“

Die Tiere waren zehn bis fünfzehn Minuten nach den operativen Eingriffen wieder bei vollem Bewusstsein, liefen durch den Käfig und begannen sich zu putzen. Sie wurden für weitere 3-5 Tage, je nach individuellem Allgemeinzustand, analgetisch versorgt. Einen Tag *post operationem* war das Fell am Kopf noch etwas durch die *intra operationem* aufgetragene Augensalbe verklebt, am zweiten Tag war das Haarkleid völlig sauber. Alle Mäuse zeigten ab dem ersten Tag *post operationem* ein ungestörtes Allgemeinbefinden, eine normale Futter- und Wasseraufnahme, sowie ein physiologisches Putz- und Sozialverhalten. Die Gewichtsentwicklung wird aufgrund stark differierender Ausgangsgewichte der einzelnen Tiere zu Versuchsbeginn (WT 21,0 - 27,0 g, Siah1/2KO 17,5 - 28,5 g) in Prozent zum jeweiligen AG angegeben. „Banding“-operierte WT Mäuse zeigten am ersten Tag *post operationem* eine durchschnittliche Gewichtsreduktion von $6,8 \pm 0,8$ %. Siah1/2KO Mäuse nahmen bis zum zweiten Tag *post operationem* $6,6 \pm 0,8$ % ab. „Sham“-operierte Kontrollen wiesen etwas niedrigere Gewichtsabnahmen von $4,9 \pm 0,4$ % bei in der WT Gruppe und $4,9 \pm 0,3$ % bei Siah1/2KO Mäusen auf. Alle WT Tiere, sowie die „sham“-operierten Siah1/2KO Mäuse nahmen ab dem zweiten Tag *post operationem* wieder zu und erreichten ihr Basisgewicht nach 8 Tagen. „Banding“-operierte Siah1/2KO Tiere zeigten ab dem dritten Tag eine Gewichtszunahme und erreichten ihr durchschnittliches Ausgangsgewicht nach 13 Tagen. Am Versuchsende besaßen „banding“-operierte WT Mäuse durchschnittlich $109,7 \pm 1,0$ % und Siah1/2KO Mäuse $106,8 \pm 2,4$ % ihres Ausgangsgewichtes. „Sham“-operierte WT Kontrolltiere wogen nach drei Wochen $110,9 \pm 1,4$ % und Siah1/2KO Kontrollen $109,4 \pm 1,8$ % des Basisgewichtes (Abb. 3.4.1).

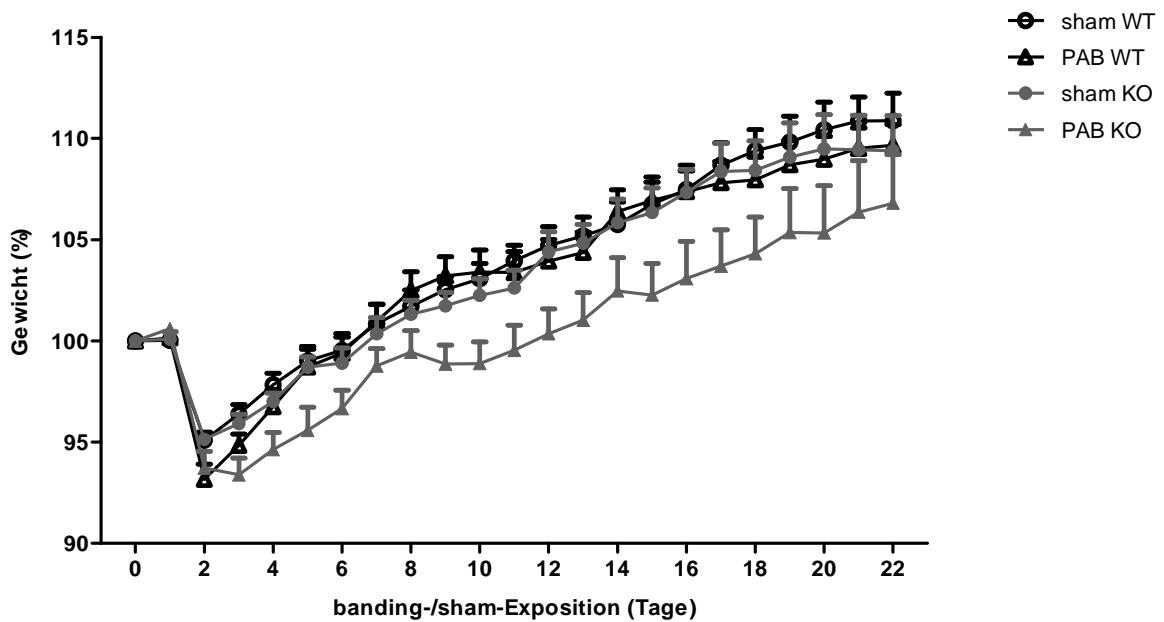


Abbildung 3.4.1: Darstellung des prozentualen Gewichtsverlaufes der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

Zur Charakterisierung der physiologischen Reaktion auf die Drucküberladung des rechten Ventrikels wurden der systolische arterielle und rechtsventrikuläre Druck am Versuchsende gemessen. Anschließend wurden zur Bestimmung des Ausmaßes der Rechtsherzhypertrophie die Ratios RV/(LV+S) und RV/KGW bestimmt.

3.4.2 Systolischer arterieller Druck

„Sham“- und „banding“-operierte Mäuse beider Linien zeigten ähnliche systemische Drücke. Der SAP betrug drei Wochen *post operationem* $88,4 \pm 4,2$ mmHg bei „sham“-operierten WT-Kontrollen und $93,0 \pm 2,9$ mmHg bei Siah1/2KO Tieren. Pulmonalarteriell „banding“-operierte WT zeigten einen SAP von $87,3 \pm 2,8$ mmHg und Siah1/2KO Mäuse von $86,6 \pm 3,5$ mmHg (Abb 3.4.2). Somit traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den SAP der einzelnen Gruppen auf.

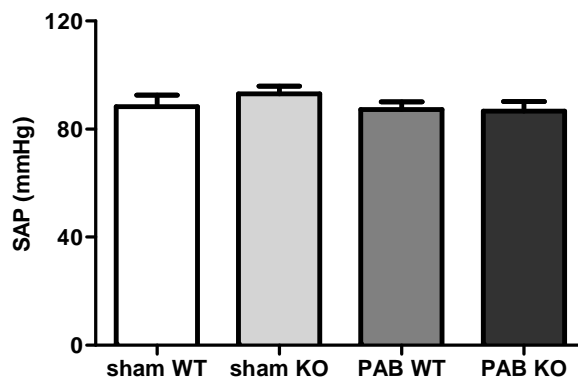


Abbildung 3.4.2: Darstellung des systolischen arteriellen Druckes (SAP) der Siah1/2 Gruppe (sham WT n=9, sham KO und PAB WT n=10, PAB KO n=7) im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.3 Rechtsventrikulärer systolischer Druck

Drei Wochen *post operationem* betrug der RVSP der scheinerierten WT $27,9 \pm 1,0$ mmHg und der RVSP der Siah1/2KO Tiere $28,7 \pm 0,8$ mmHg. WT sowie KO Mäuse der „banding“-Gruppen zeigten nahezu doppelt so hohe rechtsventrikuläre Drücke, mit Werten von $53,7 \pm 2,4$ mmHg bei den WT und $52,4 \pm 4,1$ mmHg bei Siah1/2KO Tieren. Zwischen „banding“-operierten WT und KO Tieren bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des RVSP (Abb. 3.4.3).

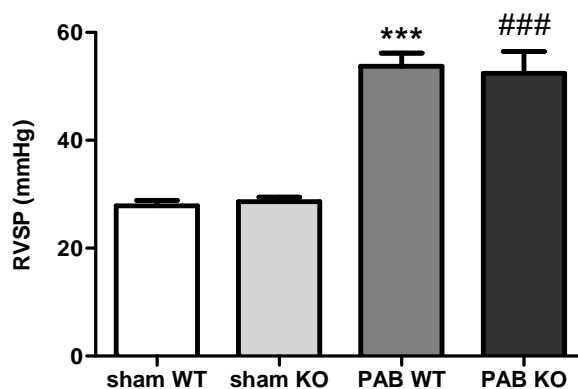


Abbildung 3.4.3: Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) der Siah1/2 Gruppe (PAB KO n=8, Andere n=10) im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. (***)p<0,001 sham WT vs. PAB WT, (###)p<0,001 sham KO vs. PAB KO) sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.4 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus *Septum* als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Im Verlauf des pulmonalarteriellen „banding“ entwickelten sowohl WT als auch KO Mäuse aufgrund der erheblichen Druckbelastung eine starke Rechtsherzhypertrophie. Das Verhältnis des Nassgewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* (RV/(LV+S)) betrug bei „sham“-operierten Siah1/2WT $0,24 \pm 0,01$ und bei „sham“-Siah1/2KO Mäusen $0,28 \pm 0,01$. PAB-WT zeigten eine Herzratio von $0,46 \pm 0,01$, während Siah1/2KO Tiere eine signifikant höhere Herzratio von $0,60 \pm 0,03$ aufwiesen (Abb. 3.4.4).

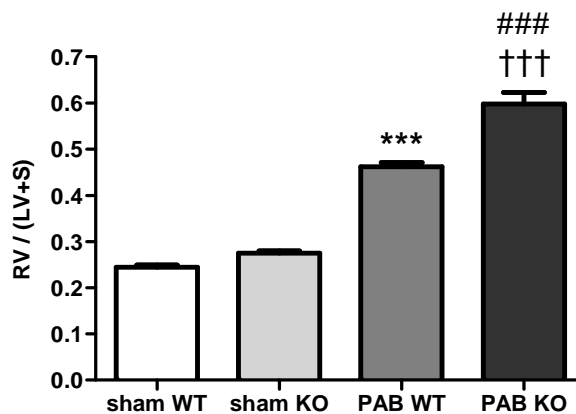


Abbildung 3.4.4: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* (RV/(LV+S)) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO, (†††) $p < 0,001$ PAB WT vs. PAB KO) sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.5 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Der durch das Verhältnis von rechtem Ventrikel zu Körpergewicht ermittelte Hypertrophiegrad stimmte auch bei der Siah1/2 „banding“-Gruppe mit dem durch die Herzratio ermittelten Ergebnis überein. Scheinoperierte WT-Mäuse zeigten eine Ratio des rechten Ventrikels zum Körpergewicht von $0,75 \pm 0,02$ und Siah1/2KO Tiere von $0,79 \pm 0,03$. Nach drei-wöchigem „banding“ betrug die Ratio bei WT $1,32 \pm 0,02$, während Siah1/2KO Tiere einen signifikant höheren Wert von $1,66 \pm 0,07$ aufwiesen. Die Werte

beider PAB-Tiergruppen erwiesen sich als hoch signifikant gegenüber denjenigen der „sham“-Gruppen erhöht (Abb. 3.4.5).

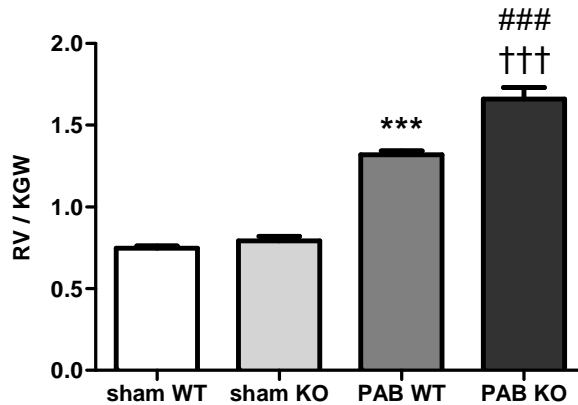


Abbildung 3.4.5: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht (RV/KGW) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO, (†††) $p < 0,001$ PAB WT vs. PAB KO) sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.6 Verhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Tibiallänge als Maß der Rechtsherzhypertrophie

Aufgrund der gegensätzlichen Ergebnisse des rechtsventrikulären Hypertrophiegrades der Siah1/2 KO Mäuse im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ verglichen mit der Siah1/2 Hypoxiegruppe, sowie mit den Ergebnissen der Siah2 Linie in beiden Mausmodellen, wurde zusätzlich das Verhältnis des Gewichts des rechten Ventrikels zur Tibiallänge bestimmt. Es wurde somit ausgeschlossen, dass durch die Deletion des *siah1a* Genes bedingte, spezifische Entwicklungen der Körper- und Herzgrößen sowie -massen den errechneten Grad der Hypertrophie beeinflussen. Scheinoperierte WT zeigten einen Quotienten von rechtem Ventrikel geteilt durch Tibiallänge von $1,20 \pm 0,06$ und Siah1/2KO Mäuse von $1,30 \pm 0,07$. Drei Wochen *post operationem* betrug die Ratio bei „banding“-operierten WT $2,06 \pm 0,13$, während Siah1/2KO Tiere einen signifikant niedrigeren Wert von $2,65 \pm 0,18$ aufwiesen. Der ermittelte Hypertrophiegrad stimmte somit mit dem durch die Herzratio und Ratio von rechtem Ventrikel zu Körpergewicht ermittelten Ergebnis überein (Abb. 3.4.6).

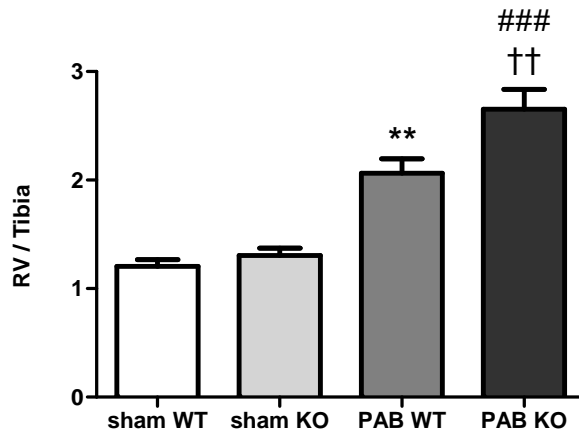


Abbildung 3.4.6: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu Tibialänge (RV/Tibia) der *Siah1/2* Gruppe (sham WT n=5, sham KO und PAB KO n=7, PAB WT n=4) im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. (**p<0,01 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, ††p<0,01 PAB WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.7 Gewichtsverhältnis zwischen rechtem *Atrium* und Körpergewicht als Maß des Rechtsherzversagens

„Sham“-WT Mäuse zeigten einen Quotienten des rechten *Atrium* zum Körpergewicht von $0,12 \pm 0,01$ und *Siah1/2*KO Mäuse von $0,13 \pm 0,01$. Die „banding“-Operation führte zu einem signifikanten Anstieg dieser Verhältnisgröße in beiden Linien, wobei der Zahlenwert bei WT Mäusen $0,21 \pm 0,01$ betrug, während die *Siah1/2*KO Tiere einen signifikant höheren Wert von $0,34 \pm 0,03$ aufwiesen (Abb. 3.4.7).

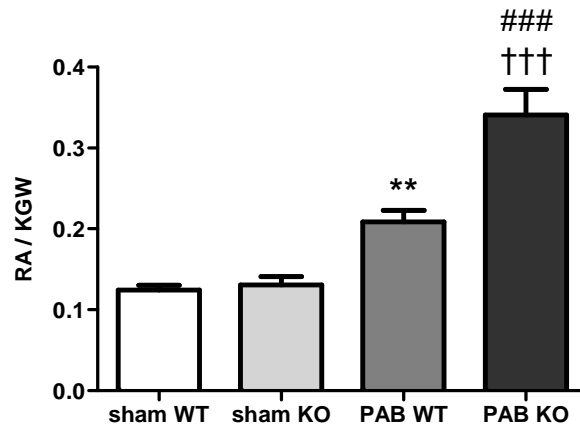


Abbildung 3.4.7: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem *Atrium* zum Körpergewicht (RA/KGW) der *Siah1/2* Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. (** $p < 0,01$ sham WT vs. PAB WT, ### $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO, ††† $p < 0,001$ PAB WT vs. PAB KO) sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.8 Echokardiografische Untersuchungen

Auch im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ wurden zur Analyse des kardialen Remodeling und der rechtsventrikulären Funktion echokardiografische Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov durchgeführt.

3.4.8.1 Rechter Ventrikel und rechtes Atrium

„Banding“-operierte Mäuse beider Linien zeigten im Vergleich zu „sham“-Kontrolltieren eine starke Zunahme der rechtsventrikulären Wanddicke. Es bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich dieser Zunahme zwischen WT und *Siah1/2*KO Mäusen (Abb. 3.4.8, Tab. 3.4.1).

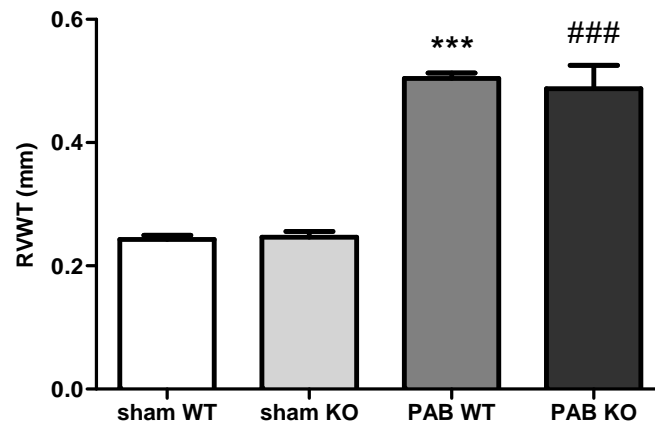


Abbildung 3.4.8: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT, right ventricular wall thickness) der *Siah1/2* Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. PAB KO n=7, andere n=8. Endpunktmessung nach 3 Wochen. (***) $p < 0,001$ sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

„Banding“-operierte WT und *Siah1/2*KO Mäuse wiesen eine Zunahme des rechtsventrikulären Durchmessers auf. Diese war bei *Siah1/2*KO Tieren signifikant stärker ausgeprägt als bei WT Mäusen (Abb. 3.4.9, Tab. 3.4.1).

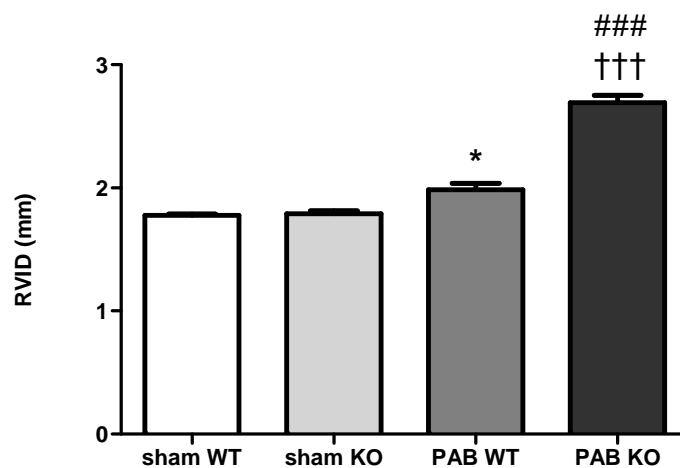


Abbildung 3.4.9: Rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID, right ventricular internal diameter) der *Siah1/2* Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Endpunktmessung nach 3 Wochen. PAB KO n=7, andere n=5. (* $p < 0,05$ sham WT vs. PAB WT, (###) $p < 0,001$ sham KO vs. PAB KO, ††† $p < 0,001$ PAB WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

Am Ende des Versuchszeitraumes zeigten „banding“-operierte WT sowie Siah1/2KO Mäuse einen vergrößerten rechten Vorhof. Die Zunahme der rechtsatrialen Querschnittsfläche war bei Siah1/2KO Mäusen signifikant höher als bei WT-Tieren (Abb. 3.4.10, Tab. 3.4.1).

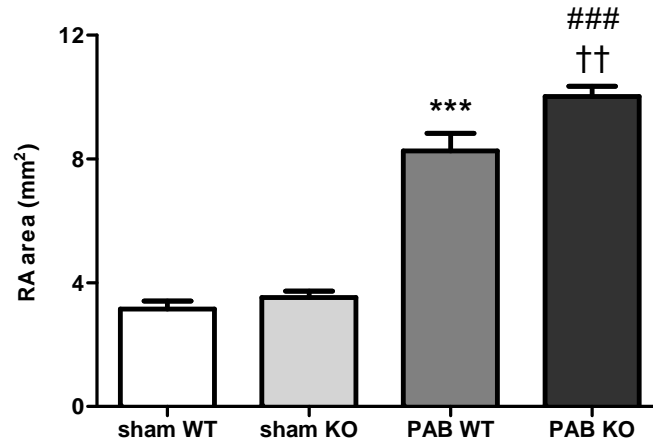


Abbildung 3.4.10: Enddiastolische Querschnittsfläche des rechten *Atrium* (RA area, right atrial area) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalerteriellen „banding“. PAB KO n=6, PAB WT n=4, sham WT/KO n=5. Endpunktmessung nach 3 Wochen. (**p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, ††p<0,01 PAB WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalerteriell „banding“, WT =C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

In der folgenden Tabelle sind die Messwerte noch einmal detailliert aufgeführt:

3 Wochen	BL/6J sham			Siah1/2KO sham			BL/6J PAB				Siah1/2KO PAB			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
RVWT (mm)	0,24	0,01	8	0,25	0,01	8	0,50	0,01	8	***	0,49	0,04	7	###
RVID (mm)	1,78	0,01	5	1,79	0,03	5	1,99	0,05	5	*	2,69	0,06	7	††† ###
RA area (mm²)	3,15	0,26	5	3,52	0,21	5	8,26	0,57	4	***	10,01	0,34	6	†† ###

Tabelle 3.4.1: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT), rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID) und enddiastolische Querschnittsfläche des rechten *Atrium* (RA area) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalerteriellen „banding“. Endpunktmessung nach 3 Wochen. (*p<0,05, ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, ††p<0,01, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalerteriell „banding“, WT =C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.8.2 Cardiac output

Sowohl WT als auch Siah1/2KO Mäuse zeigten nach dem pulmonalarteriellen „banding“ ein signifikant herabgesetztes Herzminutenvolumen. Der cardiac output (CO) der „banding“-operierten Siah1/2KO Tiere war bereits eine Woche *post operationem* signifikant niedriger im Vergleich zum CO der WT-Mäuse (Abb. 3.4.11, Tab. 3.4.2).

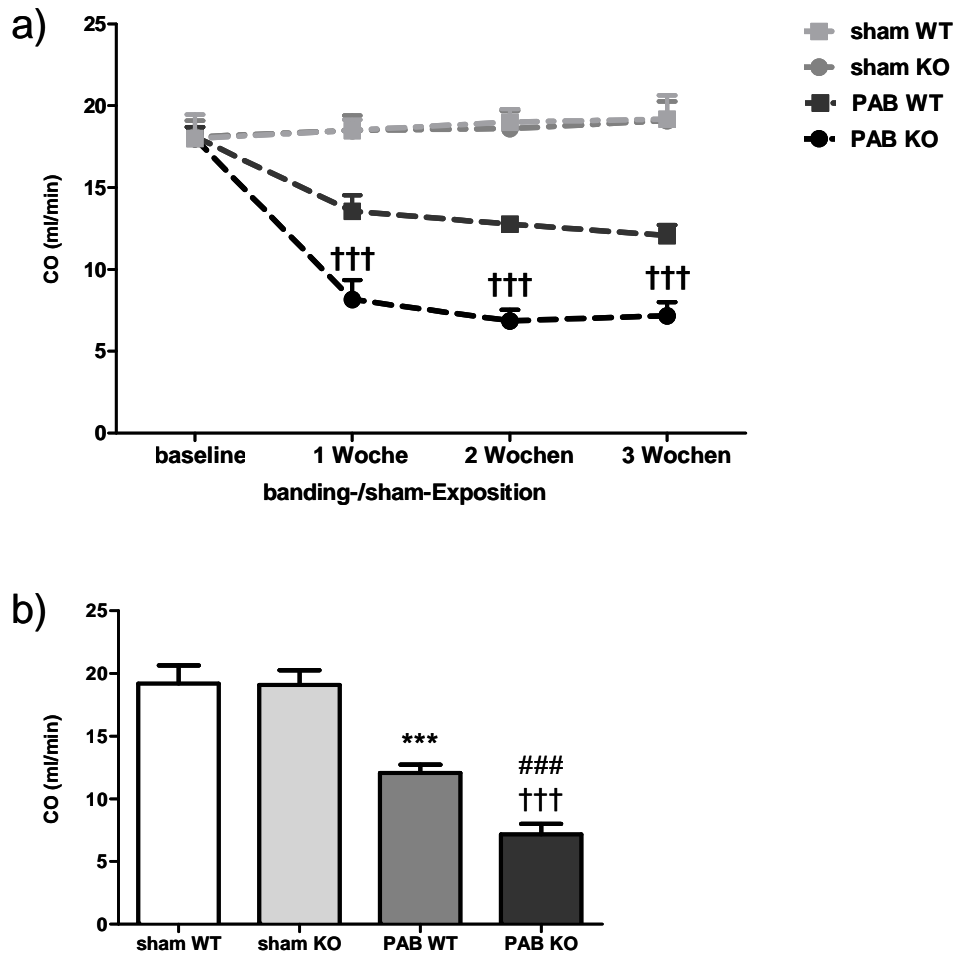


Abbildung 3.4.11: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ (sham WT n=5, sham KO/PAB WT n=6, PAB KO n=7). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur PAB WT vs. PAB KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.4.2 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 3 Wochen ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT =C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

CO (ml/min)	BL/6J sham			Siah1/2KO sham			BL/6J PAB				Siah1/2KO PAB			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	18,0	1,5	5	18,1	1,0	6	18,1	0,6	6		18,0	0,5	7	
1 Woche	18,5	0,7	5	18,5	0,9	6	13,6	1,0	6	**	8,2	1,2	7	††† ###
2 Wochen	19,0	0,8	5	18,6	1,1	6	12,8	0,4	6	***	6,9	0,7	7	††† ###
3 Wochen	19,2	1,5	5	19,1	1,2	6	12,1	0,7	6	***	7,2	0,8	7	††† ###

Tabelle 3.4.2: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Verlaufskontrolle **p<0,01, ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.8.3 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels

„Banding“-operierte WT sowie Siah1/2KO Mäuse zeigten im Vergleich zu ihren scheinoperierten Kontrollen *post operationem* eine deutlich eingeschränkte systolische Funktion des rechten Ventrikels. Bereits nach einer Woche war diese Funktionsminderung bei „banding“-operierten Siah1/2KO Tieren signifikant stärker ausgeprägt als bei WT-Mäusen (Abb. 3.4.12, Tab. 3.4.3).

TAPSE (mm)	BL/6J sham			Siah1/2KO sham			BL/6J PAB				Siah1/2KO PAB			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	1,39	0,03	6	1,40	0,02	6	1,37	0,02	6		1,39	0,04	7	
1 Woche	1,38	0,02	6	1,39	0,03	6	1,04	0,05	6	***	0,76	0,07	7	††† ###
2 Wochen	1,39	0,01	6	1,39	0,03	6	1,04	0,08	6	***	0,63	0,02	7	††† ###
3 Wochen	1,38	0,05	6	1,44	0,02	6	1,06	0,05	6	***	0,66	0,04	7	††† ###

Tabelle 3.4.3: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Verlaufskontrolle ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarteriell „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

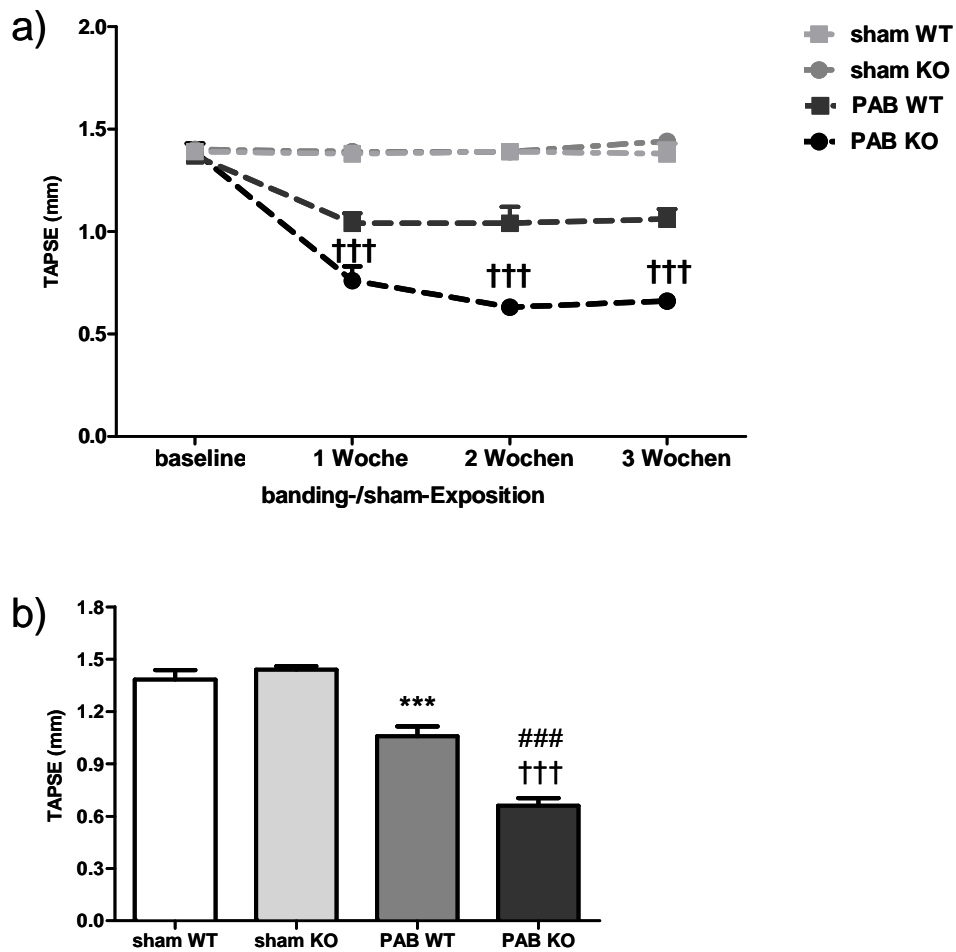


Abbildung 3.4.12: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der *Siah1/2* Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ (PAB KO n=7, andere n=6). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur PAB WT vs. PAB KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.4.3 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 3 Wochen ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT =C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.8.4 IVRT/RR – diastolische Funktion des rechten Ventrikels

Die diastolische Funktion des rechten Ventrikels war eine Woche *post operationem* bei „banding“-operierten WT und Siah1/2KO Mäusen in gleichem Maße herabgesetzt. Nach zwei Wochen zeigten „banding“-operierte Siah1/2KO Tiere eine progrediente, signifikant stärkere Funktionseinschränkung im Vergleich zu den WT Mäusen (Abb. 3.4.13, Tab. 3.4.4).

IVRT/RR (%)	BL/6J sham			Siah1/2KO sham			BL/6J PAB				Siah1/2KO PAB			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	14,5	0,5	6	16,8	0,7	6	14,0	0,5	6		17,0	0,8	7	
1 Woche	14,6	0,5	6	16,5	0,5	6	19,2	0,9	6	**	20,4	0,9	7	#
2 Wochen	15,0	0,4	6	16,4	0,6	6	20,1	1,5	6	**	26,6	1,3	7	††† ###
3 Wochen	15,5	0,7	6	16,5	0,8	6	20,1	1,5	6	**	31,4	1,4	7	††† ###

Tabelle 3.4.4: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Verlaufskontrolle **p<0,01 sham WT vs. PAB WT, #p<0,05, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT =C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

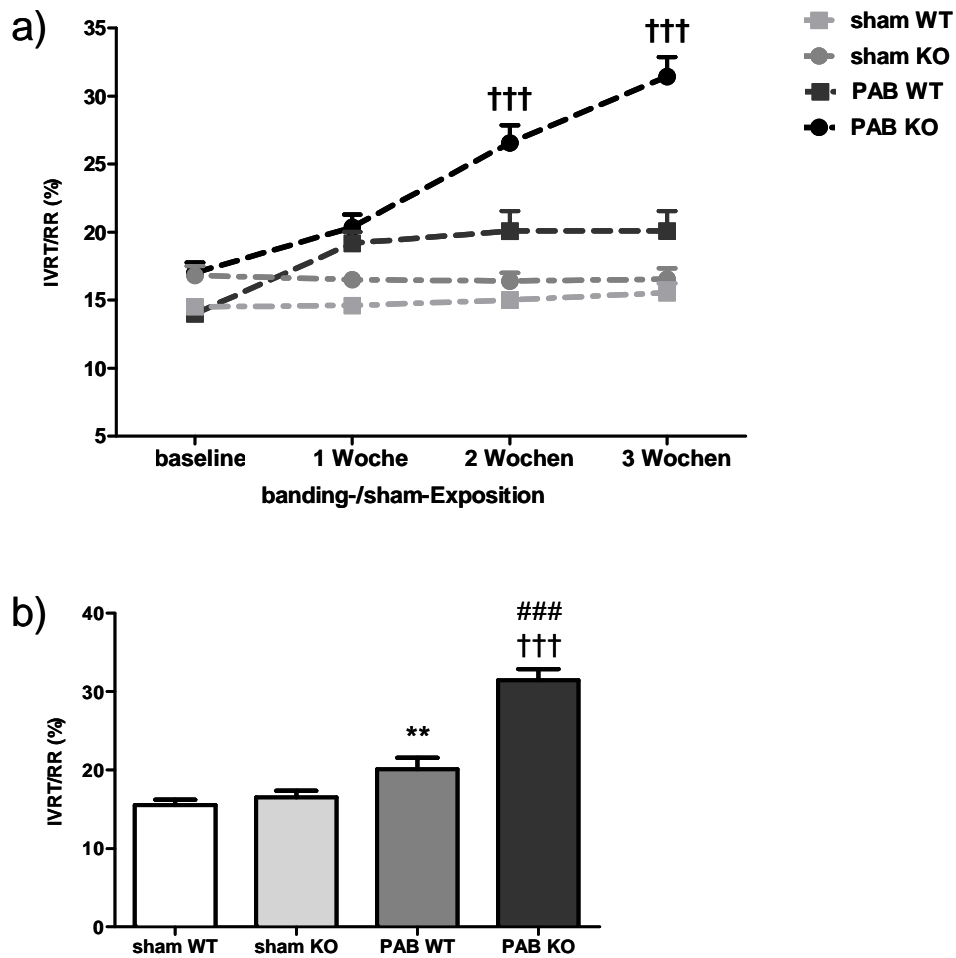


Abbildung 3.4.13: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der *Siah1/2* Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ (PAB KO n=7, andere n=6). Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur PAB WT vs. PAB KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.4.4 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 3 Wochen **p<0,01 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT =C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.8.5 MPI – globale Funktion des rechten Ventrikels

Eine Woche *post operationem* wiesen „banding“-operierte WT und Siah1/2KO Mäuse eine deutliche Verschlechterung der globalen Funktion des rechten Ventrikels auf. Die die „banding“-Gruppe betreffende Funktionsminderung war bei Siah1/2KO Tieren signifikant stärker ausgeprägt als bei WT-Mäusen (Abb. 3.4.14, Tab. 3.4.5).

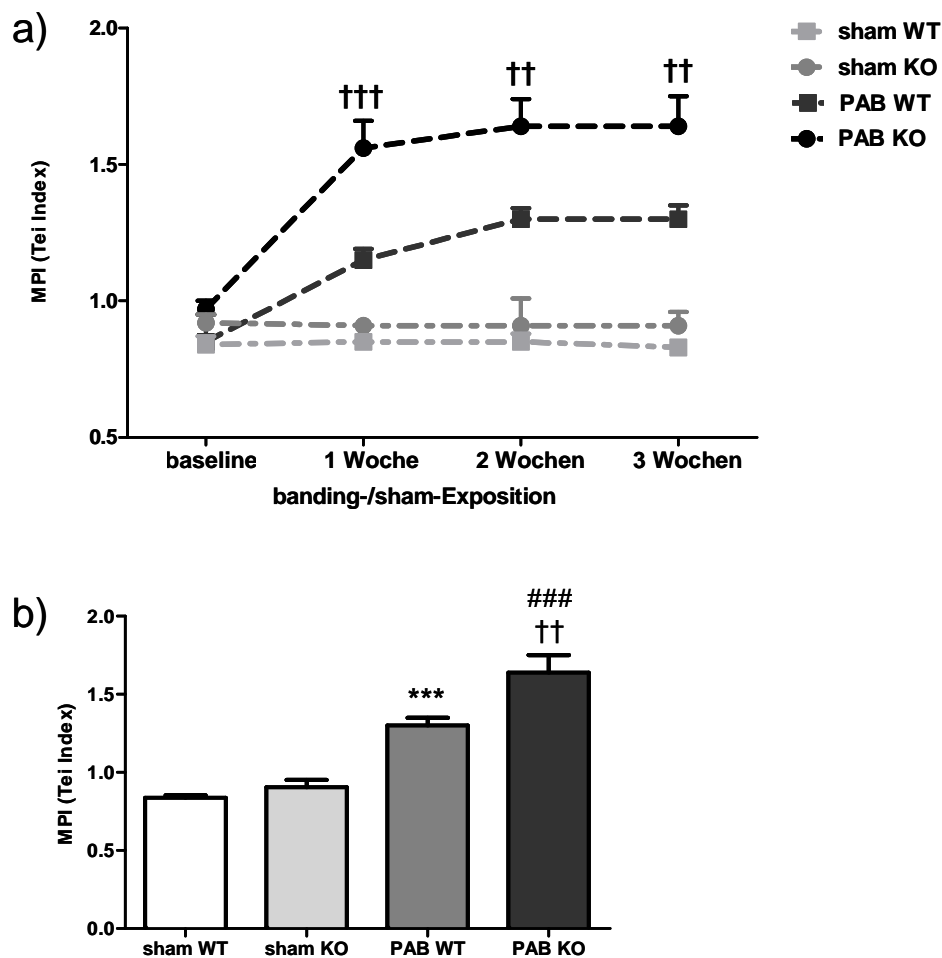


Abbildung 3.4.14: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. a) Verlaufskontrolle ††p<0,01, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO, aus Gründen der Übersicht wurde nur PAB WT vs. PAB KO verglichen, weitere Signifikanzen sind Tabelle 3.4.5 zu entnehmen. b) Endpunktmessung nach 3 Wochen ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, ††p<0,01 PAB WT vs. PAB KO. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT =C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

MPI	BL/6J sham			Siah1/2KO sham			BL/6J PAB				Siah1/2KO PAB			
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n		MW	SEM	n	
baseline	0,84	0,03	6	0,92	0,03	6	0,85	0,10	6		0,97	0,03	7	
1 Woche	0,85	0,01	6	0,91	0,01	6	1,15	0,04	6	**	1,56	0,10	7	††† ###
2 Wochen	0,85	0,03	6	0,91	0,10	6	1,30	0,04	6	***	1,64	0,10	7	†† ###
3 Wochen	0,83	0,01	6	0,91	0,05	6	1,30	0,05	6	***	1,64	0,11	7	†† ###

Tabelle 3.4.5: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. Verlaufskontrolle **p<0,01, ***p<0,001 sham WT vs. PAB WT, ###p<0,001 sham KO vs. PAB KO, ††p<0,01, †††p<0,001 PAB WT vs. PAB KO. Analyse mit Two-way ANOVA und Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test. sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1*^{+/-} 2^{-/-}.

3.4.8.6 Zusammenfassung der echokardiografischen Befunde

Sowohl „banding“-operierte WT als auch Siah1/2KO Mäuse entwickelten eine ausgeprägte Rechtsherzhypertrophie, einhergehend mit einer erheblichen Beeinträchtigung der globalen rechtsventrikulären Funktion. Diese Funktionsminderung war bei Siah1/2KO Mäusen bereits nach einer Woche signifikant stärker ausgeprägt als bei WT-Tieren. Weiterhin zeigten Siah1/2KO Mäuse eine signifikant stärkere Zunahme der rechtsatrialen Querschnittsfläche sowie eine auffallend starke rechtsventrikuläre Dilatation.

3.4.9 Prozentualer Kollagenanteil des rechten Ventrikels

Drei Wochen *post operationem* zeigten sowohl „banding“-operierte WT als auch Siah1/2KO Tiere einen signifikanten Anstieg des Anteils an kollagenen Fasern und somit eine Fibrose des rechten Ventrikels. Der Kollagengehalt betrug bei PAB-WT $7,34 \pm 0,89$ % und bei Siah1/2 KO Mäusen $7,10 \pm 1,26$ %. Die „sham“-operierten Tiere wiesen rechtsventrikuläre Kollagengehalte von lediglich $0,75 \pm 0,07$ % in der WT und $1,22 \pm 0,11$ % in der Siah1/2KO Gruppe auf. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO Mäusen der „banding“-Gruppe (Abb. 3.4.15).

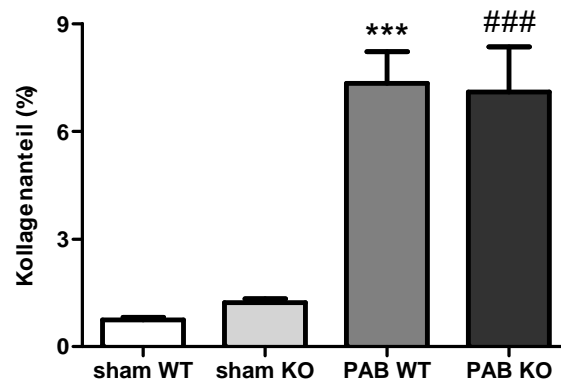


Abbildung 3.4.15: Darstellung des prozentualen Kollagenanteiles (%) des rechten Ventrikels der Siah1/2 Gruppe (sham WT/KO n=5, PAB WT n=7, PAB KO n=6) im Modell des pulmonalarteriellen „banding“. (***) $p < 0,001$ PAB WT vs. sham WT, (###) $p < 0,001$ PAB KO vs. sham KO). sham = Scheinoperation, PAB = pulmonalarterielles „banding“, WT = C57BL/6J, KO = *siah1a*^{+/-} 2^{-/-}.

4. Diskussion

4.1 Wahl der Tiermodelle

An der Pathogenese der PH sind zahlreiche Mechanismen beteiligt. Dazu gehören Gefäßproliferation, Vasokonstriktion, Inflammation und Thrombose. Jeder dieser Mechanismen wird von einer komplexen Interaktion unterschiedlicher Zelltypen getragen (Olschewski and Seeger, 1994; Stenmark et al., 2006b). Eine Erforschung dieser vielschichtigen Erkrankung ist daher nicht durch Zellkulturversuche möglich, sondern muss am Gesamtorganismus erfolgen.

4.1.1 Chronische Hypoxie

Unabhängig von der Ätiologie zeigen alle Patienten mit einer PH strukturelle Veränderungen der pulmonalen Gefäßbahn, eine rechtsventrikuläre Hypertrophie und terminal ein rechtsventrikuläres Versagen (van Suylen et al., 1998). Heute steht eine Reihe von verschiedenen Tiermodellen zur Untersuchung der PH zu Verfügung, wobei die chronische Hypoxie und das Monocrotalinmodell am häufigsten angewendet werden (Stenmark et al., 2009). Aktuell existiert allerdings kein Tiermodell, das in der Lage ist, alle pathologischen Veränderungen der humanen PH exakt nachzuahmen. Die Tatsache, dass in einem Tiermodell nicht alle pathologischen Veränderungen der PH nachvollzogen werden können, ist auch der Tatsache geschuldet, dass die humane PH unterschiedliche Ursachen aufweist und bei verschiedenen Formen der PH unterschiedliche vaskuläre Komponenten beteiligt sind. Dies kommt auch in der Klassifikation der PH (Hoepfer, 2009; Simonneau et al., 2009) zum Ausdruck. Trotzdem steht außer Frage, dass die Verwendung der vorhandenen Tiermodelle einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der verschiedenen Entstehungsmechanismen der PH erbracht hat (und auch weiterhin erbringen wird).

Eine chronische Hypoxie führt bei fast allen Säugetieren zu sehr ähnlichen strukturellen Veränderungen der pulmonalen Gefäße: Es erfolgen eine *de-novo* Muskularisierung von vormals nicht-muskularisierten kleinen Arteriolen, eine Zunahme der Muskularisierung kleiner präkapillärer Arterien, eine Proliferation und Hypertrophie der glatten Muskelzellen der *Media* sowie eine Inflammation. Weiterhin entwickelt sich eine Fibrose und damit einhergehende Verdickung der Gefäßwand der großen pulmonalen Gefäße. Das Ausmaß

dieser Prozesse variiert allerdings tierart- und altersabhängig, sowie individuell (Stenmark et al., 2009; Weissmann et al., 2006a).

Chronische Hypoxie gilt seit vielen Jahren als ein anerkanntes Tiermodell zur Induktion und Simulation der PH und wurde in der Vergangenheit und wird auch aktuell erfolgreich zur Erforschung der komplexen Signaltransduktionswege, die eine Rolle in der Pathogenese der PH spielen, sowie zur Entwicklung neuer Therapieansätze, eingesetzt (Dumitrascu et al., 2006; Mittal et al., 2012; Naeye, 1967; Weissmann et al., 2003).

Mäuse zeigen nur eine schwache (und Ratten eine mittel starke) Reaktion auf chronische Hypoxie, deshalb ist das Modell der durch chronische Hypoxie induzierten PH bei Nagetieren ein besonders gutes Modell für die in Gruppe 3 der Dana Point Klassifizierung zusammengefassten weniger schweren Formen der PH (Ryan et al., 2011). Zur Simulation der in Gruppe 1 repräsentierten Formen der humanen PAH (wie IPAHA und FPAHA) sind heute weitere Mausmodelle vorhanden, welche die schwerwiegenden, irreversiblen Gefäßveränderungen im Verlauf dieser Krankheitsbilder exakter nachahmen als das Modell der chronischen Hypoxie. (Nagetiere bilden in Hypoxie keine *Neointima* oder plexiformen Läsionen aus, die für eine humane PAH der Gruppe 1 typisch sind.) Beispiele sind die Hypoxieexposition serotoninüberexprimierender Mäuse und BMPR2-Mutations-Modelle (Ryan et al., 2011; Stenmark et al., 2009). Neben der chronischen Hypoxieexposition von Nagetieren existieren Versuchsdesigns mit Großtieren wie Primaten, Kühen, Schafen und Schweinen. Diese Tiere stellen partiell besser geeignete Versuchsmodelle dar, da sie Verlaufsformen zeigen, die bei Nagetieren nicht existieren. So bilden z. B. hypoxieexponierte Kälber, im Vergleich zu Ratten und Mäusen, eine sehr viel stärkere PH mit aggressiven Gefäßveränderungen aus (Belknap et al., 1997). Einschränkungen bei der Verwendung von Großtieren sind allerdings ein höherer Kostenaufwand, eine langsamere Krankheitsentwicklung und eine schlechtere Akzeptanz in der Gesellschaft (Ryan et al., 2011). Die Vorteile der Maus sind ein schneller Reproduktionszyklus, eine hohe Wurfgröße und geringer Platzbedarf, niedrige Haltungskosten und ein geringer Bedarf an Wirkstoffen bei pharmakologischen Studien. Ein weiterer enormer Vorzug ist die vollständige Entschlüsselung des Genoms der Maus mit der Möglichkeit zur Generierung von knockout Tieren oder der Überexprimierung von spezifischen Genen (Tarnavski, 2009; Tarnavski et al., 2004), was die Erforschung der Pathogenese der PH auf molekularer Ebene ermöglicht. Es bestehen einige molekularbiologische Parallelen zwischen der Hypoxie-induzierten PH der Maus und der PH des Menschen. Bei beiden Krankheitsbildern erfolgt eine vermehrte

Expression von bestimmten Wachstumsfaktoren, wie z. B. PDGF, VEGF und seinen Rezeptoren, der α - und β -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF1 sowie verschiedener Entzündungsmediatoren, wie z. B. IL-1 und IL-6 (Budhiraja et al., 2004; Humbert et al., 1998; Stenmark et al., 2006b). Man muss diese Gemeinsamkeiten in der Proteinexpression allerdings sorgfältig prüfen, da es bereits innerhalb einer Tierordnung erhebliche Unterschiede geben kann. So konnte für Hypoxie-exponierte Mäuse und Ratten in Microarrayexperimenten gezeigt werden, dass die Genexpressionsprofile stark differieren (Bull et al., 2007).

4.1.2 Pulmonalarteriell „banding“

Die Drucküberladung des rechten Ventrikels infolge des pulmonalarteriellen „banding“ ermöglicht es, eine von der pulmonalen Gefäßstrombahn unabhängige rechtsventrikuläre Hypertrophie zu erzeugen und zu untersuchen. Weiterhin werden Effekte einer globalen Hypoxie (und der damit verbundenen genregulatorischen Antwort) auf das Myokard ausgeschlossen. Andere Tiermodelle der PH bringen zusätzlich zu einer Erhöhung der Nachlast weitere Variablen ins Spiel, die druckunabhängig zu veränderten Genexpressionsprofilen im rechten Ventrikel führen können (Urashima et al., 2008).

Im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ wurden nur männliche Tiere untersucht, da in einer Vielzahl von Untersuchungen in Tiermodellen sowie am Menschen selbst gezeigt werden konnte, dass bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen. Weibliche Individuen zeigen im Vergleich zu männlichen bei einer zugrunde liegenden Drucküberlastung des Herzens eine geringere Hypertrophie, einen anderen Hypertrophie-Typ (konzentrisch) sowie eine besser erhaltene Herzfunktion. Ebenso weisen sie eine geringere Apoptoserate der Kardiomyozyten auf. Die Dekompensation einer Drucküberlastung und ein daraus resultierendes Herzversagen treten in Folge der oben aufgeführten Unterschiede bei männlichen Individuen früher auf. Die zugrundeliegenden molekulargenetischen Mechanismen sind derzeit noch recht wenig erforscht (Bernardo et al., 2010; Mendelsohn, 2005). Teilweise werden die geschlechtsspezifischen Differenzen einer kardioprotektiven Wirkung der Östrogene zugeschrieben (Tamura et al., 1999).

Die erste detaillierte Anleitung für ein PAB bei der Maus lieferte Rockman 1994. Er charakterisierte darin die mit einem PAB einhergehenden kardialen Veränderungen und zeigte, dass ein starkes „banding“ der Pulmonalarterie mit einer reproduzierbaren rechtsventrikulären Dysfunktion aufgrund einer Dilatation von Kammer und *Atrium* sowie

Regurgitation der Trikuspidalklappe einhergeht. Ein moderates „banding“ resultiert hingegen in einer Hypertrophie mit Erhaltung der rechtsventrikulären Funktion. Rockman schlussfolgerte, dass der murine kardiale Phänotyp infolge des starken „banding“ der PA der humanen rechtsventrikulären Dysfunktion im Verlauf einer PAH ähnelt (Rockman et al., 1994). Urashima et al. folgten 2008 mit einer Publikation, in der sie eine detaillierte Beschreibung der Methode und echokardiografische Untersuchungsergebnisse von „banding“-operierten Mäusen mit verschiedenen Erkrankungsgraden veröffentlichten. Mäuse, die ein starkes PAB erhielten, zeigten echokardiografisch eine deutliche rechtsventrikuläre Dysfunktion mit starker Dilatation, Abflachung bzw. Beugung des *Septums* und trikuspidaler Regurgitation. Auch der linke Ventrikel war durch paradoxe Septumbewegungen, ventrikuläre Dyssynchronie und eine geringere linksventrikuläre diastolische Dimension beeinträchtigt. Das Herzminutenvolumen war reduziert (Urashima et al., 2008). Diese Ergebnisse untermauern die Eignung des murinen PAB-Modells, eine rechtsventrikuläre Dysfunktion wie sie mit einer Dekompensation des rechten Ventrikels im Verlauf einer PH einhergeht, nachzustellen. Weiterhin veröffentlichten Urashima et al. in ihrer Studie die Gewichtsverhältnisse von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht. Mäuse in der Kategorie des moderaten „banding“ zeigten einen Quotienten von $1,41 \pm 0,15$ und Tiere in der Gruppe des starken „banding“ eine Ratio von $1,70 \pm 0,28$ (Urashima et al., 2008). Die Werte der in der vorliegenden Arbeit „banding“-operierten Siah2WT, Siah2KO und BL/6J Mäuse entsprechen mit $1,33 \pm 0,06$, $1,21 \pm 0,04$ und $1,32 \pm 0,02$ denen der als moderat eingeteilten Tiere, während Siah1/2KO Mäuse mit einem Quotienten von $1,66 \pm 0,07$ der Gruppe des schweren „banding“ zuzuordnen sind.

Tarnavski et al. beschrieben das PAB aufgrund der zarten Wand des *Truncus pulmonalis* und der geringen Toleranz des rechten Ventrikels als eine extrem komplizierte Methode (Tarnavski, 2009) und Urashima et al. veröffentlichten eine Überlebensrate von nur 92% der „banding“-operierten Mäuse (Urashima et al., 2008). In der vorliegenden Studie war die Überlebensrate der „banding“-operierten Tiere deutlich höher. Dies mag an der modifizierten Operationsmethode liegen. Statt eine umgebogene und entgratete 25 – 27 G Kanüle unter die Pulmonalarterie zu schieben und diese anschließend mit einem Faden zu ligieren (Rockman et al., 1994; Urashima et al., 2008) wurde die Stenose mittels eines kleinen Titaniumclips, der mit einem Clipapplier um die *A. pulmonalis* gelegt wurde, gesetzt. Durch die minimale Manipulationsdauer bei der Applikation des Clips wird die Blutzufuhr zur Lunge nur wenige Sekunden unterbunden. Weiterhin hat der Clip eine

gewebeschonende breitere Auflagefläche auf der Arterie und schneidet nicht, wie ein Faden, ein. Ebenfalls kann durch die Verwendung des Clips eine bei jedem Tier nahezu äquivalente Stenose produziert werden, die eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet. Urashima et al. stellten in ihrer Veröffentlichung deutlich heraus, wie wichtig es ist, „sham“-operierte Tiere als Kontrollen zu verwenden, da es bereits durch eine „sham“-Operation zu Veränderungen der Genexpression kommt (Zhao et al., 2004).

Im Modell des murinen PAB gelten, wie auch im Hypoxiemodell, die Limitationen der Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen. Speziesunterschiede müssen beachtet und die Ergebnisse müssen in Experimenten an größeren Säugetieren bestätigt werden (Urashima et al., 2008).

4.2 Interpretation der physiologischen, histologischen und echokardiografischen Untersuchungsergebnisse der Siah Mäuse im Modell der chronischen Hypoxie

4.2.1 Physiologische Parameter

Alle Mäuse der Hypoxiegruppen zeigten in den ersten drei bis vier Tagen des Versuches eine Gewichtsabnahme. Diese kann einer initial einsetzenden Diurese infolge der hypoxischen Bedingungen zugeschrieben werden. Ziel dieser Flüssigkeitsausschwemmung ist eine Hämokonzentration mit Steigerung der Sauerstofftransportkapazität durch eine Reduktion des Plasmavolumens. Im Rahmen der Akklimatisierung erfolgt eine Steigerung der Erythropoese durch die Ausschüttung von Erythropoietin. Dieser Prozess benötigt allerdings einige Tage, so dass die initiale Adaptation von den frühen Veränderungen des Flüssigkeitshaushaltes getragen wird (Semenza, 1998; Trubsbach et al., 2011; Woods et al., 2011). Alle Mäuse, die unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, zeigten nach vier Wochen einen signifikanten Anstieg des Hämatokritwertes. Dieser Hämatokritanstieg kann folglich als Kontrollparameter für die hypoxischen Versuchsbedingungen herangezogen werden.

Während der hämodynamischen Messung am Ende des Versuches wiesen alle Hypoxie-exponierten Mäuse signifikant oder tendenziell niedrigere SAP Werte als die normoxischen Kontrollgruppen auf. Dieses Phänomen lässt sich durch eine Hypoxie-bedingte systemische Vasodilatation erklären (Weissmann et al., 2006b). Verschiedene Studien zu chronischer

Höhenexposition von Menschen zeigten ebenfalls einen erniedrigten Blutdruck (Hanna, 1999; Marticorena et al., 1969); selbst Personen, die ihr gesamtes Leben in großer Höhe verbringen weisen eine Hypotension auf (Weitz, 1982).

Der rechtsventrikuläre Druck und die Gewichtsverhältnisse von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus *Septum* und des rechten Ventrikels zum Körpergewicht (im Folgenden als Rechtsherzratios bezeichnet) waren bei allen hypoxischen Mäusen signifikant erhöht. Die höheren Rechtsherzgewichte hypoxischer Mäuse weisen auf eine vorliegende Rechtsherzhypertrophie hin. Ein Hypoxie-induzierter Druckanstieg im rechten Ventrikel mit resultierender Hypertrophie ist ein seit vielen Jahren bei Mensch und Tier bekanntes Phänomen (Heath et al., 1973; Meyrick and Reid, 1983; Stenmark et al., 2009). Wie in 1.2 ausführlich beschrieben, führen die hypoxiebedingte pulmonale Vasokonstriktion und das vaskuläre Remodeling zu einer Steigerung der rechtsventrikulären Nachlast durch Zunahme des pulmonal-vaskulären Widerstandes bei gleichzeitig verminderter Compliance. Der rechte Ventrikel reagiert zunächst mit einer kompensatorischen Hypertrophie, die terminal in einer rechtsventrikulären Dekompensation mündet (Schermuly et al., 2011; Stenmark et al., 2006b; Weitzenblum, 2003).

Die Herzratios waren bei hypoxischen *Siah2KO* und *Siah1/2KO* Mäusen signifikant niedriger als bei ihren WT-Kontrollen. Dies bedeutet, dass die KO-Tiere auf den hypoxischen Stimulus mit einer geringeren Rechtsherzhypertrophie reagieren. *Siah1/2KO* Mäuse wiesen weiterhin einen geringeren Anstieg des RVSP verglichen mit ihren WT-Kontrollen auf. Bei *Siah2KO* Tieren war der rechtsventrikuläre Druckanstieg ebenso hoch wie bei den *Siah2WT*. Dies spricht für einen positiven Effekt des Fehlens der *Siah*-Ubiquitinligasen auf die klinische Ausprägung der PH mit einer Wirkungspotenzierung durch Deletion beider *Siah*-Proteine.

4.2.2 Histologische Parameter

Die histologischen Schnitte zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades der pulmonalen Gefäße wurden mit Hilfe der „Anti-alpha-Aktin/von Willebrand Faktor-Färbung“ markiert. Dies ist eine etablierte Methode zur Darstellung der glatten Muskelzellen (durch alpha-Aktin) und einer quantitativen Auswertung der muskularisierten Gefäßwandareale (Angelini et al., 2010; Dahal et al., 2011; Schermuly et al., 2005; Yin et al., 2012). Die Zunahme glatter Muskelzellen im Rahmen der Pathogenese der PH betrifft vor allem die *Media*, kann aber auch Bereiche der *Intima* erfassen. Weiterhin erfolgt eine Anhäufung von Fibroblasten

und extrazellulären Matrixproteinen, die zu einer Verdickung der *Adventitia* führen (Stenmark et al., 2006a; Stenmark et al., 2006b). Hypoxische Mäuse zeigen trotz eines deutlichen Anstieges des rechtsventrikulären Druckes nur ein geringgradiges vaskuläres Remodeling (Stenmark et al., 2009). In der vorliegenden Studie wiesen hypoxische Mäuse aller Linien einen signifikanten Anstieg der Muskularisierung (etwa 20-22%) und der Wandstärke (etwa 4-6%) der kleinen pulmonalen Arterien auf. Trotz der geringeren Rechtsherzhypertrophie beider knockout-Linien und der geringeren rechtsventrikulären Drücke der Siah1/2KO Mäuse zeigten diese keine Unterschiede in der Muskularisierung der pulmonalen Gefäße. Um zu untersuchen, ob bei den Mauslinien Unterschiede im Gefäßremodeling bestehen, die nicht von den glatten Muskelzellen getragen werden, wurde zusätzlich die Gesamtwandstärke (Revermann et al., 2009; Song et al., 2008) vermessen. Auch hier wiesen knockout-Mäuse im Vergleich zu WT-Kontrollen sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie keine Unterschiede auf. Die Deletion der Siah-Ubiquitinligasen beeinflusst also das Remodeling des rechten Ventrikels infolge einer gesteigerten Nachlast, während das Hypoxie-induzierte pulmonalvaskuläre Remodeling unverändert bleibt.

4.2.3 Echokardiografische Messungen

Die echokardiografischen Untersuchungen zeigten bei hypoxischen Mäusen aller Linien einen Anstieg der Wandstärke (RVWT). Dieses Ergebnis korreliert mit den steigenden Rechtsherzratios hypoxischer Tiere. Die Zunahme der RVWT war bei Siah-defizienten Mäusen signifikant geringer ausgeprägt als bei WT-Tieren. Weiterhin zeigten WT Tiere nach vierwöchiger Hypoxie eine Dilatation des rechten Ventrikels, während die Tiere beider SiahKO-Linien Werte im Bereich der normoxischen Tiere aufwiesen. Die Vermessung der enddiastolischen rechtsatrialen Fläche ergab das gleiche Bild. Sie war bei hypoxischen WT deutlich vergrößert, während hypoxische KO Tiere ähnliche Werte wie die normoxischen Kontrollen aufwiesen. Eine starke rechtsventrikuläre Hypertrophie, Dilatation und eine Vergrößerung des rechten *Atrium* stellen Hinweise auf einen dekompensierenden rechten Ventrikel dar (Bogaard et al., 2009a; Steiner and Strauer, 2009). Das Herzminutenvolumen (cardiac output, CO) fiel bei hypoxischen WT Mäusen progredient mit der Dauer der Hypoxie. Im Gegensatz dazu stieg der CO bei hypoxischen Siah2KO Tieren nach zwei und drei Wochen deutlich an und fiel nach vier Wochen wieder etwas ab (lag aber immer noch deutlich über den Werten vor Hypoxieexposition). Bei Siah1/2KO Tieren stieg der CO geringgradig aber progredient an. Ein Anstieg des CO stellt beim Menschen eine bekannte

kompensatorische Reaktion auf eine akute Hypoxieexposition dar, die durch einen Anstieg des sympathischen Tonus ausgelöst wird. Unter chronischer Hypoxie erfolgt eine Akklimatisierung mit dem Abfall des CO auf Basalniveau (Trubsbach et al., 2011). Welcher intrinsische Mechanismus dem progredienten Anstieg des CO unter chronisch hypoxischen Bedingungen bei SiahKO-Mäusen zugrunde liegt, ist unbekannt.

Die TAPSE (als Parameter der systolischen Herzfunktion) lag bei hypoxischen SiahKO Mäusen im Bereich der normoxischen Tiere, während sie bei Hypoxie-exponierten WT kontinuierlich abnahm. Die diastolische Funktion (ermittelt durch die IVRT/RR) der WT-Mäuse verschlechterte sich deutlich unter Hypoxie. Hypoxische Siah2KO Mäuse zeigten nach zwei Wochen einen ebenso hohen Anstieg der IVRT bzw. eine ebenso starke Beeinträchtigung der diastolischen Funktion wie ihre WT-Kontrollen, lagen bei den folgenden Messungen (nach drei und vier Wochen) allerdings deutlich unter den Werten der WT. Hypoxische Siah1/2KO Mäuse wiesen während aller Messzeitpunkte einen kaum merklichen Anstieg des IVRT auf, hatten also eine erhaltene diastolische Funktion. Die globale rechtsventrikuläre Funktion (gemessen durch den MPI) war bei hypoxischen WT stark eingeschränkt. Hypoxische Siah2KO Tiere zeigten ebenfalls eine Verschlechterung des MPI, die allerdings deutlich geringer ausgeprägt war als bei WT Mäusen. Die globale rechtsventrikuläre Funktion der Siah1/2KO Tiere war unter Hypoxie, mit Verlaufsmesswerten um das Basalniveau, vollständig erhalten. Insgesamt wiesen Hypoxie-exponierte WT eine progredient schlechter werdende rechtsventrikuläre Funktion auf. Siah2KO Mäuse zeigten eine wesentlich geringer ausgeprägte Verschlechterung als Siah2WT, und Siah1/2KO Tiere sogar eine vollständig erhaltene Arbeitsleistung des rechten Herzens.

Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der Herzratios und des RVSP und untermauern eine Protektion der kardialen Funktion unter hypoxischen Bedingungen durch die Deletion der Siah-Ubiquitinligasen mit additivem Effekt durch das Ausschalten beider Isoformen.

Auffällig war allerdings, dass normoxische Siah1/2KO Mäuse einen signifikant höheren MPI-Index und einen tendenziell höheren IVRT Wert, also eine tendenziell schlechtere diastolische und signifikant beeinträchtigte globale rechtsventrikuläre Funktion zeigten als normoxische WT Mäuse. Die zusätzliche Deletion von *siah1a* scheint also unter Normoxiebedingungen einen negativen Einfluss auf die diastolische Leistung bzw. die rechtsventrikuläre Relaxation zu haben. Unter hypoxischen Versuchsbedingungen spielt diese Einschränkung keine Rolle, bzw. besitzt im Gegenteil sogar einen positiven Effekt.

4.3 Interpretation der physiologischen, histologischen und echokardiografischen Untersuchungsergebnisse der Siah Mäuse im Modell des pulmonalarteriellen „banding“

4.3.1 Physiologische Parameter

Infolge der „sham“- und „banding“-Operation zeigten die Mäuse aller Linien einen Gewichtsverlust. Dieser resultiert aus dem operativen Eingriff und einer folgenden reduzierten Futter- und Wasseraufnahme am Tag der Operation. Nach einer kurzen Rekonvaleszenzphase von 1-3 Tagen begannen alle Tiere wieder an Gewicht zuzunehmen.

Das pulmonalarterielle „banding“ führte bei allen Mäusen, wie in der Literatur beschrieben (Tarnavski et al., 2004; Urashima et al., 2008), zu einem starken Anstieg des rechtsventrikulären Druckes und zu einer deutlichen Erhöhung der Rechtsherzratios. Siah2KO Mäuse zeigten, wie im Hypoxiemodell, geringere Ratios als ihre WT-Kontrollen, was für eine verminderte Rechtsherzhypertrophie spricht. Interessanterweise wiesen „banding“-operierte Siah1/2KO Tiere deutlich höhere Quotienten als ihre „banding“-operierten Kontrollen auf. Um zu zeigen, dass dies nicht an knockout-spezifischen Entwicklungen der Körper- und Herzgrößen bzw. -massen liegt, wurde zusätzlich die Ratio von rechtem Ventrikel zu Tibialänge dargestellt. Auch hier wiesen hypoxische Siah1/2KO Mäuse signifikant höhere Quotienten auf als ihre WT-Kontrollen.

Weiterhin wurde das rechte *Atrium* der Mäuse am Ende des Versuches gewogen und zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzt. „Banding“-operierte Mäuse aller Linien zeigten einen deutlichen Anstieg des atrialen Gewichtes. Dieses Phänomen lässt sich durch den mangelnden Klappenschluss der Atrioventrikularklappe aufgrund der Volumenüberladung und Dilatation des rechten Ventrikels (Vonk Noordegraaf and Galie, 2011) erklären. Der unvollständige Schluss der Segelklappe erzeugt eine Volumenbelastung des rechten *Atrium* mit folgender Hypertrophie und Dilatation bzw. einer Größen- und Massenzunahme. Das Verhältnis von rechtem *Atrium* zu Körpergewicht war, wie auch die Rechtsherzratios, bei „banding“-operierten Siah2KO Mäusen geringer und bei Siah1/2KO Tieren höher als bei ihren „banding“-operierten WT-Kontrollen.

Der Doppelknockout beider Siah-Ubiquitinligasen scheint im Modell des PAB (im Gegensatz zur chronischen Hypoxie) demnach negative Auswirkungen auf das kardiale Remodeling zu besitzen.

4.3.2 Echokardiografische Parameter

Die echokardiografischen Untersuchungen zeigten bei „banding“-operierten Mäusen aller Linien eine vergleichbar stark ausgeprägte Zunahme der Wanddicke des rechten Ventrikels. Dieses Resultat korreliert nicht mit den Ergebnissen der Rechtsherzratios. „Banding“-operierte Siah2WT und Siah2KO Tiere wiesen eine äquivalente Dilatation des rechten Ventrikels auf, während „banding“-operierte Siah1/2KO Mäuse eine signifikant stärkere rechtsventrikuläre Dilatation als ihre „banding“-operierten WT-Kontrollen zeigten. Die höheren Rechtsherzratios der Siah1/2KO Tiere resultieren also aus der stärkeren rechtsventrikulären Dilatation, da der rechte Ventrikel durch eine Flächenzunahme bei gleich bleibender Wanddicke an Gesamtmasse zunahm. Warum die Rechtsherzratios der Siah2 Gruppe von den echokardiografischen Messungen abwichen, bleibt allerdings ungeklärt. Die echokardiografisch vermessene Fläche des rechten Vorhofes am Ende der Diastole (RA area) war bei „banding“-operierten Mäusen aller Linien deutlich größer als bei ihren „sham“-Kontrollen. „Banding“-operierte Siah2KO Tiere zeigten eine signifikant kleinere rechtsatriale Querschnittsfläche als Siah2WT, während Siah1/2KO Mäuse eine signifikant größere rechtsatriale Querschnittsfläche als ihre WT-Kontrollen aufwiesen. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Verhältnis des Gewichts des rechten *Atrium* zum Gesamtkörpergewicht.

Das Herzminutenvolumen sank bei Mäusen aller Linien progredient im Verlauf des dreiwöchigen „banding“. Der CO der „banding“-operierten Siah2KO Tiere war tendenziell höher als bei „banding“-operierten Siah2WT Mäusen, während „banding“-operierte Siah1/2KO Tiere einen signifikant niedrigeren CO als ihre „banding“-operierten WT-Kontrollen zeigten. Auch die systolische Funktion (bestimmt durch Messung der TAPSE), die diastolische Funktion (gemessen durch den IVRT/RR) und die globale rechtsventrikuläre Funktion (ermittelt durch den MPI) verschlechterten sich bei allen „banding“-operierten Mäusen fortschreitend im dreiwöchigen Versuchsverlauf. „Banding“-operierte Siah2KO und Siah2WT Mäuse zeigten nach ein und zwei Wochen eine ähnliche rechtsventrikuläre Funktion. Bei der Endpunktmessung nach drei Wochen waren die systolische, diastolische und globale Funktion der banding-operierten Siah2KO Tiere allerdings signifikant besser erhalten als bei Siah2WT Mäusen. „Banding“-operierte Siah1/2KO Mäuse wiesen bereits nach einer Woche eine schlechtere systolische und globale Funktion auf als ihre „banding“-operierten WT-Kontrollen. Bei den folgenden Messungen

nach zwei und drei Wochen war die diastolische Funktion ebenfalls signifikant schwächer als bei den Kontrollen.

Insgesamt zeigten *Siah2*KO Tiere im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ eine signifikant besser erhaltene rechtsventrikuläre Funktion und ein weniger stark vergrößertes rechtes *Atrium* als die *Siah2*WT Mäuse. „Banding“-operierte *Siah1/2*KO Tiere wiesen hingegen eine erheblich stärkere rechtsventrikuläre Dilatation, eine signifikant schlechtere Leistung des rechten Ventrikels, sowie ein stärker beeinträchtigtes rechtes *Atrium* auf.

Die Deletion von *siah2* verursachte im Modell des pulmonalarteriellen „banding“, wie auch im Hypoxiemodell, einen positiven Effekt auf die rechtsventrikuläre Funktion, während der zusätzliche Verlust von *Siah1a*, anders als im Hypoxiemodell, die rechtsventrikuläre Pathologie deutlich verschlechterte. Eine Klärung der Ursache dieser unterschiedlichen Reaktionen in den beiden Tiermodellen war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich und muss daher spekulativ bleiben. Ein wichtiges Kriterium könnte in der unterschiedlich starken Druckbelastung und Zeitkinetik des Hypoxie- und „banding“-Modells mit Anschaltung unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden liegen. Eine Hypoxie führt zu einer langsam ansteigenden milden Druckbelastung, während durch das Setzen einer operativen Stenose der Pulmonalarterie ein plötzlicher starker Druckanstieg erfolgt.

*Siah1/2*KO Mäuse besaßen bereits unter normoxischen Bedingungen eine schlechtere diastolische und globale Herzfunktion als ihre WT-Kontrollen. Auch bei der „baseline“-Messung (vor Versuchsbeginn) der *Siah1/2*KO „sham“- und „banding“-Gruppe war eine tendenziell schlechtere globale rechtsventrikuläre Funktion der *Siah1/2*KO Tiere, verglichen mit ihren WT-Kontrollen, erkennbar. Durch das „banding“ der Pulmonalarterie steigt der Sauerstoffbedarf bei stark reduziertem Koronarfluss plötzlich an. Eine eingeschränkte diastolische Funktion bzw. Relaxation des rechten Ventrikels verschlechtert diese Situation. Kann dieses Ungleichgewicht nicht mehr kompensiert werden, so kommt es zur Ischämie mit nachfolgendem Verlust der rechtsventrikulären Leistung und rechtsventrikulärer Dilatation (Steiner and Strauer, 2009; Vonk Noordegraaf and Galie, 2011).

Außer der Stärke und Zeitkinetik des Stimulus muss man beachten, dass eine globale Hypoxie das Anschalten einer Vielzahl von Signalkaskaden, die den gesamten Organismus (also auch das Herz) beeinflussen, bewirkt. Ein „banding“ erzeugt durch eine Volumenüberladung des rechten Ventrikels mit resultierendem Anstieg der Wandspannung und einem folgenden erhöhten Sauerstoffbedarf bei eingeschränktem Koronarfluss lediglich eine lokale Hypoxie (Steiner and Strauer, 2009). Weiterhin wird diskutiert, dass der rechte

Ventrikel im Rahmen einer PH von in der Lunge ablaufenden Prozessen beeinflusst werden kann. Als verantwortliche Mediatoren kommen Immunzellen pulmonaler Herkunft, die das Herz infiltrieren und Chemokine oder Antikörper abgeben, Hormone (AngII, ET-1) und neuronale Reflexbögen in Betracht (Bogaard et al., 2009b). Es existiert also ein Wechselspiel zwischen Lunge und rechtem Ventrikel, das im Hypoxiemodell andere Ausgangsbedingungen als im „banding“-Modell schafft. Weiterhin zeigten Vistnes et al., dass die Serumspiegel von Zytokinen bei Mäusen mit Herzversagen ätiologieabhängig variieren (Vistnes et al., 2010).

4.3.3 Histologische Parameter

Ein Kennzeichen des Wechsels von einer physiologischen bzw. adaptiven zu einer maladaptiven Hypertrophie ist der Verlust von Kardiomyozyten und ihr Ersatz durch fibrotisches Material (Bernardo et al., 2010). Es entsteht eine Fibrose, die sich histologisch durch eine Vermehrung der kollagenen Fasern bzw. des kollagenen Bindegewebes definiert (Stünzi and Weiss, 1990). Zur Untersuchung des Fibrosegrades wurden die kollagenen Fasern im rechten Ventrikel mit Sirius Red rot angefärbt und prozentual ausgewertet (Kosanovic et al., 2011). „Banding“-operierte Siah2KO Mäuse zeigten einen deutlich geringeren Anteil an kollagenen Fasern als ihre WT-Kontrollen. Dies spricht für eine „weniger pathologische“ Herzhypertrophie mit einem geringeren Verlust von funktionsfähigen Kardiomyozyten bei „banding“-operierten Siah2KO Mäusen im Vergleich zu Siah2WT und korreliert mit den physiologischen und echokardiografischen Ergebnissen. „Banding“-operierte Siah1/2KO Tiere wiesen, trotz einer offensichtlich stärkeren rechtsventrikulären Beeinträchtigung, eine ebenso starke Fibrose wie ihre Kontrollen auf. Diese Ergebnisse könnten einen Hinweis auf eine Protektion der Kardiomyozyten gegenüber einer Apoptose durch Deletion der Siah-Ubiquitinligasen darstellen. Eine Rolle der Siah-Ubiquitinligasen im Apoptosegeschehen mit sowohl pro- als auch antiapoptotischen Effekten durch ein Eingreifen in verschiedene Signalkaskaden wie TRAF2, JNK, TRF2, β -Catenin und HIPK2 ist bekannt (siehe 1.5.6). Der Literatur zufolge kann Siah durch die Interaktion mit JNK, TRF2, β -Catenin und GAPDH proapoptotisch (Hara et al., 2006; Horikawa et al., 2011; Liu et al., 2001; Wang et al., 2011; Wen et al., 2010; Xu et al., 2006), durch den Abbau von HIPK2 antiapoptotisch (Calzado et al., 2008; Kim et al., 2009b; Winter et al., 2008) und durch die Beeinflussung von TRAF2 anti- oder proapoptotisch (Christian et al., 2011; Habelhah et al., 2002; Polekhina et al., 2002) wirken.

Zusätzlich zu den vielen unterschiedlichen Signaltransduktionswegen mit konträren Auswirkungen ist eine zelltypabhängige Wirkung von Siah auf die Apoptose beschrieben (Brauckhoff et al., 2011). Um zu untersuchen, ob die verbesserte rechtsventrikuläre Funktion und reduzierte Fibrose im Zusammenhang mit einer verminderten Apoptose stehen, könnte man im Anschluss an diese Arbeit zunächst einen Apoptoseassay durchführen und bei einem positiven Ergebnis die Expression von HIPK2 und TRAF2 molekularbiologisch bestimmen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die geringere rechtsventrikuläre Fibrose der Siah-defizienten Mäuse könnte in einer verminderten Kollagensynthese durch den Einfluss der Siah-Ubiquitinligasen auf β -Catenin und/oder HIPK2 liegen. Verschiedene Publikationen belegen eine Rolle von β -Catenin in der Pathogenese von fibrotischen Dysfunktionen, wie der Lungenfibrose (Chilosi et al., 2003; Kim et al., 2009a), der Leberfibrose, Nierenfibrose und Hautfibrose (Guo et al., 2012). Weiterhin spielt β -Catenin eine Rolle bei der Entstehung von hyperplastischen Wunden mit überschießender Kollagenproduktion (Lam and Gottardi, 2011). Die Entstehung der verschiedenen Organfibrosen wird durch eine Heraufregulation bzw. Aktivitätssteigerung von β -Catenin ausgelöst bzw. unterhalten. Neuere Studien zeigen eine Beteiligung des Siah-Zielproteins HIPK2 an der Pathogenese der pulmonalen und renalen Fibrose (Jin et al., 2012; Ricci et al., 2013). Es scheint im Rahmen beider Prozesse vermehrt exprimiert zu werden.

Eine Siah-Defizienz führt nach den eigenen Ergebnissen zu einer verminderten Kollagenbildung. Bedenkt man, dass Siah am Abbau von β -Catenin und HIPK2 beteiligt ist, also deren Wirkung abschwächt, dann stehen die Ergebnisse dieser Studie im Widerspruch zu den oben beschriebenen Beobachtungen (Chilosi et al., 2003; Guo et al., 2012; Jin et al., 2012; Kim et al., 2009a; Lam and Gottardi, 2011; Ricci et al., 2013). Es müsste bei Siah-defizienten Tieren somit eigentlich mehr β -Catenin und HIPK2 verfügbar sein und folglich mehr Kollagen gebildet werden. Untersuchungen im myokardialen Infarktmodell zeigten allerdings ebenfalls kontroverse Ergebnisse für die Rolle von β -Catenin. In verschiedenen Studien war eine Reduktion der Infarktgröße sowohl durch Stimulation als auch durch Inhibition der Wnt/ β -Catenin Signaltransduktion auslösbar. Weiterhin konnten im Rahmen der kardialen Hypertrophie sowohl eine Herauf-, als auch eine Herunterregulation der *β -catenin* Genexpression beobachtet werden (Oerlemans et al., 2010). Mündliche Berichte von Dr. Andreas Möller (Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australien) über eine

verminderte Kollagenbildung im Verlauf der Narbenentstehung bei Siah2KO Mäusen im Rahmen von Wundheilungsstudien korrelieren wiederum mit den eigenen Ergebnissen.

Hypoxische Siah-defiziente sowie WT Mäuse zeigten weder untereinander, noch im Vergleich zu zu ihren normoxischen Kontrollen Unterschiede im Kollagengehalt der rechten Ventrikel. Dies lässt sich beispielsweise durch den langsameren und geringeren Druckanstieg in Hypoxie erklären. Das rechte Herz kann sich langsam adaptieren, ohne dass ein Verlust von Kardiomyozyten entsteht der durch fibrotisches Material ersetzt werden muss.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Kapillardichte in chronisch hypertrophierten Herzen herabgesetzt ist. Dies resultiert in größeren Diffusionsstrecken, die zu einer limitierten Energie- und Sauerstoffversorgung führen (Friebs and del Nido, 2003). Um eine Aussage über die nutritive Versorgung und Oxygenierung des Herzmuskels treffen zu können, wurde bei „banding“-operierten Siah2 Mäusen das Verhältnis der Anzahl der Kapillaren (Kap) zur Kardiomyozytenanzahl (KM) bestimmt. Diese wurden dazu mit Hilfe einer histochemischen Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht und anschließend ausgezählt (Kosanovic et al., 2011; Wei et al., 2012). Für einen ersten Überblick wurden zunächst die Herzen von jeweils zwei „sham“-operierten Siah2KO und Siah2WT Mäusen, sowie vier „banding“-operierten Siah2KO und fünf Siah2 WT Tieren untersucht. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Siah2KO und Siah2WT Mäusen feststellbar. Hinsichtlich der Aussagefähigkeit der ermittelten Ergebnisse muss man einschränkend bedenken, dass hypertrophierte Zellen in einer definierten Fläche mehr Raum einnehmen. Es sind also weniger Zellen bei gleicher Fläche vorhanden, während die Zahl der Kapillaren unverändert bleibt. Dies hat einen Anstieg des Quotienten Kap/KM zur Folge. Eine genauere Aussage lässt sich treffen, indem man das Verhältnis der Anzahl der Kapillaren zur Fläche der Kardiomyozyten berechnet (Appelhoff et al., 2004). Aufgrund dieser Tatsache und der fehlenden signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurde der Stichprobenumfang der scheinoperierten Tiere nicht aufgestockt. Im Anschluss an die vorliegende Arbeit wurden die Kardiomyozyten vermessen und der Quotient aus der Kapillarenanzahl zur Kardiomyozytenfläche gebildet. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen Siah2WT und Siah2 KO Mäusen. Die bessere rechtsventrikuläre Funktion der „banding“-operierten SiahKO Mäuse im Vergleich zu ihren WT-Kontrollen ist also nicht auf eine verminderte Hypertrophie und bessere Versorgungssituation der Kardiomyozyten zurückzuführen. Weiterhin zeigten die Flächenmessungen, dass die Unterschiede in der

rechtsventrikulären Massenzunahme zwischen Siah2WT und Siah2KO Tieren (3.2.4, 3.2.5) nicht aus einer unterschiedlich stark ausgeprägten Hypertrophie der Kardiomyozyten sondern aus Differenzen in der Zunahme des fibrotischen Gewebes (bzw. Kollagenanteiles 3.2.8) resultieren.

4.4 Molekularbiologische Untersuchungen

4.4.1 Genexpression der Siah-Ubiquitinligasen

Die Expression der Siah-Ubiquitinligasen wurde mittels RT-PCR untersucht, da die Siah-Proteine im Homogenat aus intaktem Gewebe aufgrund der beständigen Autoubiquitinierung (Hu and Fearon, 1999; Lorick et al., 1999) nicht nachweisbar sind. *Siah2* war im Gewebehomogenat der Lunge und des rechten Ventrikels von hypoxischen Siah2WT Mäusen nicht reguliert. Des Weiteren blieb die Expression von *siah1a/b* bei hypoxischen Siah2WT und Siah2KO Tieren ebenfalls unverändert. Nakayama et al. zeigten in Zellkulturexperimenten eine zeitabhängige Heraufregulation von *siah2* unter Hypoxie (Nakayama et al., 2004; Nakayama and Ronai, 2004) und Wang et al. einen ebenso zeitabhängigen Anstieg von *siah1* (Wang et al., 2011). In beiden Studien persistierte diese Heraufregulation lediglich für 12-24 Stunden bevor die mRNA-Expression wieder abfiel. Die Siah-Ubiquitinligasen werden also in akuter Hypoxie heraufreguliert und anschließend wieder herunterreguliert. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen nach chronischer Hypoxieexposition zeigte sich keine Regulation der *siah* mRNA-Expression. Über die Siah-Gen- und Proteinexpression unter chronischer Hypoxie liegen zurzeit noch keine Veröffentlichungen vor. Des Weiteren muss man eine eingeschränkte Vergleichbarkeit von Zellkulturexperimenten mit der Verwendung eines intakten Gewebeverbandes, in dem eine Reihe von Zellinteraktionen stattfinden, berücksichtigen.

Zusätzlich wurde die Genexpression von *siah1a/b* und *siah2* im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ im Gewebehomogenat des rechten Ventrikels gemessen. Hier war ebenfalls keine Regulation feststellbar. Die Genexpression der Siah-Ubiquitinligasen erwies sich also weder unter chronischer Hypoxie, noch im Drucküberladungsmodell des rechten Ventrikels als verändert.

Aufgrund von möglichen posttranskriptionalen und posttranslationalen Veränderungen, welche die Menge an funktionsfähigem Protein entscheidend beeinflussen können, sowie von Eingriffen in die Proteinaktivität (z. B. durch Phosphorylierungen (Khurana et al.,

2006)) kann allein anhand von PCR Untersuchungen keine gesicherte Aussage über die Verfügbarkeit und Wirkungseffizienz der Siah-Proteine getroffen werden. Um diese zu determinieren, wären weitere molekularbiologische Untersuchungen (wie z. B. Westernblots mit Antikörpern zur Detektion phosphorylierter Siah-Proteine) nötig, deren Durchführbarkeit allerdings durch die beständige Autoubiquitinierung von Siah erheblich eingeschränkt wird.

4.4.2 Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD)

Die Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 sind Zielproteine von Siah und spielen, wie in der Einleitung beschrieben (1.5 und 1.6), eine wichtige Rolle bei der Regulation von HIF, einem Schlüsselfaktor der pulmonalen Hypertonie (Hänze et al., 2007; Stenmark et al., 2006b) und der Rechtsherzhypertrophie (Krishnan et al., 2009; Sano et al., 2007; Semenza, 2012). Deshalb wurde der Effekt des Sauerstoffgehaltes bzw. der Operationsmethode sowie des knockout der Siah-Ubiquitinligasen auf die Proteinexpression der PHDs im Gewebehomogenat der Lunge und des rechten Ventrikels im Hypoxie- und „banding“-Modell mittels Westernblotverfahren untersucht.

4.4.2.1 Proteinexpression von PHD1

Die differenzielle Proteinexpression von PHD1 erwies sich weder in der Lunge noch im rechten Ventrikel der Hypoxie- und „banding“-Gruppen als reguliert. Aus der Literatur ist bekannt, dass PHD1 im Gegensatz zu PHD2 und PHD3 nicht *per se* durch Hypoxie induziert wird. Appelhoff et al. zeigten bei der Untersuchung der *phd1*-Genexpression in verschiedenen Zelltypen unter Hypoxie keine Regulation oder eine Herunterregulation (Appelhoff et al., 2004). Die Untersuchung der PHD1-Proteinexpression unter hypoxischen Bedingungen in K1735p Melanomzellen durch Qi et al. ergab ebenfalls keine Regulation (Qi et al., 2008). Willam et al. veröffentlichten eine Studie, in der die Genexpression von *phd1* im Herzen von Ratten nach 8-stündiger Hypoxieexposition nicht verändert war (Willam et al., 2006). Khanna et al. wiesen jedoch eine Heraufregulation der *phd1*-Genexpression in hypoxischen HT22 Zellen und Gehirnen von hypoxischen Mäusen nach (Khanna et al., 2006). Diese Daten zeigen eine zelltypabhängig variierende Regulation für PHD1. Die von Appelhoff, Qi und Willam gezeigte fehlende Regulation von PHD1 geht mit dem Bild der Proteinexpression in der Lunge sowie im Herzen der Siah-Mäuse unter dem Effekt „Sauerstoffgehalt“ (bzw. Hypoxie) konform. Auch das pulmonalarterielle „banding“ und die dadurch generierte Drucküberladung mit resultierender lokaler Hypoxie des rechten

Ventrikels hatte keinen Einfluss auf die Proteinexpression von PHD1. Nakayama et al. beobachteten in Zellkulturexperimenten, dass die Transkription von *siah* in akuter Hypoxie steigt und mit einem Anstieg der Degradation der PHD1 und PHD3 Proteine einhergeht (Nakayama et al., 2004; Nakayama et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte nach einer chronischen vierwöchigen Hypoxieexposition im Gewebehomogenat von Lunge und rechtem Ventrikel in keiner der Gruppen eine vermehrte Genexpression von *siah1a/b* und *siah2* gezeigt und auch kein Absinken der PHD1 Proteinlevel nachgewiesen werden.

Geht man von einer hauptsächlichlichen Regulation von PHD1 und PHD3 durch die Siah-Ubiquitinligasen aus, wäre zu erwarten gewesen, dass Siah2KO und Siah1/2KO Mäuse aufgrund einer geringeren Degradation von PHD1 eine höhere Proteinexpression als die entsprechenden WT-Kontrollen aufweisen. Die fehlende differentielle Regulation unter dem Effekt „knockout“ im Rahmen der hier durchgeführten Experimente unterstützt Theorien die besagen, dass die Verfügbarkeit der PHDs auch durch andere E3-Ligasen (Nakayama et al., 2004) oder weitere Siah-unabhängige Mechanismen (Myllyharju, 2008) reguliert werden könnte.

Ein wichtiger Faktor der die Aussagefähigkeit der Westernblots von Lungenhomogenat einschränkt ist, dass die Lunge aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen besteht (Pneumozyten Typ1 und Typ2, Gefäßendothel, glatte Muskelzellen, Knorpelzellen, Zellen des Immunsystems), in denen PHD1 unterschiedlich reguliert sein könnte. Des Weiteren ist PHD1 vornehmlich im Nukleus lokalisiert (Berra et al., 2006), so dass eventuell eine dem Westernblot vorangehende nukleäre Extraktion der PHD1-Proteine benötigt wird, um deutlichere Ergebnisse zu erzielen.

4.4.2.2 Proteinexpression von PHD2

In der Literatur ist eine HIF-abhängige Heraufregulation von PHD2 unter akuter Hypoxie in verschiedenen Zellkulturexperimenten beschrieben (Appelhoff et al., 2004; Berra et al., 2006; Nakayama et al., 2009; Qi et al., 2008; Yin et al., 2012). In dieser Studie konnte in den Lungen der Siah2 und Siah1/2 Gruppe keine differentielle Regulation von PHD2 unter chronisch hypoxischen Bedingungen gezeigt werden. Dieses Ergebnis könnte, wie auch für PHD1 (unter 4.4.2.1) beschrieben, auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Zeitkinetik: akute *versus* chronische Hypoxie sowie Zellen *versus* Organverband) zurückzuführen sein.

Der rechte Ventrikel der Siah2-Hypoxiegruppe zeigte ein zur Lunge kontroverses Ergebnis. PHD2 war unter dem Effekt „Sauerstoffgehalt“ signifikant heraufreguliert. Diese Heraufregulation deckt sich mit Studien die eine Induktion von PHD2 durch HIF in Hypoxie belegen (Appelhoff et al., 2004; Berra et al., 2006; Qi et al., 2008; Yin et al., 2012). Die gegensätzliche Reaktion zur Lunge könnte an einer differierenden Regulation in verschiedenen Zelltypen liegen (Appelhoff et al., 2004; Yin et al., 2012). Eine unterschiedliche Expression verschiedener Proteine in Herz und Lunge unter akuten oder chronischen hypoxischen Bedingungen ist in der Literatur umfassend beschrieben (Chida and Voelkel, 1996; Vigano et al., 2011). Willam et al. beobachteten im Herzen von Ratten nach 8-stündiger Hypoxieexposition keine Regulation der *phd2*-Genexpression (Willam et al., 2006). Mögliche Erklärungen für die Diskrepanzen zwischen den Untersuchungen von Willam et al. und der vorliegenden Arbeit sind wieder die unterschiedliche Zeitkinetik, differierende Versuchsbedingungen sowie eventuell stattfindende posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen.

Im „banding“-Modell war PHD2, im Gegensatz zu chronisch hypoxischen Tieren, im rechten Ventrikel unter dem Effekt „Operationsmethode“ (mit entstehender lokaler Hypoxie) nicht reguliert. Dies führt zu der Annahme, dass unter globaler Hypoxie andere Signaltransduktionsmechanismen in die Hypertrophie des rechten Ventrikels involviert sein könnten als bei der „banding“-assoziierten Drucküberladung des rechten Ventrikels.

Bei der Interpretation der vorliegenden Daten der PHD2-Proteinexpression darf auch eine mögliche Wirkung HIF-unabhängiger Regulationsmechanismen nicht außer Acht gelassen werden. Der Effekt „knockout“ beeinflusste in keiner der untersuchten Gruppen und Gewebe die Proteinmenge von PHD2. Dieses Ergebnis geht mit der Literatur konform: Die Regulation von PHD2 ist zwar noch nicht vollständig aufgeklärt; allerdings ist erwiesen, dass sie nicht direkt durch die Siah-Ubiquitinligasen beeinflusst wird (Nakayama et al., 2007). Ein Protein, das zur Degradation von PHD2 beiträgt ist z. B. FKBP38 (Barth et al., 2009).

4.4.2.3 Proteinexpression von PHD3

Die Effekte „Sauerstoffgehalt“ und „Operationsmethode“ zeigten keine statistisch nachweisbare Auswirkung auf die Proteinexpression von PHD3 in den entsprechenden Gruppen. Der knockout von *siah2* führte zu einem Anstieg der Proteinmenge von PHD3 in der Lunge der Hypoxiegruppe und im rechten Ventrikel der Mäuse der „banding“- Gruppe.

Der knockout von *siah1a* und *siah2* bewirkte einen fast signifikanten Trend zu einem erhöhten PHD3-Proteingehalt. Das Ausbleiben eines statistisch signifikanten Anstieges der PHD3-Expression in den Lungen der hypoxischen Siah1/2KO Mäuse könnte in individuell niedrigen Werten der normoxischen Siah1/2KO Mäuse (Abb 3.3.17 c) begründet liegen. Im rechten Ventrikel der hypoxischen Tiere war PHD3, trotz der generell stärksten Expression dieser Prolyl-4-Hydroxylase im Herzen (Nakayama, 2009), im Westernblotverfahren leider nicht nachweisbar.

Verschiedene Zellkulturstudien zeigten eine HIF-assoziierte Heraufregulation der *phd3*-Genexpression in Hypoxie (Appelhoff et al., 2004; Berra et al., 2006; Qi et al., 2008; Yin et al., 2012). Gleichermaßen beobachteten Willam et al. einen Anstieg der *phd3* mRNA-Konzentration im Herzen von Ratten nach einer acht stündigen Hypoxie-exposition sowie eine Erhöhung der *phd3* Expression in periischämischen Infarktgewebe (Willam et al., 2006). Rohrbach et al. konstatierten, dass PHD3 die bedeutendste HIF-modifizierende Prolyl-4-Hydroxylase in murinen und humanen Herzen ist, mit einer starken Induzierbarkeit durch Hypoxie (Rohrbach et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich keine differentielle Heraufregulation von PHD3 unter dem Effekt „Sauerstoffgehalt“ bzw. Hypoxie in der Lunge der knockout Mäuse und ihrer Wildtypkontrollen. Auch die Operationsmethode „banding“ und die dadurch verursachte lokale rechtsventrikuläre Hypoxie (bedingt durch den reduzierten koronaren Blutfluss) führte nicht zu einem konklusiven Anstieg der PHD3-Proteinmenge. Beim Vergleich der Studien muss man allerdings beachten, dass die vorliegenden Veröffentlichungen die Genexpression analysierten. Aufgrund von möglichen posttranskriptionalen und posttranslationalen Modifikationen kann allerdings nicht direkt von der Gen- auf die Proteinexpression geschlossen werden.

Die differentielle PHD3-Proteinexpression unter dem Effekt „knockout“ war in der Lunge und im rechten Ventrikel signifikant oder zumindest tendenziell erhöht. Da Siah2 beim Ablauf der Degradation der drei Prolyl-4-Hydroxylasen den größten Effekt auf PHD3 hat (Nakayama et al., 2007), kann dieser Anstieg als Folge des Siah2 Verlustes interpretiert werden.

SiahKO Mäuse zeigten einen kardialen Phänotyp in beiden untersuchten Tiermodellen und wiesen erhöhte PHD3-Proteingehalte auf. Die Ergebnisse von Rohrbach, Willam und Nakayama unterstreichen die bedeutende Rolle von PHD3 im Herzen (Nakayama, 2009; Rohrbach et al., 2005; Willam et al., 2006). Zusammen mit den hier vorliegenden Daten

weist dies auf eine entscheidende Rolle von PHD3 bei der Entwicklung des kardialen Phänotyps der SiahKO Mäuse unter globalen und lokalen hypoxischen Bedingungen bzw. im rechtsventrikulären Drucküberladungsmodell hin.

4.4.2.4 Auswirkung der Prolyl-4-Hydroxylaseexpression bei SiahKO Tieren auf die Entwicklung der pulmonalen Hypertonie

Die differierende Expression von PHD3 in der Lunge von Hypoxie-exponierten SiahKO Mäusen und ihren WT-Kontrollen spiegeln sich nicht in pulmonalen gefäßmorphologischen Unterschieden wieder. Die Funktion der Prolyl-4-Hydroxylasen ist abhängig von verschiedenen Kofaktoren, sowie von der Sauerstoffkonzentration (Berra et al., 2006). Dies bedeutet, dass ihre Aktivität in Ermangelung der Kofaktoren sinkt und dass allein die Expression des Proteins keinen direkten Rückschluss auf seine Hydroxylasefunktion zulässt. PHD3 behält allerdings unter hypoxischen Bedingungen eine erhebliche Aktivität (Stiehl et al., 2006), und aus Zellkulturexperimenten ist bekannt, dass ein Verlust von Siah zu einer geringeren HIF1 α Verfügbarkeit führt (Nakayama et al., 2004; Qi et al., 2008). Dies impliziert eine tragende Rolle von PHD3 bei der Regulation von HIF in Hypoxie. Die Regulation des PHD-Signaltransduktionsweges infolge einer akuten Hypoxieexposition ist allerdings zelltypabhängig (Appelhoff et al., 2004). In dieser Arbeit wurde Gewebehomogenat mit komplexen Zellverbänden und -interaktionen nach einer chronischen Hypoxieexposition untersucht. Unter diesen Versuchsbedingungen haben die Siah-Ubiquitinligasen in der Lunge offensichtlich keine entscheidende Bedeutung.

Im Rahmen der rechtsventrikulären Funktion scheint der Deletion von *siah2* eine protektive Rolle zuzukommen. „Banding“-operierte Siah2KO Mäuse wiesen im Vergleich zu ihren WT-Kontrollen neben einer besseren rechtsventrikulären Funktion ein höhere rechtsventrikuläre PHD3 Proteinexpression auf. Hypoxische Siah2KO Mäuse zeigten ebenfalls eine besser erhaltene rechtsventrikuläre Funktion; allerdings konnte die PHD3-Expression in den rechten Ventrikeln im Westernblotverfahren leider nicht ermittelt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass auch bei den hypoxischen KO Tieren aufgrund der mangelnden Funktion von Siah eine gesteigerte PHD3-Proteinexpression vorliegen könnte. Ein erhöhter PHD3 Gehalt kann durch Hydroxylierung (Calzado et al., 2009; Nakayama et al., 2009) zu einem Absinken der HIF1 α - und HIF2 α -Konzentrationen führen. Eine protektive Rolle für einen erniedrigten HIF Gehalt im Herzen wird zurzeit, wie schon in der

Einleitung beschrieben, kontrovers diskutiert (Bekeredjian et al., 2010; Czibik, 2010; Kaelin and Ratcliffe, 2008; Krishnan et al., 2009; Moslehi et al., 2010; Wei et al., 2012).

Siah1/2KO Mäuse wiesen in Hypoxie eine bessere rechtsventrikuläre Funktion auf, während sie eine schlechter erhaltene Herzfunktion im Modell des pulmonalarteriellen „banding“ zeigten. Auffallend war die echokardiografisch ermittelte Beeinträchtigung der diastolischen und globalen Funktion dieser Tiere unter „baseline“- und Normoxiebedingungen. Geht man davon aus, dass eine additive Deletion beider Siah-Ubiquitinligasen eine weitere Senkung der HIF-Verfügbarkeit im rechten Ventrikel bewirkt, könnte eine Erklärung für dieses Phänomen sein, dass durch das Absinken von HIF unter ein bestimmtes notwendiges Niveau das empfindliche Gleichgewicht der HIF Isoformen (Czibik, 2010) so stark beeinflusst wird, dass ein starker Stimulus wie das „banding“ eine maladaptive Reaktion hervorruft. Eine Hypoxie als milder Stimulus kann hingegen noch gut kompensiert werden. Leider war es nicht möglich, die Proteinexpression von HIF1 α und HIF2 α mittels Westernblotverfahren nachzuweisen, wodurch die Zusammenhänge zwischen der HIF- und der Prolyl-4-Hydroxylasen Expression rein spekulativ bleiben.

Einschränkend muss man anmerken, dass außer HIF eine Reihe weiterer Siah-gesteuerter Proteine, wie TRAF2, JNK, β -Catenin und HIPK2 (siehe 1.5.6) entscheidende Auswirkungen auf die Entwicklung der rechtsventrikulären Morphologie und Funktion haben können. Weiterhin sind auch die Prolyl-4-Hydroxylasen selbst in der Lage HIF-abhängige und HIF-unabhängige Signaltransduktionswege anzustoßen, die eine Rolle in der Zelldifferenzierung und beim Zelltod spielen (Fong and Takeda, 2008).

4.4.3 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Auf der Suche nach einem Zielprotein der Siah-PHD-HIF-Kaskade, das für die phänotypischen Unterschiede der SiahKO-Mäuse verantwortlich sein könnte, rückte VEGFA in den Fokus. Vascular endothelial growth factor A ist ein Zielprotein von HIF, das sowohl in der Pathogenese der PH, als auch bei kardialen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt (Christou et al., 1998; Drake et al., 2011; Hänze et al., 2007; Izumiya et al., 2006). Aus Zellversuchen ist bereits bekannt, dass eine Inhibition oder ein knockout der Siah-Ubiquitinligasen zu einem Absinken des VEGFA-Spiegels führt (Le Moan et al., 2011; Nakayama, 2009; Qi et al., 2008). Deshalb wurde seine Expression in Lunge und Herz der Siah2 Mäuse in dieser Arbeit untersucht.

4.4.3.1 Physiologische Funktion von vascular endothelial growth factor

Das Gen *vegfa* ist ein HIF-Zielgen, das sowohl bei der Gefäßneubildung (Vaskulogenese) und -expansion (Angiogenese), als auch beim Gefäßremodeling (Arteriogenese) unter hypoxischen Bedingungen eine Rolle spielt (Hänze et al., 2007). Die VEGF-Familie besteht aus fünf Mitgliedern: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD und placental growth factor (PLGF). Im Folgenden soll nur auf VEGFA eingegangen werden.

VEGFA wird in der Lunge und im Herzen sowie in vielen anderen Geweben exprimiert. In alveolaren Epithelzellen und kardialen Myozyten liegt eine sehr hohe Expressionsrate vor. VEGFA gilt als das einzige spezifische Mitogen für Endothelzellen. Es stimuliert ihr Wachstum und inhibiert ihre Apoptose (Kajdaniuk et al., 2011a; Takahashi, 2011).

Es existieren drei zellmembranständige Rezeptoren für VEGF: VEGF-R1 (Flt-1, fms-like tyrosine kinase 1), VEGF-R2 (KDR, kinase insert domain receptor bei Menschen oder Flk-1, fetal liver kinase-1 bei Mäusen) und VEGFR-3 (Flt-4). Die Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 werden auf der Oberfläche der meisten vaskulären Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen, und VEGF-R3 auf der Zellmembran von lymphatischen Endothelzellen exprimiert. Vascular endothelial growth factor A bindet an VEGF-R1 und VEGF-R2. VEGF-R1 vermittelt die Proliferation von Endothelzellen, Migration von Monozyten und Makrophagen und die Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen (Ferrara et al., 2003). Er hat eine sehr hohe Affinität zu VEGFA, aber nur eine geringe Tyrosinkinaseaktivität, so dass man davon ausgeht, dass VEGF-R1 eine anti-angiogenetische Funktion durch Abfangen von VEGF (als Substrat für VEGF-R2) ausübt. Nach dem gleichen Prinzip wirken lösliche Formen des VEGF-R1 (sFlt, soluble). Während die Rolle von VEGF-R1 in der Vaskulogenese gesichert ist, ist seine Funktion in der Angiogenese noch nicht vollständig geklärt (Kajdaniuk et al., 2011a). VEGF-R2 ist besser erforscht. Er wird als der Hauptvermittler der VEGF-Signalkaskade im vaskulären Endothel angesehen und ist in Wachstum, Migration, Überleben von Endothelzellen sowie Knospung von Gefäßen und der Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität involviert (Holmes et al., 2007).

Vascular endothelial growth factor A wird in Hypoxie durch HIF1-induzierte Transkription heraufreguliert, (Ferrara et al., 2003) VEGF-R1 wird zelltyp-abhängig von HIF1 oder HIF2 induziert und die Regulation von VEGF-R2 ist HIF2-abhängig (Hänze et al., 2007).

4.4.3.2 Bedeutung von vascular endothelial growth factor in der pulmonalen Hypertonie

Die PH ist eine Erkrankung, die zu einem abnormalen vaskulären Remodeling führt. Unter akuter sowie chronischer Hypoxie erfolgen in der Lunge ein Anstieg der Expression von VEGF und seiner Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 (Christou et al., 1998; Tuder et al., 1995). Eine Überexpression von VEGF im hypoxischen Rattenmodell schützte die Tiere vor einer PH (Partovian et al., 2000). In einem Modell der fibroseassoziierten PH reduzierte eine Behandlung mit VEGF die endotheliale Apoptose und das vaskuläre Remodeling und verbesserte die Vaskularisierung und den PAP, während sie den Grad der Fibrose verschlimmerte (Farkas et al., 2009). Des Weiteren wurde eine gesteigerte Gen- und Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 zusammen mit erhöhten Vorkommen von HIF1 α und HIF1 β in plexiformen Läsionen gefunden (Hänze et al., 2007). Vascular endothelial growth factor scheint also sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die Pathogenese der PH zu besitzen. Tuder et al. implizieren eine duale Rolle für VEGF in der Entstehung der PH: einer frühen VEGF-vermittelten Schutzfunktion folgt eine pathologische Induktion des pulmonalvaskulären Remodeling (Tuder and Yun, 2008).

4.4.3.3 Bedeutung von vascular endothelial growth factor im Herzen

Vascular endothelial growth factor wird im Rahmen der kardialen Hypertrophie heraufreguliert (Izumiya et al., 2006). Verschiedene Studien in Drucküberlastungsmodellen des Herzens zeigten eine bedeutende Rolle für VEGF in der Proliferation der Kapillaren. Die kapilläre Versorgung ist ein entscheidender Faktor beim Umbruch der kompensatorischen Hypertrophie zur Dekompensation des Herzens (Bogaard et al., 2009a; Izumiya et al., 2006; May et al., 2008; Shiojima et al., 2005). Im Mausmodell führen ein knockout von VEGF und eine damit einhergehende Minderperfusion des Myokards zu Ischämie, kontraktile Dysfunktion, Herzversagen und Tod (Carmeliet et al., 1999). Hypoxie ist ein wichtiger stimulierender Faktor der VEGF Regulation im Herzen. Es wird 24 Stunden nach Hypoxieexposition signifikant heraufreguliert und 24 Stunden nach Reoxygenierung befindet sich seine Expression wieder auf Basalniveau. Eine protektive Rolle von VEGF konnte bei ischämischen Herzerkrankungen und Myokardinfarkten beobachtet werden (Kajdaniuk et al., 2011a).

Zusätzlich zu seiner angiogenetischen Wirkung induziert VEGF den Eintritt adulter Kardiomyozyten in den Zellzyklus und fördert Zellteilung und kardiale Hypertrophie infolge pathologischer (Drucküberladung) aber auch physiologischer (Training) Stimuli

(Madonna and De Caterina, 2009). Bei der Erstellung eines Proteinprofils zur Unterscheidung einer adaptativen von einer maladaptativen Hypertrophie fanden Drake et al. keine Unterschiede in der Expression von HIF1 α , die Expression von VEGF war hingegen in den versagenden Herzen reduziert (Drake et al., 2011).

Die Expression der VEGF-Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 kann die Wirkung von VEGF im Rahmen kardialer Vorgänge beeinflussen. Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus des humanen VEGF-R2 und koronaren Herzerkrankungen (Kajdaniuk et al., 2011a). Weiterhin kann das Verhältnis von VEGF-R1 zu VEGF-R2 das Ausmaß des kardialen Remodeling infolge einer Drucküberladung beeinflussen. Eine erhöhte Ratio von VEGF-R1/VEGF-R2 induziert eine Regression der Kardiomyozytenhypertrophie (Madonna and De Caterina, 2009).

4.4.3.4 Vascular endothelial growth factor A Proteinexpression in der Lunge und im rechten Ventrikel der Siah2 Mäuse

Die Proteinexpression von VEGFA wurde in Gewebehomogenat der Lunge und des rechten Ventrikels der Hypoxiegruppe sowie des rechten Ventrikels der PAB-Gruppe mittels ELISA-Verfahren bestimmt. In der Lunge der WT-Kontrollen wäre, wie in der Literatur beschrieben (Christou et al., 1998; Tudor et al., 1995), ein Anstieg der VEGF-Expression unter chronischer Hypoxie zu erwarten gewesen, während hypoxische KO Mäuse, aufgrund der gesteigerten Proteinexpression von PHD3 und folgend niedrigerer HIF α Spiegel, eine geringere Induktion von VEGFA aufweisen sollten. Diese Hypothese konnte leider in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die ausbleibende konklusive Regulation von VEGFA unter dem Effekt „knockout“ geht mit den fehlenden Unterschieden zwischen SiahKO Mäusen und ihren WT-Kontrollen in der histologischen Analyse der pulmonalen Gefäßmorphologie konform. Eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit einer statistisch signifikanten differentiellen Regulation unter dem Faktor „Sauerstoffgehalt“ ist die Verwendung von Homogenat des Gesamtorganes, das aus verschiedenen Zelltypen besteht, in denen eine unterschiedliche Regulation von VEGFA vorliegen könnte. Um diese Theorie weiter zu untersuchen besteht z. B. die Möglichkeit histologische Schnitte des Lungengewebes anzufertigen, und die enthaltenen Gefäße (in deren Endothelzellen VEGFA unter Hypoxie bekanntlicherweise heraufreguliert ist (Hänze et al., 2007)) nach Mikrodissektion molekularbiologisch zu analysieren.

Da der Gehalt von HIF unter normoxischen Bedingungen hauptsächlich durch PHD2 determiniert wird (Fong and Takeda, 2008; Nakayama et al., 2009), war eine ähnliche Expression von VEGFA bei normoxischen KO und WT Mäusen zu erwarten, was durch die ELISA-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigt wurde.

Aus der Literatur ist bekannt, dass VEGF im Verlauf einer kardialen Hypertrophie heraufreguliert wird (Izumiya et al., 2006; Madonna and De Caterina, 2009). Ebenfalls wurde im Hypoxie/Reoxygenierungsmodell gezeigt, dass VEGF 24 Stunden nach einer Hypoxie signifikant ansteigt (Kajdaniuk et al., 2011a). Eine mögliche Erklärung für mangelnde Unterschiede in der VEGFA Expression bei den Mäusen der Siah2-Hypoxiegruppe könnte in einer moderat ausgeprägten Hypertrophie und der milden chronischen Hypoxie (10%) liegen. Weiterhin muss man bedenken, dass die meisten Studien am linken Ventrikel durchgeführt wurden und die gewonnenen Erkenntnisse (aufgrund der in der Einleitung unter 1.2.2 beschriebenen Unterschiede zwischen linken und rechten Ventrikel) nicht ohne weiteres auf den rechten Ventrikel übertragbar sind.

Drake et al. zeigten, dass die VEGFA-Expression im versagenden Herzen herabgesetzt ist (Drake et al., 2011). „Banding“-operierte KO und Kontrollmäuse wiesen zwar eine eingeschränkte rechtsventrikuläre Funktion aber keine konklusive Regulation der VEGFA Expression auf. Eventuell ist die rechtsventrikuläre Funktionsminderung noch nicht weit genug fortgeschritten, um eine signifikant herunterregulierte VEGFA Expression herbeizuführen.

Es zeigte sich in keiner der Gruppen eine statistisch signifikante differentielle Regulation von VEGFA unter den Effekten „Sauerstoffgehalt“ bzw. „Operationsmethode“ und „knockout“. Allerdings traten auffallend große mittlere Effekte (Abb 3.1.23, 3.1.24, 3.2.20, Regulation ca. um den Faktor 1000) auf, die jedoch aufgrund der enormen Streuung der Daten durch unerwartet starke, individuelle Abweichungen, bei einem relativ kleinen Stichprobenumfang (n=6-9), nicht zu statistisch aussagekräftigen Ergebnissen führten. Bei folgenden Untersuchungen sollte diese Datenstreuung bei der Versuchsplanung unbedingt beachtet werden.

4.4.3.5 Genexpression von vascular endothelial growth factor (vegf) a, vegf-rezeptor 1 und vegf-rezeptor 2

Um zu überprüfen ob die Unterschiede in der Herzfunktion der Siah2KO und WT Mäuse auf Abweichungen in der Signaltransduktion von VEGFA durch eine unterschiedliche

Expression der VEGF-Rezeptoren zurückzuführen sind, wurden Genexpressionsanalysen für *vegfa* und seine beiden Rezeptoren *vegfr1* und *vegfr2* durchgeführt. Die pulmonale Expression von *vegfr1* war unter dem Effekt „Sauerstoffgehalt“ heraufreguliert. Dies korreliert mit der, in der Literatur beschriebenen, Expressionssteigerung der *vegfr*-Rezeptorgene unter hypoxischen Bedingungen (Christou et al., 1998; Hänze et al., 2007; Tudor et al., 1995). Die Zunahme der Expression des *vegfr1* und eine darüber vermittelte Wirkungssteigerung von VEGFA tragen vermutlich zu den strukturellen Veränderungen der pulmonalen Gefäße in der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.1.7) bei. Die Regulation der Expression der *vegfr*-Rezeptoren findet in den Lungen von Hypoxie-exponierten Siah2WT und Siah2KO Mäusen in vergleichbarem Maße statt (keine differentielle Regulation unter dem Effekt „knockout“). Dieses Ergebnis korreliert mit der bei Siah2KO Mäusen und ihren WT-Kontrollen vergleichbar stark ausgeprägten Muskularisierung und Wandstärke (Kapitel 3.1.7). Die Untersuchung der pulmonalen *vegfa* und *vegfr2* Genexpression der Siah2-Hypoxiegruppe ergab keine differentielle Regulation unter dem Effekt „Sauerstoffgehalt“ und geht somit nicht mit der in der Literatur beschriebenen Heraufregulation dieser Gene unter Hypoxie konform (Christou et al., 1998; Hänze et al., 2007; Tudor et al., 1995).

In den rechten Ventrikeln der Siah2 Hypoxie- und „banding“-Gruppe zeigte sich ebenfalls keine konklusive Regulation von *vegfa*, *vegfr1* und *vegfr2*. Auch unter den diesen Analysen zugrundeliegenden Versuchsbedingungen globale Hypoxie und milde Hypertrophie (Effekt „Sauerstoffgehalt“) sowie lokale Hypoxie, Drucküberladung und Hypertrophie (Effekt „Operationsmethode“) wären Veränderungen in der Genexpression zu erwarten gewesen (Izumiya et al., 2006; Kajdaniuk et al., 2011a; Madonna and De Caterina, 2009).

Interessant ist, dass der Effekt „knockout“ in keiner Gruppe auf keines der untersuchten Gene einen Einfluss hatte. Einschränkend muss der geringe Stichprobenumfang (n=5), der zu einer ausbleibenden statistisch konklusiven Regulation der untersuchten Gene führen könnte, beachtet werden. Des Weiteren können neben der HIF-Signalkaskade verschiedene andere Mechanismen an der Regulation von VEGFA beteiligt sein. So zeigen HIF1 α KO-Mäuse eine gesteigerte VEGF Expression (Hänze et al., 2007) und Mediatoren wie ROS und nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells (NF κ B) führen zur Induktion von VEGF und VEGF-R2 (Gonzalez-Pacheco et al., 2006; Ziel et al., 2005). Weiterhin beobachteten Drake et al., dass der VEGFA-Gehalt in versagenden rechten Ventrikeln nicht mit der HIF-Expression korreliert (Drake et al., 2011).

Weder die Ergebnisse der VEGFA Proteinexpressionsanalysen (3.1.10.3, 3.2.10.3) noch die Resultate der Untersuchungen der Genexpression von *vegfa* und seiner beiden Rezeptoren *vegfr1* und *vegfr2* (3.1.10.4, 3.2.10.4) ergaben statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen Siah2WT und KO Mäusen. Vascular endothelial growth factor scheint also nicht das Zielprotein am Ende der Siah-Signalkaskade zu sein, das zur Ausprägung des kardialen Phänotypes der SiahKO Mäuse führt. Die Suche muss weiter gehen...

4.5 Resümee

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass den Siah-Ubiquitinligasen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie zukommt. SiahKO-Mäuse entwickeln unter chronischer Hypoxie einen kardialen Phänotyp, während das pulmonale Remodeling unbeeinflusst bleibt. Die Deletion der Siah-Ubiquitinligasen führt zu einer Protektion der kardialen Funktion der Mäuse im Hypoxiemodell mit additivem Effekt des Verlustes von Siah2 und Siah1a. Das Fehlen von Siah2 trägt im „banding“-Modell ebenfalls zur Konservierung der kardialen Funktion bei, während die additive Gendeletion von *siah2* und *siah1a* gegenteilig zu einem Verlust der Protektion bzw. sogar zu einer maladaptiven Entwicklung führt. Die erhöhte Expression von PHD3 bei SiahKO Mäusen impliziert eine entscheidene Rolle dieser Prolyl-4-Hydroxylase und ihrer Beeinflussung der HIF-Signalkaskade bei der Entwicklung des kardialen Phänotypes. Die vorliegenden Daten sprechen für eine zunächst protektive Wirkung niedriger kardialer HIF-Konzentrationen, die einem empfindlichen Gleichgewicht unterliegen und bei einem zu starken Absinken oder zu heftigen Stimulus (additive Deletion von *siah2* und *siah1a* plus PAB) zu einer maladaptiven Entwicklung führen. Vascular endothelial growth factor und seine Rezeptoren scheinen nicht verantwortlich für die Entstehung des kardialen Phänotypes der Siah-knockout-Tiere zu sein.

5. Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie des Menschen umfasst eine Reihe verschiedener Erkrankungen mit multifaktoriellen Ätiologien, die als gemeinsames Kriterium eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes und Gefäßwiderstandes der Lungenstrombahn verbindet. Die Druckerhöhung innerhalb des kleinen Kreislaufs führt zu einer erheblichen Belastung des rechten Herzens mit resultierender rechtsventrikulärer Hypertrophie und terminaler Dekompensation. Das klinische Ausmaß und der Verlauf der Erkrankung werden entscheidend durch die Funktion des rechten Ventrikels determiniert. Aktuell mangelt es noch immer an Therapien, die gleichzeitig eine positive Beeinflussung des pulmonalen Gefäßremodeling und der rechtsventrikulären Funktion ermöglichen. Auch in der Tiermedizin spielt die PH eine Rolle. Sie ist für wirtschaftliche Einbußen im Nutztiersektor (Rind, Geflügel) verantwortlich und gewinnt im Kleintierbereich (Hund) aufgrund fortschreitender Diagnostik und Therapiemöglichkeiten ebenfalls vermehrt an Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals die Rolle der Siah-Ubiquitinligasen in der Pathogenese der PH erforscht werden. Diese regulieren eine Reihe verschiedener Signalkaskaden, die sowohl im Rahmen der pulmonalen Veränderungen der PH als auch in der rechtsventrikulären Hypertrophie eine Rolle spielen. Siah2 und Siah1/2 knockout-Mäuse sowie ihre entsprechenden Wildtypkontrollen wurden in zwei verschiedenen Tiermodellen der PH untersucht. Es wurden das Hypoxiemodell, ein häufig verwendetes Modell zur Simulation der milden Formen der PH, sowie das Modell des pulmonalarteriellen „banding“, das die Untersuchung einer von der pulmonalarteriellen Gefäßstrombahn unabhängigen Rechtsherzhypertrophie ermöglicht, eingesetzt.

Echokardiografische Verlaufskontrollen, terminale invasive hämodynamische Messungen und die Bestimmung verschiedener Maße für die Rechtsherzhypertrophie zeigten eine deutliche Protektion der Siah2KO und Siah1/2KO Tiere im Hypoxiemodell mit additivem Effekt durch Deletion beider Siah-Isoformen. Interessanterweise wiesen die verschiedenen Gruppen keine Unterschiede bei der morphometrischen Quantifizierung des pulmonalen Remodeling auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Siah-Ubiquitinligasen im pulmonalen Geschehen keine Rolle spielen, während sie die kardiale Funktion entscheidend beeinflussen. Diese Schlussfolgerung untermauern die echokardiografischen und

hämodynamischen Untersuchungen, sowie die Rechtsherzratios und die rechtsventrikuläre Histologie der „banding“-operierten KO-Gruppen.

Ein interessantes Ergebnis im „banding“-Modell war die maladaptive rechtsventrikuläre Entwicklung der Siah1/2KO Tiere, welche im Hypoxiemodell geschützt waren. Siah2KO Mäuse zeigten hingegen in beiden Tiermodellen eine partielle Protektion. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu akuten hypoxischen Bedingungen unter chronischer Hypoxie keine Regulation der Genexpression der Siah-Ubiquitinligasen in Herz und Lunge erfolgt. Eine gesteigerte Funktionalität von Siah geht unter chronisch hypoxischen Bedingungen also nicht auf eine Steigerung der Expression zurück. Eine erhöhte Expression der HIF-regulierenden Prolyl-4-Hydroxylase PHD3 bei SiahKO Mäusen impliziert eine entscheidende Rolle dieses Enzyms und der resultierenden Beeinflussung der HIF-Signalkaskade bei der Entwicklung des kardialen Phänotypes. Derzeit wird kontrovers diskutiert, ob hohe oder geringe HIF-Konzentrationen zu einer Protektion der kardialen Funktion führen. Die vorliegenden Daten sprechen für eine zunächst protektive Auswirkung niedriger kardialer HIF-Spiegel, die jedoch einem empfindlichen Gleichgewicht unterliegen und bei einem zu starken Absinken oder zu heftigen Stimulus (additive Deletion von Siah2 und Siah1a plus PAB) in einer maladaptiven Entwicklung münden. Auf der Suche nach dem verantwortlichen Effektorprotein wurde die mRNA- und Proteinexpression von VEGFA und seinen Rezeptoren untersucht. Aufgrund der geringfügigen bzw. nicht statistisch konklusiven Expressionsunterschiede liegt allerdings der Schluss nahe, dass die VEGF-Signalkaskade nicht verantwortlich für die Entstehung des kardialen Phänotypes der Siah-knockout-Tiere ist.

6. Summary

Human pulmonary hypertension comprises several diseases of multifactorial etiology, all characterized by an increased pulmonary arterial pressure and vascular resistance in terminal pulmonary vessels. Elevated blood pressure in the low pressure pulmonary circulation system leads to an extensive afterload on the right ventricle, resulting in right heart hypertrophy and terminal decompensation. The clinical degree and outcome of PH are determined by right ventricular function. To date there are still no therapeutic approaches available which are able to simultaneously influence pulmonary vascular remodeling and right ventricular function. Being responsible for financial loss in farm animal husbandry (cattle, poultry) PH is also of importance in veterinary medicine. Furthermore, PH is gaining more importance in small animal medicine (dogs) due to improvements in diagnostic and therapeutic possibilities.

The aim of the present study was to investigate the role of the Siah ubiquitinligases in the pathogenesis of PH for the first time. Siah ubiquitinligases regulate several distinct signaling pathways which are involved in pulmonary changes in the context of PH, as well as in right ventricular hypertrophy. Siah2 and Siah1/2 knockout mice and wildtype controls were examined in two different animal models of PH, the chronic hypoxia model, which is commonly used to simulate mild forms of PH; and the pulmonary artery banding model, which enables the investigation of right ventricular hypertrophy independently of pulmonary vascular changes.

Echocardiographic staging measurements, terminal invasive hemodynamic measurements and the determination of distinct right heart ratios revealed Siah2KO and Siah1/2KO animals as partially protected in the chronic hypoxic model with an additive effect by the deletion of both Siah isoforms. Interestingly, morphometric quantification of small pulmonary artery remodeling did not reveal any differences in any of the groups, suggesting that Siah ubiquitinligases do not play a major role in pulmonary pathology, although they crucially influence cardiac function. This conclusion was confirmed by echocardiographic and hemodynamic measurements as well as the right heart ratios and right ventricular morphometry of the pulmonary-artery-banded knockout mice. Interestingly, Siah1/2KO mice developed a maladaptive right ventricular function in the

banding model, even though these mice were protected in chronic hypoxia. In contrast, Siah2KO mice were partially protected in both disease models.

It was shown that, unlike in acute hypoxia, mRNA expression of Siah ubiquitinligases in lung and heart was not regulated in chronic hypoxia, indicating that an increased function of Siah in chronic hypoxia is not due to an increased expression. Elevated levels of HIF-regulating prolyl-4-hydroxylase (PHD) 3 implicated a crucial role for this enzyme to influence the HIF signal transduction cascade in the development of the cardiac phenotype of SiahKO mice. It is controversial whether high or low levels of HIF have protective cardiac effects. The present data indicate a protective effect of low cardiac HIF-levels, however, HIF effects seem to underlie a sensitive equilibration, leading to maladaptive development when getting too low or in case the stimulus being too severe (additive deletion of Siah2 and Siah1a plus PAB). To identify more distal parts of the Siah/HIF signaling cascade, mRNA and protein expression of VEGF and VEGF receptors were investigated. Minor differences in expression suggest VEGF signaling not to be the key player for the development of the cardiac phenotype in Siah knockout mice.

7. Literaturverzeichnis

Ahmed, A. U., Schmidt, R. L., Park, C. H., Reed, N. R., Hesse, S. E., Thomas, C. F., Molina, J. R., Deschamps, C., Yang, P., Aubry, M. C. et al. (2008). Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth. *J Natl Canc Inst* **100**, 1606-1629.

Alpert, N. R. and Mulieri, L. A. (1982). Increased myothermal economy of isometric force generation in compensated cardiac hypertrophy induced by pulmonary artery constriction in the rabbit. A characterization of heat liberation in normal and hypertrophied right ventricular papillary muscles. *Circ Res* **50**, 491-500.

Amson, R. B., Nemani, M., Roperch, J. P., Israeli, D., Bougueleret, L., Le Gall, I., Medhioub, M., Linares-Cruz, G., Lethrosne, F., Pasturaud, P. et al. (1996). Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3953-3957.

Anand, I. S., Harris, E., Ferrari, R., Pearce, P. and Harris, P. (1986). Pulmonary haemodynamics of the yak, cattle, and cross breeds at high altitude. *Thorax* **41**, 696-700.

Angelini, D. J., Su, Q., Kolosova, I. A., Fan, C., Skinner, J. T., Yamaji-Kegan, K., Collector, M., Sharkis, S. J. and Johns, R. A. (2010). Hypoxia-induced mitogenic factor (HIMF/FIZZ1/RELM alpha) recruits bone marrow-derived cells to the murine pulmonary vasculature. *PLoS One* **5**, e11251.

Appelhoff, R. J., Tian, Y. M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. and Gleadle, J. M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* **279**, 38458-38465.

Au, K. W., Kou, C. Y., Woo, A. Y., Chim, S. S., Fung, K. P., Cheng, C. H., Waye, M. M. and Tsui, S. K. (2006). Calcyclin binding protein promotes DNA synthesis and differentiation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Cell Biochem* **98**, 555-566.

Bach, J. F., Rozanski, E. A., MacGregor, J., Betkowski, J. M. and Rush, J. E. (2006). Retrospective evaluation of sildenafil citrate as a therapy for pulmonary hypertension in dogs. *J Vet Intern Med* **20**, 1132-1135.

Badesch, D. B., Champion, H. C., Sanchez, M. A., Hooper, M. M., Loyd, J. E., Manes, A., McGoon, M., Naeije, R., Olschewski, H., Oudiz, R. J. et al. (2009). Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**, S55-S66.

Bar, H., Kreuzer, J., Cojoc, A. and Jahn, L. (2003). Upregulation of embryonic transcription factors in right ventricular hypertrophy. *Basic Res Cardiol* **98**, 285-294.

Barst, R. J., Rubin, L. J., McGoon, M. D., Caldwell, E. J., Long, W. A. and Levy, P. S. (1994). Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. *Ann Intern Med* **121**, 409-415.

- Barth, S., Edlich, F., Berchner-Pfannschmidt, U., Gneuss, S., Jahreis, G., Hasgall, P. A., Fandrey, J., Wenger, R. H. and Camenisch, G.** (2009). Hypoxia-inducible factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein abundance depends on integral membrane anchoring of FKBP38. *J Biol Chem* **284**, 23046-23058.
- Bekeredjian, R., Walton, C. B., MacCannell, K. A., Ecker, J., Kruse, F., Outten, J. T., Sutcliffe, D., Gerard, R. D., Bruick, R. K. and Shoheit, R. V.** (2010). Conditional HIF-1 α expression produces a reversible cardiomyopathy. *PLoS One* **5**, e11693.
- Belknap, J. K., Orton, E. C., Ensley, B., Tucker, A. and Stenmark, K. R.** (1997). Hypoxia increases bromodeoxyuridine labeling indices in bovine neonatal pulmonary arteries. *Am J Respir Cell Mol Biol* **16**, 366-371.
- Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. and McMullen, J. R.** (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Therapeut* **128**, 191-227.
- Berra, E., Ginouves, A. and Pouyssegur, J.** (2006). The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep* **7**, 41-45.
- Bogaard, H. J., Abe, K., Vonk Noordegraaf, A. and Voelkel, N. F.** (2009a). The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* **135**, 794-804.
- Bogaard, H. J., Natarajan, R., Henderson, S. C., Long, C. S., Kraskauskas, D., Smithson, L., Ockaili, R., McCord, J. M. and Voelkel, N. F.** (2009b). Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* **120**, 1951-1960.
- Bonnet, S., Michelakis, E. D., Porter, C. J., Andrade-Navarro, M. A., Thebaud, B., Haromy, A., Harry, G., Moudgil, R., McMurtry, M. S., Weir, E. K. et al.** (2006). An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **113**, 2630-2641.
- Brauckhoff, A., Malz, M., Tschaharganeh, D., Malek, N., Weber, A., Riener, M. O., Soll, C., Samarin, J., Bissinger, M., Schmidt, J. et al.** (2011). Nuclear expression of the ubiquitin ligase seven in absentia homolog (SIAH)-1 induces proliferation and migration of liver cancer cells. *J Hepatol* **55**, 1049-1057.
- Brenner, O.** (1931). Sclerosis of the pulmonary artery with thrombosis. *The Lancet* **217**, 911-914.
- Brown, A. J., Davison, E. and Sleeper, M. M.** (2010). Clinical efficacy of sildenafil in treatment of pulmonary arterial hypertension in dogs. *J Vet Intern Med* **24**, 850-854.
- Budhiraja, R., Tuder, R. M. and Hassoun, P. M.** (2004). Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* **109**, 159-165.
- Bull, T. M., Coldren, C. D., Geraci, M. W. and Voelkel, N. F.** (2007). Gene expression profiling in pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc* **4**, 117-120.

Burke, D. L., Frid, M. G., Kunrath, C. L., Karoor, V., Anwar, A., Wagner, B. D., Strassheim, D. and Stenmark, K. R. (2009). Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L238-L250.

Cai, Z., Zhong, H., Bosch-Marce, M., Fox-Talbot, K., Wang, L., Wei, C., Trush, M. A. and Semenza, G. L. (2008). Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res* **77**, 463-470.

Calzado, M. A., de la Vega, L., Möller, A., Bowtell, D. D. L. and Schmitz, M. L. (2008). An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response. *Nat Cell Biol* **11**, 85-91.

Calzado, M. A., De La Vega, L., Munoz, E. and Schmitz, M. L. (2009). From top to bottom: the two faces of HIPK2 for regulation of the hypoxic response. *Cell Cycle* **8**, 1659-1664.

Carbone, R., Bossone, E., Bottino, G., Monselise, A. and Rubenfire, M. (2005). Secondary pulmonary hypertension--diagnosis and management. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **9**, 331-342.

Carmeliet, P., Ng, Y. S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V. V., Stalmans, I., Mattot, V. et al. (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* **5**, 495-502.

Casad, M. E., Yu, L., Daniels, J. P., Wolf, M. J. and Rockman, H. A. (2012). Deletion of Siah-interacting protein gene in Drosophila causes cardiomyopathy. *Mol Genet Genomics* **287**, 351-360.

Chan, P., Moller, A., Liu, M. C., Sceneay, J. E., Wong, C. S., Waddell, N., Huang, K. T., Dobrovic, A., Millar, E. K., O'Toole, S. A. et al. (2011). The expression of the ubiquitin ligase SIAH2 (seven in absentia homolog 2) is mediated through gene copy number in breast cancer and is associated with a basal-like phenotype and p53 expression. *Breast Cancer Res* **13**, R19.

Chida, M. and Voelkel, N. F. (1996). Effects of acute and chronic hypoxia on rat lung cyclooxygenase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **270**, L872-L878.

Chien, K. R., Zhu, H., Knowlton, K. U., Miller-Hance, W., van-Bilsen, M., O'Brien, T. X. and Evans, S. M. (1993). Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol* **55**, 77-95.

Chilosi, M., Poletti, V., Zamo, A., Lestani, M., Montagna, L., Piccoli, P., Pedron, S., Bertaso, M., Scarpa, A., Murer, B. et al. (2003). Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **162**, 1495-1502.

Christian, P. A., Fiandalo, M. V. and Schwarze, S. R. (2011). Possible role of death receptor-mediated apoptosis by the E3 ubiquitin ligases Siah2 and POSH. *Mol Cancer* **10**, 57.

- Christou, H., Yoshida, A., Arthur, V., Morita, T. and Kourembanas, S.** (1998). Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**, 768-776.
- Cioffi, C. L., Liu, X. Q., Kosinski, P. A., Garay, M. and Bowen, B. R.** (2003). Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 947-953.
- Cisar, C. R., Balog, J. M., Anthony, N. B. and Donoghue, A. M.** (2005). Differential expression of cardiac muscle mitochondrial matrix proteins in broilers from ascites-resistant and susceptible lines. *Poult Sci* **84**, 704-708.
- Cournand, A.** (1950). Some aspects of the pulmonary circulation in normal man and in chronic cardiopulmonary diseases. *Circulation* **2**, 641-657.
- Cournand, A., Bing, R. J., Dexter, L., Dotter, C., Katz, L. N., Warren, J. V. and Wood, E.** (1953). Report of Committee on Cardiac Catheterization and Angiocardiography of the American Heart Association. *Circulation* **7**, 769-773.
- Cournand, A., Bloomfield, R. A. and Lauson, H. D.** (1945a). Double lumen catheter for intravenous and intracardiac blood sampling and pressure recording. *Proc Soc Exp Biol Med* **60**, 73-75.
- Cournand, A., Riley, R. L., Breed, E. S., Baldwin, E. D., Richards, D. W., Lester, M. S. and Jones, M.** (1945b). Measurement of cardiac output in man using the technique of catheterization of the right auricle or ventricle. *J Clin Invest* **24**, 106-116.
- Cusimano, R. J., Ashe, K. A., Abel, J. G., Lichtenstein, S. V. and Salerno, T. A.** (1988). A simple model of right ventricular hypertrophy. *J Invest Surg* **1**, 45-53.
- Czibik, G.** (2010). Complex role of the HIF system in cardiovascular biology. *J Mol Med (Berl)* **88**, 1101-1111.
- D'Alonzo, G. E., Barst, R. J., Ayres, S. M., Bergofsky, E. H., Brundage, B. H., Detre, K. M., Fishman, A. P., Goldring, R. M., Groves, B. M., Kernis, J. T. et al.** (1991). Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* **115**, 343-349.
- Dahal, B. K., Heuchel, R., Pullamsetti, S. S., Wilhelm, J., Ghofrani, H. A., Weissmann, N., Seeger, W., Grimminger, F. and Schermuly, R. T.** (2011). Hypoxic pulmonary hypertension in mice with constitutively active platelet-derived growth factor receptor-beta. *Pulm Circ* **1**, 259-268.
- Della, N. G., Bowtell, D. D. and Beck, F.** (1995). Expression of Siah-2, a vertebrate homologue of *Drosophila sina*, in germ cells of the mouse ovary and testis. *Cell Tissue Res* **279**, 411-419.
- Della, N. G., Senior, P. V. and Bowtell, D. D.** (1993). Isolation and characterisation of murine homologues of the *Drosophila seven in absentia* gene (*sina*). *Development* **117**, 1333-1343.

- Dickins, R. A., Frew, I. J., House, C. M., O'Bryan, M. K., Holloway, A. J., Haviv, I., Traficante, N., de Kretser, D. M. and Bowtell, D. D. L.** (2002). The ubiquitin ligase component *siah1a* is required for completion of meiosis I in male mice. *Mol Cell Biol* **22**, 2294-2303.
- Diercks, D. B., Shumaik, G. M., Harrigan, R. A., Brady, W. J. and Chan, T. C.** (2004). Electrocardiographic manifestations: electrolyte abnormalities. *J Emerg Med* **27**, 153-160.
- Dimitrova, Y. N., Li, J., Lee, Y. T., Rios-Esteves, J., Friedman, D. B., Choi, H. J., Weis, W. I., Wang, C. Y. and Chazin, W. J.** (2010). Direct ubiquitination of beta-catenin by Siah-1 and regulation by the exchange factor TBL1. *J Biol Chem* **285**, 13507-13516.
- Domino, K. B., Chen, L., Alexander, C. M., Williams, J. J., Marshall, C. and Marshall, B. E.** (1984). Time course and responses of sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction in the dog. *Anesthesiology* **60**, 562-566.
- Drake, J. I., Bogaard, H. J., Mizuno, S., Clifton, B., Xie, B., Gao, Y., Dumur, C. I., Fawcett, P., Voelkel, N. F. and Natarajan, R.** (2011). Molecular signature of a right heart failure program in chronic severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **45**, 1239-1247.
- Dresdale, D. T., Michtom, R. J. and Schultz, M.** (1954). Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance. *Bull N Y Acad Med* **30**, 195-207.
- Dumas, J. P., Bardou, M., Goirand, F. and Dumas, M.** (1999). Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Gen Pharmacol* **33**, 289-297.
- Dumitrascu, R., Weissmann, N., Ghofrani, H. A., Dony, E., Beuerlein, K., Schmidt, H., Stasch, J. P., Gnoth, M. J., Seeger, W., Grimminger, F. et al.** (2006). Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation* **113**, 286-295.
- Eckle, T., Kohler, D., Lehmann, R., El Kasmi, K. and Eltzschig, H. K.** (2008). Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation* **118**, 166-175.
- Eddahibi, S., Guignabert, C., Barlier-Mur, A. M., Dewachter, L., Fadel, E., Dartevelle, P., Humbert, M., Simonneau, G., Hanoun, N., Saurini, F. et al.** (2006). Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* **113**, 1857-1864.
- Euler, U. S. v. and Liljestrand, G.** (1946). Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiologica Scandinavica* **12**, 301-320.
- Farkas, L., Farkas, D., Ask, K., Moller, A., Gauldie, J., Margetts, P., Inman, M. and Kolb, M.** (2009). VEGF ameliorates pulmonary hypertension through inhibition of endothelial apoptosis in experimental lung fibrosis in rats. *J Clin Invest* **119**, 1298-1311.
- Ferrara, N., Gerber, H. P. and LeCouter, J.** (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669-676.

- Fong, G. H. and Takeda, K.** (2008). Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ* **15**, 635-641.
- Fowler, K. T. and Read, J.** (1963). Effect of alveolar hypoxia on zonal distribution of pulmonary blood flow. *J Appl Physiol* **18**, 244-250.
- Frew, I. J., Hammond, V. E., Dickins, R. A., Quinn, J. M. W., Walkley, C. R., Sims, N. A., Schnall, R., Della, N. G., Holloway, A. J., Digby, M. R. et al.** (2003). Generation and analysis of *siah2* mutant mice. *Mol Cell Biol* **23**, 9150-9161.
- Frew, I. J., Sims, N. A., Quinn, J. M., Walkley, C. R., Purton, L. E., Bowtell, D. D. and Gillespie, M. T.** (2004). Osteopenia in *Siah1a* mutant mice. *J Biol Chem* **279**, 29583-29588.
- Frid, M. G., Brunetti, J. A., Burke, D. L., Carpenter, T. C., Davie, N. J., Reeves, J. T., Roedersheimer, M. T., van Rooijen, N. and Stenmark, K. R.** (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* **168**, 659-669.
- Friehs, I. and del Nido, P. J.** (2003). Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury. *Ann Thorac Surg* **75**, S678-684.
- Fukuba, H., Takahashi, T., Jin, H. G., Kohriyama, T. and Matsumoto, M.** (2008). Abundance of asparaginyl-hydroxylase FIH is regulated by *Siah-1* under normoxic conditions. *Neurosci Lett* **433**, 209-214.
- Fukumoto, Y. and Shimokawa, H.** (2011). Recent progress in the management of pulmonary hypertension. *Circ J* **75**, 1801-1810.
- Galie, N., Torbicki, A., Barst, R., Dartevelle, P., Haworth, S., Higenbottam, T., Olschewski, H., Peacock, A., Pietra, G., Rubin, L. J. et al.** (2004). Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The task force on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension of the european society of cardiology. *Eur Heart J* **25**, 2243-2278.
- Gan, C., Lankhaar, J. W., Marcus, J. T., Westerhof, N., Marques, K. M., Bronzwaer, J. G., Boonstra, A., Postmus, P. E. and Vonk-Noordegraaf, A.** (2006). Impaired left ventricular filling due to right-to-left ventricular interaction in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H1528-1533.
- Geens, J. H., Trenson, S., Rega, F. R., Verbeken, E. K. and Meyns, B. P.** (2009). Ovine models for chronic heart failure. *Int J Artif Organs* **32**, 496-506.
- Giaid, A. and Saleh, D.** (1995). Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **333**, 214-221.
- Golovina, V. A., Platoshyn, O., Bailey, C. L., Wang, J., Limsuwan, A., Sweeney, M., Rubin, L. J. and Yuan, J. X.** (2001). Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca^{2+} entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H746-755.

- Gomez, A., Bialostozky, D., Zajarias, A., Santos, E., Palomar, A., Martinez, M. L. and Sandoval, J.** (2001). Right ventricular ischemia in patients with primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **38**, 1137-1142.
- Gonzalez-Pacheco, F. R., Deudero, J. J., Castellanos, M. C., Castilla, M. A., Alvarez-Arroyo, M. V., Yague, S. and Caramelo, C.** (2006). Mechanisms of endothelial response to oxidative aggression: protective role of autologous VEGF and induction of VEGFR2 by H₂O₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H1395-1401.
- Guo, Y., Xiao, L., Sun, L. and Liu, F.** (2012). Wnt/beta-catenin signaling: a promising new target for fibrosis diseases. *Physiol Res* **61**, 337-346.
- Habelhah, H., Frew, I. J., Laine, A., Janes, P. W., Relaix, F., Sassoon, D., Bowtell, D. D. and Ronai, Z.** (2002). Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *EMBO J* **21**, 5756-5765.
- Habelhah, H., Laine, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Gershwin, M. E., Bowtell, D. D. and Ronai, Z.** (2004). Regulation of 2-oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase stability by the RING finger ubiquitin ligase Siah. *J Biol Chem* **279**, 53782-53788.
- Haglund, K. and Dikic, I.** (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* **24**, 3353-3359.
- Han, M. K., McLaughlin, V. V., Criner, G. J. and Martinez, F. J.** (2007). Pulmonary diseases and the heart. *Circulation* **116**, 2992-3005.
- Hanna, J. M.** (1999). Climate, altitude, and blood pressure. *Hum Biol* **71**, 553-582.
- Hänze, J., Weissmann, N., Grimminger, F., Seeger, W. and Rose, F.** (2007). Cellular and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor driven vascular remodeling. *Thromb Haemost* **97**, 774-787.
- Hara, M. R., Cascio, M. B. and Sawa, A.** (2006). GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 502-509.
- Hara, M. R. and Snyder, S. H.** (2006). Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade. *Cell Mol Neurobiol* **26**, 527-538.
- Haworth, S. G.** (1988). Pulmonary vascular remodeling in neonatal pulmonary hypertension. State of the art. *Chest* **93**, 133S-138S.
- Haworth, S. G.** (2007). The cell and molecular biology of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *Eur Heart J Suppl* **9**, H10-H16.
- Heath, D., Edwards, C., Winson, M. and Smith, P.** (1973). Effects on the right ventricle, pulmonary vasculature, and carotid bodies of the rat of exposure to, and recovery from, simulated high altitude. *Thorax* **28**, 24-28.
- Henik, R.** (2007). Pulmonary hypertension: more than Viagra. *Proceedings of Int Vet Emer Crit Care Symp*.

- Herrmann, J., Samee, S., Chade, A., Rodriguez Porcel, M., Lerman, L. O. and Lerman, A.** (2005). Differential effect of experimental hypertension and hypercholesterolemia on adventitial remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 447-453.
- Hershko, A. and Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
- Higenbottam, T.** (1987). The place of prostacyclin in the clinical management of primary pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis* **136**, 782-785.
- Higenbottam, T., Wheeldon, D., Wells, F. and Wallwork, J.** (1984). Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin). *Lancet* **1**, 1046-1047.
- Hoeper, M. M.** (2009). The new definition of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **34**, 790-791.
- Hoeper, M. M.** (2010). [Pulmonary hypertension - historical development, current therapy and perspectives]. *Pneumologie* **64**, 577-582.
- Hoeper, M. M. and Dinh-Xuan, A. T.** (2008). Pulmonary hypertension: basic concepts and practical management. *Eur Respir J* **31**, 236-237.
- Holloway, A. J., Della, N. G., Fletcher, C. F., Largespada, D. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Bowtell, D. D.** (1997). Chromosomal mapping of five highly conserved murine homologues of the Drosophila RING finger gene seven-in-absentia. *Genomics* **41**, 160-168.
- Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M. and Cross, M. J.** (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* **19**, 2003-2012.
- Horikawa, I., Fujita, K. and Harris, C. C.** (2011). p53 governs telomere regulation feedback too, via TRF2. *Aging (Albany NY)* **3**, 26-32.
- House, C. M., Moller, A. and Bowtell, D. D. L.** (2009). Siah Proteins: Novel Drug Targets in the Ras and Hypoxia Pathways. *Cancer Res* **69**, 8835-8838.
- Howard, L. S.** (2011). Prognostic factors in pulmonary arterial hypertension: assessing the course of the disease. *Eur Respir Rev* **20**, 236-242.
- Hsieh, C. M., Mishkel, G. J., Cardoso, P. F., Rakowski, H., Dunn, S. C., Butany, J., Weisel, R. D., Patterson, G. A. and Cooper, J. D.** (1992). Production and reversibility of right ventricular hypertrophy and right heart failure in dogs. *Ann Thorac Surg* **54**, 104-110.
- Hu, G., Chung, Y. L., Glover, T., Valentine, V., Look, A. T. and Fearon, E. R.** (1997). Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene. *Genomics* **46**, 103-111.

- Hu, G. and Fearon, E. R.** (1999). Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 724-732.
- Huang, Y., Hickey, R. P., Yeh, J. L., Liu, D., Dadak, A., Young, L. H., Johnson, R. S. and Giordano, F. J.** (2004). Cardiac myocyte-specific HIF-1alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J* **18**, 1138-1140.
- Humbert, M.** (2008). Update in pulmonary arterial hypertension 2007. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 574-579.
- Humbert, M., Monti, G., Fartoukh, M., Magnan, A., Brenot, F., Rain, B., Capron, F., Galanaud, P., Duroux, P., Simonneau, G. et al.** (1998). Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J* **11**, 554-559.
- Humbert, M., Morrell, N. W., Archer, S. L., Stenmark, K. R., MacLean, M. R., Lang, I. M., Christman, B. W., Weir, E. K., Eickelberg, O., Voelkel, N. F. et al.** (2004). Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **43**, 13S-24S.
- Ito, N., Nitta, Y., Ohtani, H., Ooshima, A. and Isoyama, S.** (1994). Remodelling of microvessels by coronary hypertension or cardiac hypertrophy in rats. *J Mol Cell Cardiol* **26**, 49-59.
- Izumiya, Y., Shiojima, I., Sato, K., Sawyer, D. B., Colucci, W. S. and Walsh, K.** (2006). Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload. *Hypertension* **47**, 887-893.
- Jin, N., Packer, C. S. and Rhoades, R. A.** (1992). Pulmonary arterial hypoxic contraction: signal transduction. *Am J Physiol* **263**, L73-78.
- Jin, Y., Ratnam, K., Chuang, P. Y., Fan, Y., Zhong, Y., Dai, Y., Mazloom, A. R., Chen, E. Y., D'Agati, V., Xiong, H. et al.** (2012). A systems approach identifies HIPK2 as a key regulator of kidney fibrosis. *Nat Med* **18**, 580-588.
- Jonigk, D., Hoeper, M. M., Kreipe, H. and Langer, F.** (2012). [Histopathological aspects of pulmonary hypertension]. *Pathologe* **33**, 183-191.
- Junqueira, L. C. and Carneiro, J.** (1996). Histologie. *Springer Verlag* **4. Auflage**.
- Kaelin, W. G., Jr. and Ratcliffe, P. J.** (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* **30**, 393-402.
- Kajdaniuk, D., Marek, B., Foltyn, W. and Kos-Kudla, B.** (2011a). Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynol Pol* **62**, 444-455.

- Kajdaniuk, D., Marek, B., Foltyn, W. and Kos-Kudla, B.** (2011b). Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 2: in endocrinology and oncology. *Endokrynol Pol* **62**, 456-464.
- Kellihan, H. B. and Stepien, R. L.** (2010). Pulmonary hypertension in dogs: diagnosis and therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **40**, 623-641.
- Kellum, H. B. and Stepien, R. L.** (2007). Sildenafil citrate therapy in 22 dogs with pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med* **21**, 1258-1264.
- Kelly, R. A., Eid, H., Kramer, B. K., O'Neill, M., Liang, B. T., Reers, M. and Smith, T. W.** (1990). Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Clin Invest* **86**, 1164-1171.
- Khanna, S., Roy, S., Maurer, M., Ratan, R. R. and Sen, C. K.** (2006). Oxygen-sensitive reset of hypoxia-inducible factor transactivation response: prolyl hydroxylases tune the biological normoxic set point. *Free Radic Biol Med* **40**, 2147-2154.
- Khurana, A., Nakayama, K., Williams, S., Davis, R. J., Mustelin, T. and Ronai, Z.** (2006). Regulation of the ring finger E3 ligase Siah2 by p38 MAPK. *J Biol Chem* **281**, 35316-35326.
- Kim, H., Scimia, M. C., Wilkinson, D., Trelles, R. D., Wood, M. R., Bowtell, D., Dillin, A., Mercola, M. and Ronai, Z. A.** (2011). Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia. *Mol Cell* **44**, 532-544.
- Kim, K. K., Wei, Y., Szekeres, C., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Hill, M. L., Frank, J. A., Brumwell, A. N., Wheeler, S. E., Kreidberg, J. A. et al.** (2009a). Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **119**, 213-224.
- Kim, S. Y., Choi, D. W., Kim, E. A. and Choi, C. Y.** (2009b). Stabilization of HIPK2 by escape from proteasomal degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase Siah1. *Cancer Lett* **279**, 177-184.
- Kirchengast, M. and Munter, K.** (1999). Endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in cardiovascular remodeling. *Proc Soc Exp Biol Med* **221**, 312-325.
- Klöppling, C.** (2010). Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie: Reversibilität und therapeutische Effekte durch körperliches Training. *VVB Laufersweiler Verlag*.
- Kosanovic, D., Kojonazarov, B., Luitel, H., Dahal, B. K., Sydykov, A., Cornitescu, T., Janssen, W., Brandes, R. P., Davie, N., Ghofrani, H. A. et al.** (2011). Therapeutic efficacy of TBC3711 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Respir Res* **12**, 87.
- Krishnan, J., Suter, M., Windak, R., Krebs, T., Felley, A., Montessuit, C., Tokarska-Schlattner, M., Aasum, E., Bogdanova, A., Perriard, E. et al.** (2009). Activation of a HIF1alpha-PPARgamma axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metab* **9**, 512-524.

- Laks, L., Lehrhaft, B., Grunstein, R. R. and Sullivan, C. E.** (1997). Pulmonary artery pressure response to hypoxia in sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 193-198.
- Lam, A. P. and Gottardi, C. J.** (2011). beta-catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target. *Curr Opin Rheumatol* **23**, 562-567.
- Le Moan, N., Houslay, D. M., Christian, F., Houslay, M. D. and Akassoglou, K.** (2011). Oxygen-dependent cleavage of the p75 neurotrophin receptor triggers stabilization of HIF-1alpha. *Mol Cell* **44**, 476-490.
- Leeuwenburgh, B. P., Schoof, P. H., Steendijk, P., Baan, J., Mooi, W. J. and Helbing, W. A.** (2003). Chronic and adjustable pulmonary artery banding. *J Thorac Cardiovasc Surg* **125**, 231-237.
- Liebich, H.-G.** (1999). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. *Schattauer Verlag* **3. Auflage**.
- Liu, J., Ormsby, A., Oja-Tebbe, N. and Pagano, P. J.** (2004). Gene transfer of NAD(P)H oxidase inhibitor to the vascular adventitia attenuates medial smooth muscle hypertrophy. *Circ Res* **95**, 587-594.
- Liu, J., Stevens, J., Rote, C. A., Yost, H. J., Hu, Y., Neufeld, K. L., White, R. L. and Matsunami, N.** (2001). Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell* **7**, 927-936.
- Löffler, G. and Petrides, P. E.** (2002). Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Verlag*, 295-299.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S. and Weissman, A. M.** (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11364-11369.
- Madonna, R. and De Caterina, R.** (2009). VEGF receptor switching in heart development and disease. *Cardiovasc Res* **84**, 4-6.
- Mandegar, M., Fung, Y. C., Huang, W., Remillard, C. V., Rubin, L. J. and Yuan, J. X.** (2004). Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res* **68**, 75-103.
- Mann, D. L.** (2002). Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* **91**, 988-998.
- Marcus, J. T., Gan, C. T., Zwanenburg, J. J., Boonstra, A., Allaart, C. P., Gotte, M. J. and Vonk-Noordegraaf, A.** (2008). 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* **51**, 750-757.
- Marino, T. A., Brody, E., Lauva, I. K., Kent, R. L. and Cooper, G.** (1986). Reversibility of the structural effects of pressure overload hypertrophy of cat right ventricular myocardium. *Anat Rec* **214**, 141-147.

- Marticorena, E., Ruiz, L., Severino, J., Galvez, J. and Penaloza, D.** (1969). Systemic blood pressure in white men born at sea level: changes after long residence at high altitudes. *Am J Cardiol* **23**, 364-368.
- Matsuzawa, S., Li, C., Ni, C. Z., Takayama, S., Reed, J. C. and Ely, K. R.** (2003). Structural analysis of Siah1 and its interactions with Siah-interacting protein (SIP). *J Biol Chem* **278**, 1837-1840.
- Matsuzawa, S., Takayama, S., Froesch, B. A., Zapata, J. M. and Reed, J. C.** (1998). p53-inducible human homologue of Drosophila seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *EMBO J* **17**, 2736-2747.
- Matsuzawa, S. I. and Reed, J. C.** (2001). Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* **7**, 915-926.
- May, D., Gilon, D., Djonov, V., Itin, A., Lazarus, A., Gordon, O., Rosenberger, C. and Keshet, E.** (2008). Transgenic system for conditional induction and rescue of chronic myocardial hibernation provides insights into genomic programs of hibernation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 282-287.
- McLaughlin, V. V., Archer, S. L., Badesch, D. B., Barst, R. J., Farber, H. W., Lindner, J. R., Mathier, M. A., McGoon, M. D., Park, M. H., Rosenson, R. S. et al.** (2009). ACCF/AHA 2009 Expert consensus document on pulmonary hypertension. *J Am Coll of Cardiol* **53**, 1573-1619.
- McMurray, J., Chopra, M., Abdullah, I., Smith, W. E. and Dargie, H. J.** (1993). Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* **14**, 1493-1498.
- Mendelsohn, M. E.** (2005). Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* **308**, 1583-1587.
- Merck Sharp & Dohme Corp., a. s. o. M. C., Inc.** (2011). The Merck Veterinary Manual. <http://www.merckvetmanual.com>
- Meyrick, B. and Reid, L.** (1979). Hypoxia and incorporation of 3H-thymidine by cells of the rat pulmonary arteries and alveolar wall. *Am J Pathol* **96**, 51-70.
- Meyrick, B. and Reid, L.** (1983). Pulmonary hypertension. Anatomic and physiologic correlates. *Clin Chest Med* **4**, 199-217.
- Mittal, M., Gu, X. Q., Pak, O., Pamenter, M. E., Haag, D., Fuchs, D. B., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Brandes, R. P., Seeger, W. et al.** (2012). Hypoxia induces Kv channel current inhibition by increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **52**, 1033-1042.
- Moller, A., House, C. M., Wong, C. S., Scanlon, D. B., Liu, M. C., Ronai, Z. and Bowtell, D. D.** (2009). Inhibition of Siah ubiquitin ligase function. *Oncogene* **28**, 289-296.

Morrell, N. W., Adnot, S., Archer, S. L., Dupuis, J., Jones, P. L., MacLean, M. R., McMurtry, I. F., Stenmark, K. R., Thistlethwaite, P. A., Weissmann, N. et al. (2009). Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**, S20-S31.

Moslehi, J., Minamishima, Y. A., Shi, J., Neubergh, D., Charytan, D. M., Padera, R. F., Signoretti, S., Liao, R. and Kaelin, W. G., Jr. (2010). Loss of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in cardiomyocytes phenocopies ischemic cardiomyopathy. *Circulation* **122**, 1004-1016.

Murdoch, C. E., Zhang, M., Cave, A. C. and Shah, A. M. (2006). NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res* **71**, 208-215.

Myllyharju, J. (2008). Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets. *Ann Med* **40**, 402-417.

Naeije, R., Melot, C., Mols, P. and Hallemans, R. (1982). Effects of vasodilators on hypoxic pulmonary vasoconstriction in normal man. *Chest* **82**, 404-410.

Naeye, R. L. (1967). Polycythemia and hypoxia. Individual effects on heart and pulmonary arteries. *Am J Pathol* **50**, 1027-1033.

Nagendran, J., Archer, S. L., Soliman, D., Gurtu, V., Moudgil, R., Haromy, A., St Aubin, C., Webster, L., Rebeyka, I. M., Ross, D. B. et al. (2007). Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* **116**, 238-248.

Nakayama, K. (2009). Cellular signal transduction of the hypoxia response. *J Biochem* **146**, 757-765.

Nakayama, K., Frew, I. J., Hagensen, M., Skals, M., Habelhah, H., Bhoumik, A., Kadoya, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Frappell, P. B. et al. (2004). Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 α abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* **117**, 941-952.

Nakayama, K., Gazdoui, S., Abraham, R., Pan, Z. Q. and Ronai, Z. (2007). Hypoxia-induced assembly of prolyl hydroxylase PHD3 into complexes: implications for its activity and susceptibility for degradation by the E3 ligase Siah2. *Biochem J* **401**, 217-226.

Nakayama, K., Qi, J. and Ronai, Z. (2009). The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response. *Molecular Cancer Research* **7**, 443-451.

Nakayama, K. and Ronai, Z. (2004). Siah: new players in the cellular response to hypoxia. *Cell Cycle* **3**, 1345-1347.

Newman, J. H., Holt, T. N., Hedges, L. K., Womack, B., Memon, S. S., Willers, E. D., Wheeler, L., Phillips, J. A., 3rd and Hamid, R. (2011). High-altitude pulmonary hypertension in cattle (brisket disease): Candidate genes and gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells. *Pulm Circ* **1**, 462-469.

- Newman, J. H., Trembath, R. C., Morse, J. A., Grunig, E., Loyd, J. E., Adnot, S., Coccolo, F., Ventura, C., Phillips, J. A., Knowles, J. A. et al.** (2004). Genetic basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **43**, S33-S39.
- Oerlemans, M. I., Goumans, M. J., van Middelaar, B., Clevers, H., Doevendans, P. A. and Sluijter, J. P.** (2010). Active Wnt signaling in response to cardiac injury. *Basic Res Cardiol* **105**, 631-641.
- Oikawa, M., Kagaya, Y., Otani, H., Sakuma, M., Demachi, J., Suzuki, J., Takahashi, T., Nawata, J., Ido, T. and Watanabe, J.** (2005). Increased [¹⁸F]fluorodeoxyglucose accumulation in right ventricular free wall in patients with pulmonary hypertension and the effect of epoprostenol. *Journal of the American College of Cardiology* **45**, 1849-1855.
- Olivetti, G., Ricci, R., Lagrasta, C., Maniga, E., Sonnenblick, E. H. and Anversa, P.** (1988). Cellular basis of wall remodeling in long-term pressure overload-induced right ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res* **63**, 648-657.
- Olkowski, A. A.** (2007). Pathophysiology of heart failure in broiler chickens: structural, biochemical, and molecular characteristics. *Poult Sci* **86**, 999-1005.
- Olschewski, H. and Seeger, W.** (1994). [Pathophysiology of pulmonary hypertension]. *Z Kardiol* **83** 181-191.
- Østergaard, L. and Gassmann, M.** (2011). Hypoxia inducible factor and hypoxia-mediated pulmonary hypertension. *PVRI Review* **3**, 5-11.
- Ozaki, M., Marshall, C., Amaki, Y. and Marshall, B. E.** (1998). Role of wall tension in hypoxic responses of isolated rat pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **275**, L1069-L1077.
- Partovian, C., Adnot, S., Raffestin, B., Louzier, V., Levame, M., Mavier, I. M., Lemarchand, P. and Eddahibi, S.** (2000). Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**, 762-771.
- Peake, M. D., Harabin, A. L., Brennan, N. J. and Sylvester, J. T.** (1981). Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species. *J Appl Physiol* **51**, 1214-1219.
- Pickart, C. M. and Eddins, M. J.** (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 55-72.
- Platoshyn, O., Golovina, V. A., Bailey, C. L., Limsuwan, A., Krick, S., Juhaszova, M., Seiden, J. E., Rubin, L. J. and Yuan, J. X.** (2000). Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C1540-1549.
- Pokreisz, P., Marsboom, G. and Janssens, S.** (2007). Pressure overload-induced right ventricular dysfunction and remodelling in experimental pulmonary hypertension: the right heart revisited. *Eur Heart J Suppl* **9**, H75-H84.

- Polekhina, G., House, C. M., Traficante, N., Mackay, J. P., Relaix, F., Sassoon, D. A., Parker, M. W. and Bowtell, D. D.** (2002). Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling. *Nat Struct Biol* **9**, 68-75.
- Qi, J., Nakayama, K., Cardiff, R. D., Borowsky, A. D., Kaul, K., Williams, R., Krajewski, S., Mercola, D., Carpenter, P. M., Bowtell, D. et al.** (2010a). Siah2-dependent concerted activity of HIF and FoxA2 regulates formation of neuroendocrine phenotype and neuroendocrine prostate tumors. *Cancer Cell* **18**, 23-38.
- Qi, J., Nakayama, K., Gaitonde, S., Goydos, J. S., Krajewski, S., Eroshkin, A., Barsagi, D., Bowtell, D. and Ronai, Z.** (2008). The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16713-16718.
- Qi, J., Pellecchia, M. and Ronai, Z. A.** (2010b). The Siah2-HIF-FoxA2 axis in prostate cancer - new markers and therapeutic opportunities. *Oncotarget* **1**, 379-385.
- Quinn, R. L. and Williams, J. G.** (2011a). Canine pulmonary hypertension, Part 1: An in-depth review of its pathophysiology and classifications. *www.dvm360.com*, <http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Cardiology/Canine-pulmonary-hypertension-Part-361-An-in-depth-r/ArticleStandard/Article/detail/740317>.
- Quinn, R. L. and Williams, J. G.** (2011b). Canine pulmonary hypertension, Part 2: Diagnosis and treatment. *www.dvm360.com*, <http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Cardiology/Canine-pulmonary-hypertension-Part-362-Diagnosis-and/ArticleStandard/Article/detail/740316>.
- Remillard, C. V. and Yuan, J. X.** (2004). Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L49-67.
- Revermann, M., Barbosa-Sicard, E., Dony, E., Schermuly, R. T., Morisseau, C., Geisslinger, G., Fleming, I., Hammock, B. D. and Brandes, R. P.** (2009). Inhibition of the soluble epoxide hydrolase attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Hypertens* **27**, 322-331.
- Ricci, A., Cherubini, E., Olivieri, A., Lavra, L., Sciacchitano, S., Scozzi, D., Mancini, R., Ciliberto, G., Bartolazzi, A., Bruno, P. et al.** (2013). Homeodomain-interacting protein kinase2 in human idiopathic pulmonary fibrosis. *J Cell Physiol* **228**, 235-241.
- Rockman, H. A., Ono, S., Ross, R. S., Jones, L. R., Karimi, M., Bhargava, V., Ross, J., Jr. and Chien, K. R.** (1994). Molecular and physiological alterations in murine ventricular dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2694-2698.
- Rohrbach, S., Simm, A., Pregla, R., Franke, C. and Katschinski, D. M.** (2005). Age-dependent increase of prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) 3 expression in human and mouse heart. *Biogerontology* **6**, 165-171.
- Romberg, E. v.** (1891). Ueber Sklerose der Lungenarterie. *Dtsch Arch Klin Med* **1891**, 197-206.

Roncon-Albuquerque, R., Jr., Vasconcelos, M., Lourenco, A. P., Brandao-Nogueira, A., Teles, A., Henriques-Coelho, T. and Leite-Moreira, A. F. (2006). Acute changes of biventricular gene expression in volume and right ventricular pressure overload. *Life Sci* **78**, 2633-2642.

Rosenkranz, S. (2007). Pulmonary hypertension: current diagnosis and treatment. *Clin Res Cardiol* **96**, 527-541.

Rosenkranz, S., Behr, J., Ewert, R., Ghofrani, H. A., Grunig, E., Halank, M., Hoepfer, M. M., Leuchte, H. H., Olschewski, H., Schmeisser, A. et al. (2011). [Right heart catheterization in pulmonary hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* **136**, 2601-2616; quiz 2617-2620.

Rouleau, J. L., Kapuku, G., Pelletier, S., Gosselin, H., Adam, A., Gagnon, C., Lambert, C. and Meloche, S. (2001). Cardioprotective effects of ramipril and losartan in right ventricular pressure overload in the rabbit: importance of kinins and influence on angiotensin II type 1 receptor signaling pathway. *Circulation* **104**, 939-944.

Ryan, J., Bloch, K. and Archer, S. L. (2011). Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *Int J Clin Pract Suppl* **65**, 15-34.

Sano, M., Minamino, T., Toko, H., Miyauchi, H., Orimo, M., Qin, Y., Akazawa, H., Tateno, K., Kayama, Y., Harada, M. et al. (2007). p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* **446**, 444-448.

Schafer, S., Ellinghaus, P., Janssen, W., Kramer, F., Lustig, K., Milting, H., Kast, R. and Klein, M. (2009). Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* **82**, 30-39.

Schermuly, R. and Grimminger, F. (2008). [Update in basic research in the therapy of pulmonary arterial hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* **133 Suppl 6**, S170-S172.

Schermuly, R. T., Dony, E., Ghofrani, H. A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y. J., Weissmann, N., Seeger, W. et al. (2005). Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* **115**, 2811-2821.

Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R. and Grimminger, F. (2011). Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* **8**, 443-455.

Schmidt, Thews and Lang. (2000). Physiologie des Menschen. *Springer Verlag* **28. Auflage**.

Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 588-594.

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **148**, 399-408.

- Shah, M., Stebbins, J. L., Dewing, A., Qi, J., Pellecchia, M. and Ronai, Z. A.** (2009). Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* **22**, 799-808.
- Shang, J., Liu, N., Tanaka, N. and Abe, K.** (2012). Expressions of hypoxic stress sensor proteins after transient cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res* **90**, 648-655.
- Shi, Y., O'Brien, J. E., Fard, A., Mannion, J. D., Wang, D. and Zalewski, A.** (1996). Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* **94**, 1655-1664.
- Shin, J. T. and Semigran, M. J.** (2010). Heart failure and pulmonary hypertension. *Heart Fail Clin* **6**, 215-222.
- Shiojima, I., Sato, K., Izumiya, Y., Schiekofer, S., Ito, M., Liao, R., Colucci, W. S. and Walsh, K.** (2005). Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* **115**, 2108-2118.
- Shirley, K. L., Beckman, D. W. and Garrick, D. J.** (2008). Inheritance of pulmonary arterial pressure in Angus cattle and its correlation with growth. *J Anim Sci* **86**, 815-819.
- Simonneau, G., Galiè, N., Rubin, L. J., Langleben, D., Seeger, W., Domenighetti, G., Gibbs, S., Lebrec, D., Speich, R., Beghetti, M. et al.** (2004). Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **43**, S5-S12.
- Simonneau, G., Robbins, I. M., Beghetti, M., Channick, R. N., Delcroix, M., Denton, C. P., Elliott, C. G., Gaine, S. P., Gladwin, M. T., Jing, Z. C. et al.** (2009). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**, S43-S54.
- Siow, R. C., Mallawaarachchi, C. M. and Weissberg, P. L.** (2003). Migration of adventitial myofibroblasts following vascular balloon injury: insights from in vivo gene transfer to rat carotid arteries. *Cardiovasc Res* **59**, 212-221.
- Sommer, N., Dietrich, A., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Gudermann, T., Schulz, R., Seeger, W., Grimminger, F. and Weissmann, N.** (2008). Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J* **32**, 1639-1651.
- Song, Y., Coleman, L., Shi, J., Beppu, H., Sato, K., Walsh, K., Loscalzo, J. and Zhang, Y. Y.** (2008). Inflammation, endothelial injury, and persistent pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H677-H690.
- Spann, J. F., Jr., Covell, J. W., Eckberg, D. L., Sonnenblick, E. H., Ross, J., Jr. and Braunwald, E.** (1972). Contractile performance of the hypertrophied and chronically failing cat ventricle. *Am J Physiol* **223**, 1150-1157.
- Steiner, S. and Strauer, B. E.** (2009). [Pathophysiology of the right ventricle in lung diseases]. *Internist (Berl)* **50**, 1054, 1056-1058, 1060, passim.
- Stenmark, K. R., Davie, N., Frid, M., Gerasimovskaya, E. and Das, M.** (2006a). Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)* **21**, 134-145.

- Stenmark, K. R., Fagan, K. A. and Frid, M. G.** (2006b). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* **99**, 675-691.
- Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J. and McMurtry, I. F.** (2009). Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L1013-L1032.
- Stepien, R. L.** (2009). Pulmonary arterial hypertension secondary to chronic left-sided cardiac dysfunction in dogs. *J Small Anim Pract* **50 Suppl 1**, 34-43.
- Stiehl, D. P., Wirthner, R., Koditz, J., Spielmann, P., Camenisch, G. and Wenger, R. H.** (2006). Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem* **281**, 23482-23491.
- Stolze, I. P., Tian, Y. M., Appelhoff, R. J., Turley, H., Wykoff, C. C., Gleadle, J. M. and Ratcliffe, P. J.** (2004). Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) in regulating hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional target genes [corrected]. *J Biol Chem* **279**, 42719-42725.
- Stünzi, H. and Weiss, E.** (1990). Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. *Paul Parey Verlag* **8. Auflage**.
- Sullivan, C. C., Du, L., Chu, D., Cho, A. J., Kido, M., Wolf, P. L., Jamieson, S. W. and Thistlethwaite, P. A.** (2003). Induction of pulmonary hypertension by an angiotensin 1/TIE2/serotonin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12331-12336.
- Sylvester, J. T., Shimoda, L. A., Aaronson, P. I. and Ward, J. P.** (2012). Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* **92**, 367-520.
- Szabo, G., Soos, P., Bahrle, S., Radovits, T., Weigang, E., Kekesi, V., Merkely, B. and Hagl, S.** (2006). Adaptation of the right ventricle to an increased afterload in the chronically volume overloaded heart. *Ann Thorac Surg* **82**, 989-995.
- Takahashi, S.** (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull* **34**, 1785-1788.
- Tamura, T., Said, S. and Gerdes, A. M.** (1999). Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure. *Hypertension* **33**, 676-680.
- Tan, X., Hu, S.-H. and Wang, X.-L.** (2007). Possible role of nitric oxide in the pathogenesis of pulmonary hypertension in broilers: a synopsis. *Avian Pathology* **36**, 261-267.
- Tang, Z., Iqbal, M., Cawthon, D. and Bottje, W. G.** (2002). Heart and breast muscle mitochondrial dysfunction in pulmonary hypertension syndrome in broilers (*Gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **132**, 527-540.
- Tarnavski, O.** (2009). Mouse surgical models in cardiovascular research. *Methods Mol Biol* **573**, 115-137.

- Tarnavski, O., McMullen, J. R., Schinke, M., Nie, Q., Kong, S. and Izumo, S.** (2004). Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* **16**, 349-360.
- Tomanek, R. J.** (1990). Response of the coronary vasculature to myocardial hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* **15**, 528-533.
- Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L.** (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* **122**, 339-352.
- Toyoshima, Y., Kanemoto, I., Arai, S. and Toyoshima, H.** (2007). A case of long-term sildenafil therapy in a young dog with pulmonary hypertension. *J Vet Med Sci* **69**, 1073-1075.
- Trubsbach, S. S., Pircher, I., Treml, B., Lockinger, A. and Kleinsasser, A. T.** (2011). [Respiratory system at high altitude: pathophysiology and novel therapy options]. *Wien Klin Wochenschr* **123**, 67-77.
- Tuder, R. M., Flook, B. E. and Voelkel, N. F.** (1995). Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* **95**, 1798-1807.
- Tuder, R. M., Marecki, J. C., Richter, A., Fijalkowska, I. and Flores, S.** (2007a). Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* **28**, 23-42, vii.
- Tuder, R. M. and Yun, J. H.** (2008). Vascular endothelial growth factor of the lung: friend or foe. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 255-260.
- Tuder, R. M., Yun, J. H., Bhunia, A. and Fijalkowska, I.** (2007b). Hypoxia and chronic lung disease. *J Mol Med (Berl)* **85**, 1317-1324.
- Urashima, T., Zhao, M., Wagner, R., Fajardo, G., Farahani, S., Quertermous, T. and Bernstein, D.** (2008). Molecular and physiological characterization of RV remodeling in a murine model of pulmonary stenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H1351-H1368.
- Urbanova, D., Ressler, J., Widimsky, J., Ostadal, B., Pelouch, V. and Prochazka, J.** (1973). Pulmonary vascular changes induced by intermittent altitude hypoxia and their reversibility in rat. *Beitr Pathol* **150**, 389-399.
- van Suylen, R. J., Smits, J. F. and Daemen, M. J.** (1998). Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 1423-1428.
- van Wolferen, S. A., Marcus, J. T., Westerhof, N., Spreuwenberg, M. D., Marques, K. M., Bronzwaer, J. G., Henkens, I. R., Gan, C. T., Boonstra, A., Postmus, P. E. et al.** (2008). Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *Eur Heart J* **29**, 120-127.
- Vassalle, M., Greenspan, K., Jomain, S. and Hoffman, B. F.** (1964). Effects of Potassium on Automaticity and Conduction of Canine Hearts. *Am J Physiol* **207**, 334-340.

- Vigano, A., Vasso, M., Caretti, A., Bravata, V., Terraneo, L., Fania, C., Capitanio, D., Samaja, M. and Gelfi, C.** (2011). Protein modulation in mouse heart under acute and chronic hypoxia. *Proteomics* **11**, 4202-4217.
- Vistnes, M., Waehre, A., Nygard, S., Sjaastad, I., Andersson, K. B., Husberg, C. and Christensen, G.** (2010). Circulating cytokine levels in mice with heart failure are etiology dependent. *J Appl Physiol* **108**, 1357-1364.
- Vonk-Noordegraaf, A., Marcus, J. T., Gan, C. T., Boonstra, A. and Postmus, P. E.** (2005). Interventricular mechanical asynchrony due to right ventricular pressure overload in pulmonary hypertension plays an important role in impaired left ventricular filling. *Chest* **128**, 628S-630S.
- Vonk Noordegraaf, A. and Galie, N.** (2011). The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* **20**, 243-253.
- Wang, D., Wang, Y., Kong, T., Fan, F. and Jiang, Y.** (2011). Hypoxia-induced beta-catenin downregulation involves p53-dependent activation of Siah-1. *Cancer Sci* **102**, 1322-1328.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. and Semenza, G. L.** (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510-5514.
- Wei, H., Bedja, D., Koitabashi, N., Xing, D., Chen, J., Fox-Talbot, K., Rouf, R., Chen, S., Steenbergen, C., Harmon, J. W. et al.** (2012). Endothelial expression of hypoxia-inducible factor 1 protects the murine heart and aorta from pressure overload by suppression of TGF-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E841-E850.
- Weir, E. K., Tucker, A., Reeves, J. T., Will, D. H. and Grover, R. F.** (1974). The genetic factor influencing pulmonary hypertension in cattle at high altitude. *Cardiovasc Res* **8**, 745-749.
- Weissmann, N., Akkayagil, E., Quanz, K., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Fink, L., Hanze, J., Rose, F., Seeger, W. and Grimminger, F.** (2004). Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respir Physiol Neurobiol* **139**, 191-202.
- Weissmann, N., Grimminger, F., Olschewski, A. and Seeger, W.** (2001). Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L314-L317.
- Weissmann, N., Grimminger, F. and Seeger, W.** (2006a). Hypoxia in lung vascular biology and disease. *Cardiovasc Res* **71**, 618-619.
- Weissmann, N., Nollen, M., Gerigk, B., Ardeschir Ghofrani, H., Schermuly, R. T., Gunther, A., Quanz, K., Fink, L., Hanze, J., Rose, F. et al.** (2003). Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H931-H938.

- Weissmann, N., Sommer, N., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Seeger, W. and Grimminger, F.** (2006b). Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* **71**, 620-629.
- Weitz, C. A.** (1982). Blood pressure at rest and during exercise among Sherpas and Tibetan migrants in Nepal. *Soc Sci Med* **16**, 223-231.
- Weitzenblum, E.** (2003). Chronic cor pulmonale. *Heart* **89**, 225-230.
- Welling, K. L., Sanchez, R., Ravn, J. B., Larsen, B. and Amtorp, O.** (1993). Effect of prolonged alveolar hypoxia on pulmonary arterial pressure and segmental vascular resistance. *J Appl Physiol* **75**, 1194-1200.
- Wen, Y. Y., Yang, Z. Q., Song, M., Li, B. L., Zhu, J. J. and Wang, E. H.** (2010). SIAH1 induced apoptosis by activation of the JNK pathway and inhibited invasion by inactivation of the ERK pathway in breast cancer cells. *Cancer Sci* **101**, 73-79.
- Weyrauch, K. D. and Smollich, A.** (1998). Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. *Ferdinand Enke Verlag Stuttgart*.
- Wideman, R. F., Chapman, M. E., Hamal, K. R., Bowen, O. T., Lorenzoni, A. G., Erf, G. F. and Anthony, N. B.** (2007). An inadequate pulmonary vascular capacity and susceptibility to pulmonary arterial hypertension in broilers. *Poult Sci* **86**, 984-998.
- Willam, C., Maxwell, P. H., Nichols, L., Lygate, C., Tian, Y. M., Bernhardt, W., Wiesener, M., Ratcliffe, P. J., Eckardt, K. U. and Pugh, C. W.** (2006). HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* **41**, 68-77.
- Winter, M., Sombroek, D., Dauth, I., Moehlenbrink, J., Scheuermann, K., Crone, J. and Hofmann, T. G.** (2008). Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR. *Nat Cell Biol* **10**, 812-824.
- Wisnibaugh, T. and O'Connor, W. N.** (1988). Right ventricular hypertrophy long after reversal of severe pressure overload in cats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **254**, H1099-H1104.
- Wong, C. S., Sceneay, J., House, C. M., Halse, H. M., Liu, M. C., George, J., Hunnam, T. C., Parker, B. S., Haviv, I., Ronai, Z. et al.** (2012). Vascular normalization by loss of Siah2 results in increased chemotherapeutic efficacy. *Cancer Res* **72**, 1694-1704.
- Wood, P.** (1958). Pulmonary hypertension with special reference to the vasoconstrictive factor. *Br Heart J* **20**, 557-570.
- Woods, D. R., Stacey, M., Hill, N. and de Alwis, N.** (2011). Endocrine aspects of high altitude acclimatization and acute mountain sickness. *J R Army Med Corps* **157**, 33-37.
- Xu, Z., Sproul, A., Wang, W., Kukekov, N. and Greene, L. A.** (2006). Siah1 interacts with the scaffold protein POSH to promote JNK activation and apoptosis. *J Biol Chem* **281**, 303-312.

Yin, J., Coutris, N. and Huang, Y. (2012). Numerical study of axonal outgrowth in grooved nerve conduits. *J Neural Eng* **9**, 056001.

Zhao, M., Chow, A., Powers, J., Fajardo, G. and Bernstein, D. (2004). Microarray analysis of gene expression after transverse aortic constriction in mice. *Physiol Genomics* **19**, 93-105.

Ziel, K. A., Grishko, V., Campbell, C. C., Breit, J. F., Wilson, G. L. and Gillespie, M. N. (2005). Oxidants in signal transduction: impact on DNA integrity and gene expression. *FASEB J* **19**, 387-394.

8. Abbidungsverzeichnis

Abbildung 1.7.1: Hypothetische Rolle der Siah-Ubiquitinligasen in der HIF-abhängigen Pathogenese der pulmonalen Hypertonie und Rechtsherzhypertrophie.	51
Abbildung 2.2.1: Schematischer Aufbau des hypoxischen Systems	66
Abbildung 2.2.2: Echokardiografische Verlaufskontrolle im Hypoxiemodell	67
Abbildung 2.2.3: Echokardiografische Verlaufskontrolle im „banding“-Modell	70
Abbildung 2.2.4: Bestimmung des Muskularisierungsgrades	80
Abbildung 2.2.5: Beispiel für ein mit Anti-alpha Aktin/von Willebrand Faktor immunhistochemisch markiertes Lungengefäß	81
Abbildung 2.2.6: Bestimmung der Wandstärke	82
Abbildung 2.2.7: Beispiel für ein mit <i>Elastica</i> van Gieson gefärbtes Lungengefäß	83
Abbildung 2.2.8: Bestimmung des rechtsventrikulären Kollagenanteiles	84
Abbildung 2.2.9: Bestimmung der Anzahl der Kapillaren und Kardiomyozyten	87
Abbildung 3.1.1: Darstellung des prozentualen Gewichtsverlaufes der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	98
Abbildung 3.1.2: Darstellung des Hämatokritwertes (Hkt) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	99
Abbildung 3.1.3: Darstellung des systolischen arteriellen Druckes (SAP) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	99
Abbildung 3.1.4: Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	100
Abbildung 3.1.5: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus <i>Septum</i> (RV/(LV+S)) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	101
Abbildung 3.1.6: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht (RV/KGW) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	102

Abbildung 3.1.7: Darstellung des prozentualen Anteils nicht-, partiell- und vollmuskularisierter kleiner Lungengefäße (Außen-Ø 20 – 70 µm) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	103
Abbildung 3.1.8: Darstellung der medialen Wandstärke kleiner, mittlerer und großer Blutgefäße der pulmonalen Strombahn für die Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	105
Abbildung 3.1.9: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT, right ventricular wall thickness) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	106
Abbildung 3.1.10: Rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID, right ventricular internal diameter) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	106
Abbildung 3.1.11: Enddiastolische Querschnittsfläche des rechten <i>Atrium</i> (RA area, right atrial area) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	107
Abbildung 3.1.12: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	108
Abbildung 3.1.13: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	110
Abbildung 3.1.14: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	112
Abbildung 3.1.15: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	114
Abbildung 3.1.16: Darstellung des prozentualen Kollagenanteiles (%) des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	115
Abbildung 3.1.17: Darstellung der Genexpression a) von <i>siah2</i> im Lungenhomogenat von Siah2WT Mäusen und b) von <i>siah1a/b</i> im Lungenhomogenat der Siah2WT und KO Tiere im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	117

Abbildung 3.1.18: Darstellung der Genexpression a) von <i>siah2</i> im Homogenat des rechten Ventrikels von Siah2WT Mäusen und b) von <i>siah1a/b</i> im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2WT und KO Tiere im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	118
Abbildung 3.1.19: Darstellung der Proteinmenge der Prolyl-4-Hydroxylasen a) PHD1, b) PHD2 und c) PHD3 im Lungenhomogenat der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	120
Abbildung 3.1.20: Effektstärken von Sauerstoffgehalt und knockout für die Expression der Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 im Lungenhomogenat der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	121
Abbildung 3.1.21: Darstellung der Proteinmenge der Prolyl-4-Hydroxylasen a) PHD1 und b) PHD2 im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	122
Abbildung 3.1.22 Effektstärken von Sauerstoffgehalt und knockout für die Expression der Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1 und PHD2 im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	122
Abbildung 3.1.23: Darstellung der immunreaktiven VEGFA-Proteinmenge im Lungenhomogenat der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	123
Abbildung 3.1.24: Darstellung der immunreaktiven VEGFA-Proteinmenge im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	124
Abbildung 3.1.25: Darstellung der <i>vegfa</i> , <i>vegf-rezeptor 1</i> und <i>vegf-rezeptor 2</i> Genexpression in Lungenhomogenat der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	125
Abbildung 3.1.26: Darstellung der <i>vegfa</i> , <i>vegf-rezeptor 1</i> und <i>vegf-rezeptor 2</i> Genexpression in Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	126
Abbildung 3.2.1: Darstellung des prozentualen Gewichtsverlaufes der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	129

Abbildung 3.2.2: Darstellung des systolischen arteriellen Druckes (SAP) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	130
Abbildung 3.2.3: Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	130
Abbildung 3.2.4: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus <i>Septum</i> ($RV/(LV+S)$) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	131
Abbildung 3.2.5: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht (RV/KGW) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	132
Abbildung 3.2.6: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem <i>Atrium</i> zum Körpergewicht (RA/KGW) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	133
Abbildung 3.2.7: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT, right ventricular wall thickness) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	134
Abbildung 3.2.8: Rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID, right ventricular internal diameter) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	134
Abbildung 3.2.9: Enddiastolische Querschnittsfläche des rechten <i>Atrium</i> (RA area, right atrial area) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	135
Abbildung 3.2.10: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	136
Abbildung 3.2.11: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	138
Abbildung 3.2.12: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	139
Abbildung 3.2.13: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	141

Abbildung 3.2.14: Darstellung des prozentualen Kollagenanteiles (%) des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	143
Abbildung 3.2.15: Histologischer Schnitt durch den rechten Ventrikel. Darstellung der kollagenen Fasern mit einer Sirius Red Färbung.	143
Abbildung 3.2.16: Darstellung des Verhältnisses von Kapillaren zu Kardiomyozyten (Kap/KM) im rechten Ventrikel der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	144
Abbildung 3.2.17: Darstellung der Genexpression a) von <i>siah2</i> in Homogenat des rechten Ventrikels von Siah2WT Mäusen und b) von <i>siah1a/b</i> in Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2WT und KO Tiere im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	145
Abbildung 3.2.18: Darstellung der Proteinmenge der Prolyl-4-Hydroxylasen a) PHD1, b) PHD2 und c) PHD3 in Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	147
Abbildung 3.2.19: Effektstärken von Operationsmethode und knockout für die Expression der Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	148
Abbildung 3.2.20: Darstellung der immunreaktiven VEGFA-Proteinmenge im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	149
Abbildung 3.2.21: Darstellung der <i>vegfa</i> , <i>vegf-Rezeptor 1</i> und <i>vegf-Rezeptor 2</i> Genexpression im Homogenat des rechten Ventrikels der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	150
Abbildung 3.3.1: Darstellung des prozentualen Gewichtsverlaufes der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	152
Abbildung 3.3.2: Darstellung des Hämatokritwertes (Hkt) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	153
Abbildung 3.3.3: Darstellung des systolischen arteriellen Druckes (SAP) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	154

Abbildung 3.3.4: Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	154
Abbildung 3.3.5: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus <i>Septum</i> (RV/(LV+S)) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	155
Abbildung 3.3.6: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht (RV/KGW) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	156
Abbildung 3.3.7: Darstellung des prozentualen Anteils nicht-, partiell- oder voll-muskularisierter kleiner Lungengefäße (Außen-Ø 20 – 70 µm) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	157
Abbildung 3.3.8: Darstellung der medialen Wandstärke kleiner, mittlerer und großer Blutgefäße der pulmonalen Strombahn für die Siah1/2 Gruppe Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	159
Abbildung 3.3.9: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT, right ventricular wall thickness) Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie. Endpunktmessung nach 4 Wochen.	160
Abbildung 3.3.10: Rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID, right ventricular internal diameter) Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	160
Abbildung 3.3.11: Enddiastolische Querschnittsfläche des rechten <i>Atrium</i> (RA area, right atrial area) Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	161
Abbildung 3.3.12: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	162
Abbildung 3.3.13: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	164
Abbildung 3.3.14: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	166

Abbildung 3.3.15: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	168
Abbildung 3.3.16: Darstellung des prozentualen Kollagenanteiles (%) des rechten Ventrikels der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	169
Abbildung 3.3.17: Darstellung der Proteinmenge der Prolyl-4-Hydroxylasen a) PHD1, b) PHD2 und c) PHD3 in Lungehomogenat der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	171
Abbildung 3.3.18: Effektstärken von Sauerstoffgehalt und knockout für die Expression der Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 im Lungenhomogenat der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	172
Abbildung 3.4.1: Darstellung des prozentualen Gewichtsverlaufes der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	174
Abbildung 3.4.2: Darstellung des systolischen arteriellen Druckes (SAP) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	175
Abbildung 3.4.3: Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	175
Abbildung 3.4.4: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus <i>Septum</i> (RV/(LV+S)) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	176
Abbildung 3.4.5: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht (RV/KGW) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	177
Abbildung 3.4.6: Darstellung des Gewichtsverhältnisses von rechtem Ventrikel zu Tibialänge (RV/Tibia) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	178
Abbildung 3.4.7: Darstellung des Gewichtsverhältnis von rechtem <i>Atrium</i> (RA/KGW) zum Körpergewicht der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	179
Abbildung 3.4.8: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT, right ventricular wall thickness) Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	180

Abbildung 3.4.9: Rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID, right ventricular internal diameter) Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	180
Abbildung 3.4.10: Enddiastolische Querschnittsfläche des rechten <i>Atrium</i> (RA area, right atrial area) Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	181
Abbildung 3.4.11: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	182
Abbildung 3.4.12: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	184
Abbildung 3.4.13: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	186
Abbildung 3.4.14: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	187
Abbildung 3.4.15: Darstellung des prozentualen Kollagenanteiles (%) des rechten Ventrikels der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	189

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.1: Einteilung der pulmonalen Hypertonie	16
Tabelle 1.5.1: Zielproteine von Siah	40
Tabelle 2.1.1: Verwendete Mauslinien	52
Tabelle 2.1.2: Verwendete Primer	63
Tabelle 2.1.3: Verwendete Primärantikörper	64
Tabelle 2.1.4: Verwendete Sekundärantikörper	64
Tabelle 2.2.1: In der Arbeit verwendete Signifikanzniveaus	96
Tabelle 3.1.1: Prozentualer Muskularisierungsgrad kleiner Lungengefäße (Außen-Ø 20 - 70 µm) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	103
Tabelle 3.1.2: Mediale Wandstärke kleiner, mittlerer und großer Blutgefäße der pulmonalen Strombahn für die Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	104
Tabelle 3.1.3: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT), rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID) und enddiastolische Querschnittsfläche des rechten <i>Atrium</i> (RA area) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	107
Tabelle 3.1.4: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	108
Tabelle 3.1.5: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	108
Tabelle 3.1.6: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	111
Tabelle 3.1.7: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	113

Tabelle 3.2.1: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT), rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID) und enddiastolische Querschnittsfläche des rechten <i>Atrium</i> (RA area) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	135
Tabelle 3.2.2: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	137
Tabelle 3.2.3: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	137
Tabelle 3.2.4: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	140
Tabelle 3.2.5: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	140
Tabelle 3.3.1: Prozentualer Muskularisierungsgrad kleiner Lungengefäße (Außen-Ø 20 - 70 µm) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	157
Tabelle 3.3.2: Mediale Wandstärke kleiner, mittlerer und großer Blutgefäße der pulmonalen Strombahn für die Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	158
Tabelle 3.3.3: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT), rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID) und enddiastolische Querschnittsfläche des rechten <i>Atrium</i> (RA area) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	161
Tabelle 3.3.4: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	163
Tabelle 3.3.5: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	163
Tabelle 3.3.6: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	165

Tabelle 3.3.7: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah1/2 Gruppe im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.	167
Tabelle 3.4.1: Rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT), rechtsventrikulärer Durchmesser (RVID) und enddiastolische Querschnittsfläche des rechten <i>Atrium</i> (RA area) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	181
Tabelle 3.4.2: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	183
Tabelle 3.4.3: Rechtsventrikuläre systolische Funktion (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	183
Tabelle 3.4.4: Rechtsventrikuläre diastolische Funktion (IVRT/RR, isovolumic relaxation time) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	185
Tabelle 3.4.5: Rechtsventrikuläre globale Funktion (MPI, myocardial performance index) der Siah1/2 Gruppe im Modell des pulmonalarteriellen „banding“.	188

10. Wissenschaftliche Beiträge

10.1 Veröffentlichungen

Free Radic Biol Med 2012, 52, 1033-1042

“Hypoxia induces Kv channel current inhibition by increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species”. Mittal, M., Gu, X. Q., Pak, O., Pamerter, M. E., **Haag, D.**, Fuchs, D. B., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Brandes, R. P., Seeger, W. et al.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2013 Sep;49(3):358-67

„Mitochondrial hyperpolarization in pulmonary vascular remodeling. Mitochondrial uncoupling protein deficiency as disease model”. Pak O, Sommer N, Hoeres T, Bakr A, Waisbrod S, Sydykov A, **Haag D**, Esfandiary A, Kojonazarov B, Veit F, Fuchs B, Weisel FC, Hecker M, Schermuly RT, Grimminger F, Ghofrani HA, Seeger W, Weissmann N.

Somnologie, Suppl 1, 2013, 63, Abstract

“Mausmodell der chronisch intermittierenden Hypoxie führt zu arterieller und pulmonaler Hypertonie”. Kraut S, **Haag D**, Kojonazarov B, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N, Schulz R.

10.2 Poster

American Thoracic Society (ATS), Annual Congress 2011

“The Dual Neutral Endopeptidase/Endothelin Converting Enzyme Inhibitor SLV338 Inhibits Experimental Pulmonary Hypertension In Rats”

Dorothea M. Peters, Bholu K. Dahal, Djuro Kosanovic, **Daniela Haag**, Susan Wehner, Rio Dumitrascu, Josef Messinger, Yvan Fischer, Katrin Hoffmann, Jochen Antel, Bettina Husen, Nina Hanke, Stephanie Mayet, Michael Seimetz, Soni Pullamsetti, Svenja Tiede, Hossein A. Ghofrani, Friedrich Grimminger, Werner Seeger, Norbert Weissmann, Ralph T. Schermuly

American Thoracic Society (ATS), Annual Congress 2012

“A possible role of serotonin for the development of tobacco-smoke induced lung emphysema and pulmonary hypertension.”

Alexandra Pichl, Nirmal Parajuli, Michael Seimetz, Athanasios Fysikopoulos, **Daniela Haag**, Rudolf Reiter, Jan Grimminger, Werner Seeger, Ralph T. Schermuly, Friedrich Grimminger, Hossein A. Ghofrani, Norbert Weissmann.

European Respiratory Society (ERS), Annual Congress 2013

“Siah2 in pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy”

Daniela Haag, Dorothea M. Peters, Bakytbek Kojonazarov, Simone Kraut, Hossein A. Ghofrani, Ralph T. Schermuly, Werner Seeger, Friedrich Grimminger, Andreas Möller, M. Lienhard Schmitz, Norbert Weissmann.

21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Schlafforschung und Schlafmedizin (DGSM) e.V., 2013

“Mausmodell der chronisch intermittierenden Hypoxie führt zu arterieller und pulmonaler Hypertonie”

Kraut S, **Haag D**, Kojonazarov B, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N, Schulz R.

11. Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Gerstberger möchte ich für die Übernahme meiner Betreuung, die detaillierte Begutachtung meiner Arbeit und seine aufbauenden Worte danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Weißmann möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das spannende Projekt und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes mit allen Mitteln die man sich nur wünschen kann bedanken. Weiterhin danke ich ihm dafür, dass er mir beigebracht hat, dass der „lange, steinige Weg“ auch Vorteile birgt...

Herrn Prof. Dr. Schmitz und Herrn Dr. Andreas Möller danke ich herzlich für die Überlassung der knockout Mauslinien, den fachlichen Rat und die gute Zusammenarbeit.

Bei Dr. Dorothea Peters „meiner Postdoc“ möchte ich mich für ihr stetig offenes Ohr, ihre Hilfe bei meinem Projekt, meinem Poster und der Erstellung dieser Arbeit sowie die konstruktiven fachlichen und auch privaten Gespräche bedanken.

Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den echokardiografischen Untersuchungen meiner Mäuse, für die vielen Gedanken und Ideen zu meinem Projekt und die amüsanten Gespräche.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an drei meiner Mitstreiter, die mir während der Zeit im Labor zu sehr wichtigen und lieben Menschen geworden sind: Dr. Alexandra Pichl, Dr. Simone Kraut und Dr. Katja Helmus. Danke für eure Freundschaft und Hilfe innerhalb und außerhalb des Labors. Danke dass ihr immer da seid.

Karin Quanz danke ich für die gute Zusammenarbeit bei unseren gemeinsamen Projekten, die Rettung aus allen organisatorischen Notständen und den offenen Rat in sämtlichen beruflichen und privaten Lebenslagen.

Danksagung

Bei Ingrid Breitenborn-Müller möchte ich mich für ihre „molekularbiologische“ Hilfe, ihre stetigen aufmunternden Worte, ihre herzliche Art und die Fabel vom Frosch in der Milchkanne bedanken.

Christina Vroom möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft, ihre unermüdlich positive Sichtweise der Dinge und die Unterstützung meiner Projekte innerhalb und außerhalb des Labors danken.

Akylbek Sydykov danke ich für seinen unerschöpflichen fachlichen Rat sowie dafür, dass er auf jede meiner Fragen eine Antwort suchte und fand.

Lisa Fröhlich und Ewa Bieniek danke ich für die „histologische“ Hilfestellung und die lustigen und interessanten Gespräche während einer doch recht langwierigen Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an Jochen Wilhelm für die statistische Betreuung dieser Arbeit. Ich danke ihm für seine endlose Geduld und seine zahlreichen Erklärungen.

Sabrina Schick und Martin Stellwagen danke ich für die gute Betreuung „meiner“ Mäuse, die Unterstützung bei der Kontrolle der Hypoxieanlage sowie für ihre freundliche und hilfsbereite Art.

Weiterhin möchte ich mich bei allen die während meiner Doktorandenzeit zusammen mit mir Mitglied der AG Weißmann waren, darunter vor allem Athanasios Fysikopoulos, Silke Köbrich, Sabine Hurka, Ruth Dartsch, Dr. Stephanie Gemhardt, Azadeh Esfandiary, Dr. Oleg Pak, Mareike Gierhardt, Mariola Bednorz und Alexandra Erb, für die schöne Zeit bedanken.

Die Menschen denen ich hier danken darf kennen zu lernen und die lieben Freunde die ich gefunden habe sind das wertvollste Resultat dieser Zeit und weit bedeutender als bedrucktes Papier.

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich natürlich noch „meinen Lieben“ außerhalb des Labors danken:

Bei meinen Eltern Doris Schenk-Haag und Wolfgang Haag bedanke ich mich für die bedingungslose und stete Unterstützung bei allen meinen „Projekten“ und Entscheidungen, dafür dass sie mich immer aufgefangen haben bevor ich überhaupt zu fallen drohte und dafür dass sie mein Halt und mein Zuhause sind.

Sven Scherf danke ich für seine Geduld und sein Durchhaltevermögen sowie dafür dass er ohne große Worte einfach immer da ist.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6180-7



9 783835 196180 7