

Aus dem „Universities of Giessen and Marburg Lung Center“

am Fachbereich 11 Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Charakterisierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2) im experimentellen Modell der Druck-induzierten Rechtsherzhypertrophie**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

(Fachbereich 08 Biologie und Chemie)

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Mario Böhm, MSc

aus Recklinghausen

Gießen 2016

---

**Erstgutachter:** Prof. Dr. Tina E. Trenczek  
Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie  
Zelluläre Erkennungs- und Abwehrmechanismen  
Stephanstr. 24 (Raum 319), 35392 Giessen  
Tina.E.Trenczek@allzool.bio.uni-giessen.de

**Zweitgutachter:** Prof. Dr. Ralph T. Schermuly  
Universities of Giessen and Marburg Lung Center (UGMLC)  
Pulmonale Pharmakotherapie  
Aulweg 130, 35392 Giessen  
Ralph.Schermuly@ugmlc.de

---

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs *Molecular Biology and Medicine of the Lung* (MBML) und der Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE) am Exzellenzcluster kardiopulmonales System des Lungenzentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen (UGMLC, *University of Giessen and Marburg Lung Center*), dem Biomedizinischen Forschungszentrum Seltersberg (BFS) und dem Zentrum für Innere Medizin – Medizinische Klinik II/V in der Zeit von Februar 2013 bis April 2016 unter der Leitung von Prof. Dr. Tina E. Trenczek angefertigt. Die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie die Infrastruktur zur Durchführung dieser Arbeit erfolgten durch Prof. Dr. Ralph T. Schermuly, unter dessen Betreuung diese Studie entstand.

„Gott würfelt nicht.“  
- Albert Einstein (1879-1955) -

**Inhaltsverzeichnis**

I.	Abbildungsverzeichnis .....	7
II.	Tabellenverzeichnis .....	8
III.	Abkürzungsverzeichnis .....	9
1.	Einleitung .....	13
1.1	Pathogenese und Pathophysiologie der pulmonal-arteriellen Hypertonie....	13
1.2	Rechtsventrikuläre Dysfunktion und strukturelle Umgestaltungen bei pulmonal-arterieller Hypertonie .....	14
1.3	Das experimentelle Modell der Pulmonalarterienstenose .....	16
1.4	Stickstoffmonoxid (NO) als Signalmolekül .....	19
1.5	Die Familie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS).....	19
1.6	NO-Synthese und -Signaltransduktionsmechanismen.....	20
1.7	Die Rolle von NO im kardio-vaskulären System .....	22
1.8	NO, Superoxid, Peroxynitrit und oxidativer Stress .....	27
2.	Ziel dieser Arbeit .....	31
3.	Material und Methoden .....	32
3.1	Versuchstiere .....	32
3.2	Pulmonalarterienstenose .....	32
3.3	Studiendesign .....	33
3.4	Echokardiographie.....	34
3.5	Hämodynamische Messungen.....	35
3.6	Histologische Methoden.....	37
3.6.1	Pikrosiriusrot Färbung.....	37
3.6.2	WGA-FITC Färbung.....	37
3.6.3	Immunfluoreszenz.....	38
3.7	Molekularbiologische Methoden.....	39
3.7.1	RNA-Isolation und cDNA-Synthese .....	39
3.7.2	Quantitative Echtzeit-PCR .....	39
3.8	Proteinbiochemische Methoden.....	40
3.8.1	Proteinisolation .....	40
3.8.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	41
3.8.3	NOS2-Enzymaktivitätsmessung.....	42
3.8.4	NO-Konzentrationsbestimmung .....	42
3.9	ESR-Spektroskopie.....	43

Inhaltsverzeichnis

---

3.10 Analyse primärer Zellen in Kultur .....	43
3.10.1 Isolation rechtsventrikulärer Fibroblasten .....	43
3.10.2 Kollagen-Bestimmung im Zellkulturmedium .....	44
3.10.3 NO-Konzentrationsbestimmung im Zellkulturmedium .....	44
3.11 Statistische Auswertung.....	45
4. Ergebnisse .....	46
4.1 Expression, Lokalisation und Proteinaktivität von NOS2 im rechten Ventrikel.....	46
4.2 Effekt der NOS Inhibition auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im rechten Ventrikel .....	50
4.3 Expressionsanalyse der konstitutiv aktiven Isoenzyme NOS1 und NOS3 ...	51
4.4 Rolle der NOS2 in der Aufrechterhaltung der NO-Bioverfügbarkeit und Formation reaktiver Sauerstoffspezies.....	52
4.5 Einfluss von NOS2 auf die kardiale Funktion.....	57
4.6 Rolle der NOS2 in der myokardialen Umstrukturierung .....	61
4.7 Rolle von NOS2 in der Kollagen-Sekretion kardialer Fibroblasten.....	64
5. Diskussion.....	69
6. Ausblick.....	84
7. Zusammenfassung.....	85
8. Abstract.....	87
9. Literaturverzeichnis .....	88
10. Publikationen und Konferenzbeiträge .....	113
11. Preise und Auszeichnungen .....	115
12. Erklärung.....	116
13. Danksagung.....	117

## I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pathologische Veränderungen des kardio-pulmonalen Systems infolge von pulmonal-arterieller Hypertonie .....	15
Abb. 2: Therapeutische Ziele der Behandlung von PH-assoziiierter rechtsventrikulärer Dysfunktion und Insuffizienz .....	18
Abb. 3: NOS2-vermittelte Signalweiterleitung ist konzentrationsabhängig .....	22
Abb. 4: Übersicht über den Einfluss der NOS in gesunden und hypertrophen/insuffizienten Herzen .....	26
Abb. 5: Studiendesign .....	34
Abb. 6: Induktion der NOS2 Expression im drucküberladenen rechten Ventrikel .....	46
Abb. 7: Lokalisation von NOS2 im Zytosol von Kardiomyozyten und Fibroblasten im rechten Ventrikel .....	47
Abb. 8: Expression der NOS-Isoenzyme in isolierten rechtsventrikulären Fibroblasten .....	48
Abb. 9: NOS2-Enzymaktivität in rechtsventrikulärem Gewebehomogenisat .....	49
Abb. 10: Einfluss der unspezifischen NOS-Inhibition auf die ROS-Produktion im rechten Ventrikel .....	50
Abb. 11: Expression der konstitutiv aktiven NOS-Isoenzyme im rechten Ventrikel von NOS2 <sup>+/+</sup> und NOS2 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	51
Abb. 12: Nitrit und Nitrat Konzentrationen im rechten Ventrikel .....	52
Abb. 13: Nachweis der sGCβ1-Proteinexpression im rechten Ventrikel .....	53
Abb. 14: Detektion der Superoxid-Produktion im rechten Ventrikel .....	54
Abb. 15: Detektion der ROS-Formation im rechten Ventrikel .....	55
Abb. 16: Detektion der nitrotyrosinolierten Proteine im rechten Ventrikel .....	56
Abb. 17: Repräsentative echokardiographische Aufnahmen und Kalkulationen .....	60
Abb. 18: Repräsentative intra-kardiale Druck-Volumen-Messungen .....	61
Abb. 19: Quantifizierung der Kardiomyozyten-Durchmesser im rechten Ventrikel ...	62
Abb. 20: Expressionsnachweise ausgewählter Herzinsuffizienz-Markergene .....	62
Abb. 21: Quantifizierung des Kollagenanteils im rechten Ventrikel .....	63
Abb. 22: Expressionsnachweise ausgewählter Fibrose-Markergene .....	64
Abb. 23: NOS2-Expression in <i>ex vivo</i> kultivierten rechtsventrikulären Fibroblasten .	65
Abb. 24: Nitrit-Konzentrationen im Medium rechtsventrikulärer Fibroblasten .....	66
Abb. 25: Quantifizierung der sezernierten Kollagenmenge isolierter rechtsventrikulärer Fibroblasten .....	67

**II. Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Eingesetzte Primer für die Genexpressionsanalyse mittels Echtzeit-PCR ...	40
Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper .....	42
Tab. 3: Echokardiografische und hämodynamische Auswertung .....	58



**III. Abkürzungsverzeichnis**

<b>%</b>	<i>percentage</i>	Prozent
<b>°C</b>	<i>degree Celsius</i>	Grad Celsius
<b>°K</b>	<i>degree Kelvin</i>	Grad Kelvin
<b>µl</b>	<i>micro liter</i>	Mikroliter
<b>µM</b>	<i>micro molar</i>	Mikromolar
<b>ANP</b>	<i>A-type natriuretic peptide</i>	A-Typ natriuretisches Peptid
<b>ASK1</b>	<i>Apoptosis-signal regulating kinase 1</i>	
<b>AU</b>	<i>arbitrary unit</i>	willkürliche Einheit
<b>BH<sub>2</sub></b>	<i>dihydrobiopterin</i>	Dihydrobiopterin
<b>BH<sub>4</sub></b>	<i>tetrahydrobiopterin</i>	Tetrahydrobiopterin
<b>bMHC</b>	<i>β-myosin heavy chain</i>	β-Myosin schwere Kette
<b>BNP</b>	<i>B-type natriuretic peptide</i>	B-Typ natriuretisches Peptid
<b>bpm</b>	<i>beats per minute</i>	Herzschläge pro Minute
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumin</i>	Rinderserumalbumin
<b>BW</b>	<i>bodyweight</i>	Körpergewicht
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<i>Calcium-Ion</i>	Kalzium-Ion
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i>	komplementäre DNS
<b>cGMP</b>	<i>cyclic guanosinmonophosphate</i>	zyklisches Guanosin- Monophosphat
<b>CI</b>	<i>cardiac index</i>	kardialer Index
<b>CM</b>	<i>cardiomyocyte</i>	Kardiomyozyt
<b>CMH</b>	<i>Methoxycarbonyl-2,2,5,5- tetramethylpyrrolidin</i>	Methoxycarbonyl-2,2,5,5- tetramethylpyrrolidin
<b>Col1A1</b>	<i>Collagen Type 1A1</i>	Kollagen Typ 1A1
<b>Col3A1</b>	<i>Collagen Type 3A1</i>	Kollagen Typ 3A1
<b>COPD</b>	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
<b>DCA</b>	<i>Dichloracetate</i>	Dichloressigsäure
<b>DDR2</b>	<i>discoidin domain receptor 2</i>	Diskoidindomänenrezeptor 2
<b>Ea</b>	<i>arterial elastance</i>	Arterielle Elastizität
<b>EDTA</b>	<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i>	Ethylen-Diamino-Tetraacetat

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Ees</b>	<i>end systolic elastance</i>	End-systolische Elastizität
<b>ESR</b>	<i>electron spin resonance</i>	Elektronenspinresonanz
<b>Spektroskopie</b>	<i>spectroscopy</i>	Spektroskopie
<b>FAD</b>	<i>flavine adenine dinucleotide</i>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i>	Fötale Kälberserum
<b>FITC</b>	<i>fluorescein isothiocyanate</i>	Fluorescein-Isothiocyanat
<b>FMN</b>	<i>flavine mononucleotide</i>	Flavinmononukleotid
<b>g</b>	<i>Gram</i>	Gramm
<b>HIF</b>	<i>hypoxia-inducible factor</i>	Hypoxie-induzierbarer Faktor
<b>H-NOX</b>	<i>hem-NO/oxygen</i>	Häm-NO/Sauerstoff
<b>HRE</b>	<i>hypoxia response element</i>	HIF-bindendes Element
<b>HRP</b>	<i>horse radish peroxidase</i>	Meerrettich-Peroxidase
<b>IgG</b>	<i>Immunoglobulin</i>	Immungloblin
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<i>interleukin 1<math>\beta</math></i>	Interleukin 1 $\beta$
<b>IVRT/RR</b>	<i>isovolumic relaxation time to ECG-derived RR interval</i>	Isovolumische Relaxationszeit in Relation zum RR-Intervall des Elektrokardiograms
<b>kDa</b>	<i>kilo Dalton</i>	Kilodalton
<b>kHz</b>	<i>kilo hertz</i>	Kilohertz
<b>L-NIL</b>	<i>N6-(1-iminoethyl)-L-lysine</i>	N6-(1-iminoethyl)-L-lysin
<b>L-NNA</b>	<i>L-NG-Nitroarginine</i>	L-NG-Nitroarginin
<b>LV</b>	<i>left ventricle</i>	Linker Ventrikel
<b>LV+S</b>	<i>left ventricle plus septum</i>	Linker Ventrikel mit Septum
<b>mA</b>	<i>mill ampere</i>	Milliampere
<b>MAP</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
<b>mmHg</b>	<i>millimeter mercury</i>	Millimeter Quecksilbersäule
<b>MMP</b>	<i>matrixmetalloproteinase</i>	Matrixmetalloproteinase
<b>MPI</b>	<i>myocardial performance index</i>	Myokardialer Funktionsindex
<b>mV</b>	<i>milli volt</i>	Millivolt
<b>mW</b>	<i>mill watt</i>	Miliwatt
<b>n</b>	<i>number</i>	Anzahl
<b>N<sub>2</sub></b>	<i>nitrogen</i>	Stickstoff

## Abkürzungsverzeichnis

<b>NADPH</b>	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
<b>NF-κβ</b>	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of B-cells</i>	
<b>NO</b>	<i>nitric oxide</i>	Stickstoffmonoxid
<b>NOS</b>	<i>NO synthase</i>	NO Synthase
<b>NOS2<sup>-/-</sup></b>	<i>NOS2-deficient animals</i>	NOS2-defiziente Tiere
<b>NOS2<sup>+/+</sup></b>	<i>wildtype</i>	Wildtyp
<b>NT</b>	<i>nitrotyrosine</i>	Nitrotyrosin
<b>O<sub>2</sub></b>	<i>oxygen</i>	Sauerstoff
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<i>superoxide</i>	Superoxid
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	<i>peroxynitrite</i>	Peroxynitrit
<b>PAB</b>	<i>pulmonary artery banding</i>	Pulmonalarterienstenose
<b>PAH</b>	<i>pulmonary arterial hypertension</i>	Pulmonal-arterielle Hypertonie
<b>PBGD</b>	<i>Porphobilinogen Deaminase</i>	Porphobilinogen Deaminase
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>	Phosphat-gepufferte Saline
<b>PDE5</b>	<i>phosphodiesterase-5</i>	Phosphodiesterase-5
<b>PEG</b>	<i>polyethylenglycol</i>	Polyethylenglykol
<b>PFA</b>	<i>paraformaldehyde</i>	Paraformaldehyd
<b>PH</b>	<i>pulmonary hypertension</i>	Pulmonale Hypertonie
<b>pmol</b>	<i>pico mol</i>	Pikomol
<b>qPCR</b>	<i>quantitative PCR</i>	quantitative Polymerasekettenreaktion
<b>redox</b>	<i>reduction-oxidation reaction</i>	Reduktions-Oxidations Reaktion
<b>rel.</b>	<i>relative</i>	relativ
<b>RIPA</b>	<i>radioimmunoprecipitation</i>	Radioimmunpräzipitation
<b>RNS</b>	<i>reactive nitrogen species</i>	Reaktive Stickstoffspezies
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RV</b>	<i>right ventricle</i>	Rechter Ventrikel
<b>RVDP</b>	<i>RV diastolic pressure</i>	Rechtsventrikulärer diastolischer Druck
<b>RVIDd</b>	<i>right ventricular internal diameter in diastole</i>	Rechtsventrikulärer innerer Durchmesser in der Diastole
<b>RVSP</b>	<i>RV systolic pressure</i>	Rechtsventrikulärer systolischer Druck
<b>RVWTd</b>	<i>RV wall thickness in diastole</i>	Rechtsventrikuläre Wanddicke in der Diastole

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>SBP<sub>sys</sub></b>	<i>systemic blood pressure in systole</i>	Systemischer systolischer Blutdruck
<b>sGC</b>	<i>soluble guanylatcyclase</i>	lösliche Guanylatzyklase
<b>SIN-1</b>	<i>linsidomine</i>	Linsidomin
<b>SNAP</b>	<i>S-nitroso-n-acetyl-D,L-penicillamine</i>	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin
<b>SNP</b>	<i>sodium nitroprusside</i>	Natrium-Nitroprussid
<b>SOD</b>	<i>superoxide dismutase</i>	Superoxid-Dismutase
<b>TAC</b>	<i>trans aortic constriction</i>	Trans-Aorten-Konstriktion
<b>TAPSE</b>	<i>tricuspid annular plane systolic excursion</i>	Auslenkung des Trikuspidalklappenannulus in der Systole
<b>TBS</b>	<i>tris buffered saline</i>	Tris-gepufferte Saline
<b>TBS-T</b>	<i>TBS plus TritonX100</i>	TBS mit TritonX100
<b>VEGFR</b>	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>	
<b>vgl.</b>	<i>compare</i>	vergleiche

## 1. Einleitung

### 1.1 Pathogenese und Pathophysiologie der pulmonal-arteriellen Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine progressive Erkrankung der Lungengefäße, welche als eigenständige Indikation, aber auch als Folge unterschiedlichster Beschwerden wie beispielsweise Herzinsuffizienz, Lungenembolie oder chronische Lungenerkrankungen, auftreten kann und weltweit eine geschätzte Prävalenz von 100 Millionen Menschen aufweist (1). Aufgrund der hohen Heterogenität und Komplexität der Erkrankung mit verschiedenster Ätiologie und Pathogenese wurde 2013 in Nizza eine diagnostisch relevante klinische Klassifikation der PH definiert (2). Liegt demnach der pulmonal-arterielle Mitteldruck eines Patienten über 25 mmHg bei einem normalen pulmonal-kapillären Verschlussdruck von weniger als 15 mmHg unter Ruhebedingungen, so wird eine pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) diagnostiziert. Ausgehend von dieser Definition liegt die Prävalenz der PAH beispielsweise in Frankreich, bei zirka 15/1 Millionen Einwohnern, während die Inzidenz 2,4 Millionen Einwohner pro Jahr beträgt (3, 4). Trotz erheblicher Fortschritte in der Diagnostik und Behandlung ist diese Erkrankung weiterhin mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität behaftet und endet tödlich. Pathophysiologisch beschreibt die PAH eine Umstrukturierung der Lungenarterien, also der Gefäße, welche das Blut vom rechten Herzventrikel in die Lunge leiten (Abb. 1). Diese Veränderungen verringern den Gefäßdurchmesser und erhöhen so den Widerstand in der pulmonalen Blutbahn. Infolgedessen erhöht sich der pulmonale Blutdruck, da initial das Herz hypertrophiert und so an die Veränderung adaptiert (siehe Abb. 1). Unbehandelt führt eine chronische PAH zu den Symptomen des *Cor pulmonale* (Lungenherz), d.h. zu einem den pathologischen Veränderungen in der Lungenstrombahn angepassten rechten Ventrikel und in vielen Patienten zur Ausbildung einer Rechtsherzinsuffizienz, welche die Haupttodesursache (zirka 15 % pro Jahr) bei PAH darstellt (1, 5, 6).

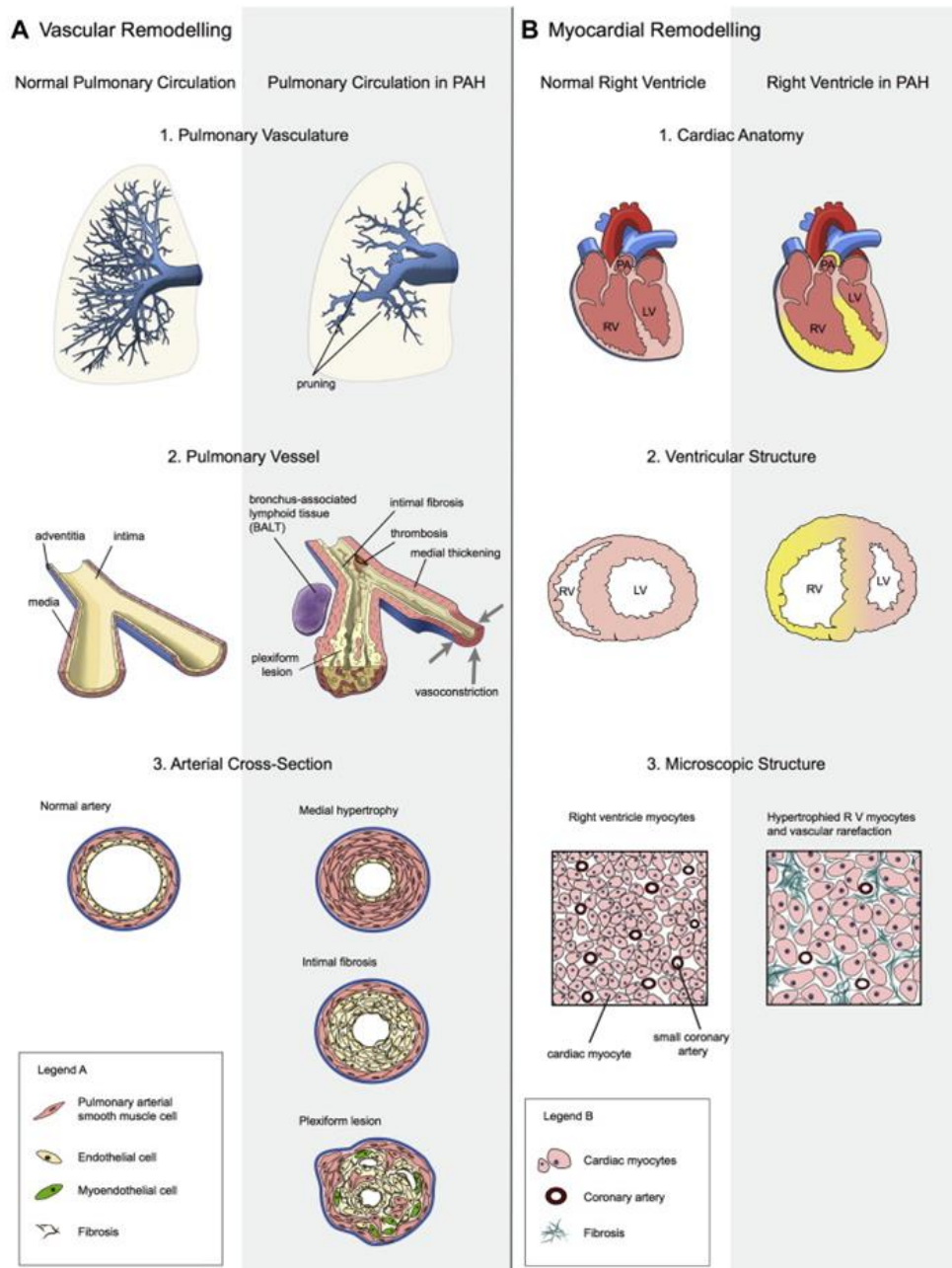
Zur gezielten Therapie der PAH sind derzeit verschiedene Medikamente aus vier Substanzklassen zugelassen. Dazu zählen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wie Bosentan, Ambrisentan und Macitentan, Phosphodiesterase-5 (PDE5)-Hemmer wie Sildenafil und Tadalafil, Prostazyklin-Analoga wie Epoprostenol, Iloprost und Treprostinil sowie Riociguat, ein Stimulator der löslichen Guanylatzyklase (sGC) (3, 5, 7, 8). Obgleich die Etablierung dieser Therapien zu einer merklich erhöhten Lebensqualität der betroffenen Patienten geführt hat, sind die therapeutischen Möglichkeiten weiterhin begrenzt, da zum einen der Wirkmechanismus aller

Konzepte auf eine Vasodilatation der Lungengefäße basiert und zum anderen direkte kardiale Auswirkungen der PAH-Therapeutika nicht ausreichend untersucht sind.

## **1.2 Rechtsventrikuläre Dysfunktion und strukturelle Umgestaltungen bei pulmonal-arterieller Hypertonie**

Die häufigste Todesursache in Folge von pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH) ist Rechtsherzversagen und somit ist der bestimmende Faktor für das Patientenüberleben die Reaktion des rechten Ventrikels auf die funktionalen und strukturellen Veränderungen in der pulmonalen Zirkulation (5). Initial adaptiert der Herzmuskel kompensatorisch mit strukturellen Umbauprozessen, welche eine funktionelle Anpassung und die Aufrechterhaltung der essentiellen Funktionen in erforderlichem Maße gewährleisten. Diese Veränderung wird hauptsächlich durch eine Zunahme der kardialen Muskelmasse, hypertrophes Wachstum der Kardiomyozyten sowie durch vermehrte Myokardfibrose, eine Anreicherung von extrazellulären Matrixproteinen im Ventrikel, charakterisiert (siehe Abb. 1). Zusätzlich dilatiert der rechte Ventrikel um eine höhere Auswurfleistung zu erzielen, wobei simultan metabolische Anpassungsprozesse auf zellulärer Ebene stattfinden um den gesteigerten Gesamtenergiebedarf zu decken. Des Weiteren spielen inflammatorische Mediatoren und ischämische Reaktionen, welche insbesondere als Folge einer Ausdünnung des Kapillarnetzwerks im Herzmuskel auftreten und zu einer verringerten Blutversorgung des Muskelgewebes führen, eine Rolle (vgl. Abb. 2). Die Wichtigkeit der einzelnen involvierten pathologischen Vorgänge ist derzeit unklar. Jedoch haben eine chronische Drucküberladung des rechten Ventrikels und die dadurch aufrechterhaltene erhöhte Schubspannung auf das Myokard zur Folge, dass die kompensatorische Adaption ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr ausreicht, um die krankhaft veränderten Bedingungen auszugleichen (siehe Abb. 2). In Folge dieser Dekompensation verringert sich die Auswurfleistung des Herzens, insbesondere durch negativ inotrope und lusitrope Effekte, welche das Herzminutenvolumen beeinflussen und letztendlich zum Rechtsherzversagen führen (9–14).

Derzeitige therapeutische Interventionen zur Verbesserung der rechtsventrikulären Arbeitsleistung sind in erster Linie indirekt über die Gabe von Anti-Koagulantien oder Diuretika möglich. Diese Pharmakotherapien reduzieren primär die Nachlast, wobei direkte Effekte auf das Myokard des rechten Ventrikels derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt sind (5, 15).



### Abb. 1: Pathologische Veränderungen des kardio-pulmonalen Systems infolge von pulmonal-arterieller Hypertonie

*Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) beschreibt eine progressive Erkrankung des kardio-pulmonalen Systems, welche insbesondere durch pathologische Verengungen der Lungenarterien charakterisiert wird (A). Dabei wird durch unkontrollierte Umbauprozesse auf allen Gefäßgewebeebenen, mediale Hypertrophie, intimale Fibrose und plexiforme Läsionen, der Gefäßdurchmesser verengt und der Widerstand in der Lungenstrombahn erhöht. Infolge des erhöhten Gefäßwiderstandes adaptiert der rechte Ventrikel durch myokardiale Umbauprozesse, sodass zum einen der rechtsventrikuläre interne Durchmesser und zum anderen die Muskelmasse vergrößert werden (B). Modifiziert nach (16).*

Insbesondere bei Vasodilator-Therapien, welche den Gefäßwiderstand in der Lungenstrombahn mindern und dadurch die Nachlast senken, ist es herausfordernd direkte Auswirkungen auf das Myokard nachzuweisen. Experimentell wird dazu ein Tiermodell mit fixierter Nachlast eingesetzt, in welchem eine isolierte chronische Drucküberladung mechanischen Stress auf den rechten Ventrikel ausübt. Direkte Auswirkungen potentieller therapeutischer Interventionen auf das Myokard können in diesem Modell der Pulmonalarterienstenose (PAB, *pulmonary artery banding*) ohne interferierende Nachlastveränderungen gezielt untersucht werden (17, 18).

### **1.3 Das experimentelle Modell der Pulmonalarterienstenose**

Es ist relativ eindeutig, dass kein verfügbares Tiermodell die komplexe humane Situation der Rechtsherzinsuffizienz ganzheitlich reflektiert. Allerdings können Tiermodelle trotzdem als wertvolle wissenschaftliche Werkzeuge betrachtet werden, um neue therapeutische Konzepte und pathophysiologische Mechanismen einer Erkrankung zu studieren (19–21).

Etablierte Kleintiermodelle zur Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen und Testung prä-klinischer therapeutischer Konzepte in der Ausbildung und Entwicklung von PH sind in der Forschungsgemeinschaft etabliert (22–24). Durch die Kombination unterschiedlicher Tiermodelle werden einzelne Merkmale der humanen Situation bestmöglich imitiert (25–27). Zu den bedeutendsten Kleintiermodellen in der PH-Forschung zählen die chronisch alveolare Hypoxie, die Injektion des Pflanzengifts Monocrotalin und eine Kombination aus einmaliger Injektion eines Inhibitors des VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) gefolgt von chronischer Hypoxie. Die Induktion der PH erfolgt in den entsprechenden Tieren hauptsächlich über chronische Vasokonstriktion und die Stimulation pathologischer Umbauprozesse in den Lungengefäßen, wie die Formation einer medialen Hypertrophie, Bildung einer Neointima oder plexiformer Läsionen, die den Strömungswiderstand des Blutes vergrößern, die Nachlast des rechten Ventrikels erhöhen und das klinische Bild der PH abbilden (1, 28). Dennoch limitieren zwei entscheidende Faktoren diese Modelle. Zum einen kann ein direkter Einfluss auf das Myokard nicht von einem Nachlast-senkenden Effekt unterschieden werden und zum anderen interferieren die Auslöser der experimentellen PH möglicherweise direkt mit dem Krankheitsverlauf oder dem Therapiekonzept (29, 30). Dementsprechend ist es erstrebenswert, die PH-assoziierte rechtsventrikuläre Hypertrophie und Dysfunktion



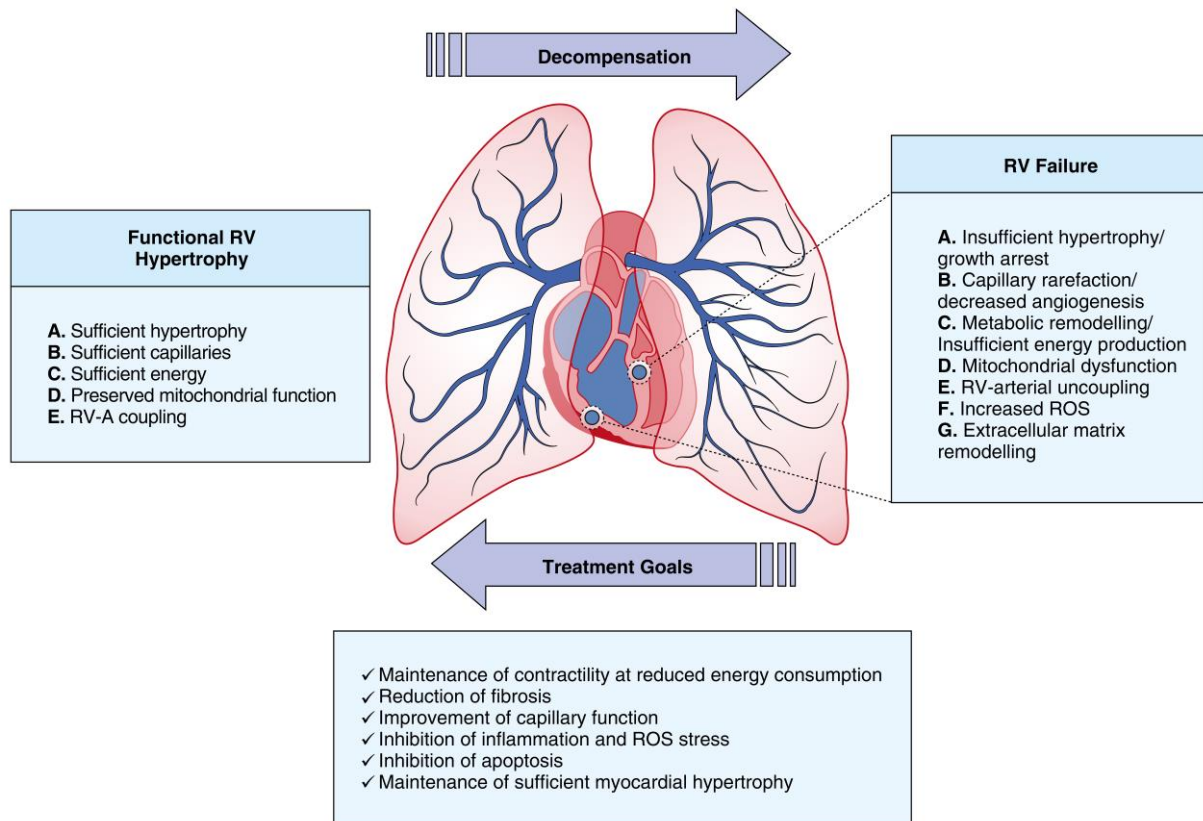
## Einleitung

---

in einem Modell mit isoliertem, selektiv erhöhten pulmonal-arteriellen Widerstand Nachlast-unabhängig zu studieren.

Um Fragestellungen zu den zugrundeliegenden Mechanismen der rechtsventrikulären Insuffizienz zu beantworten und um prä-klinisch die Wirksamkeit neuer Substanzen auf das Myokard zu testen, ist in der PH Forschungsgemeinschaft das Modell der Pulmonalarterienstenose (PAB, *pulmonary artery banding*) etabliert (5, 31–33). Dabei handelt es sich um ein Ratten- bzw. Mausmodell bei welchem operativ eine Verengung der Pulmonalarterie mit definiertem Durchmesser herbeigeführt wird (17). Aufgrund der daraus resultierenden chronisch erhöhten Druckbelastung des rechten Ventrikels folgt der initial kompensatorischen myokardialen Hypertrophie eine progressive kontraktile Dysfunktion (18). Maßgeblich bestimmend für die Progression der Erkrankung ist der Grad der Pulmonalarterien-Verengung. Je geringer der Gefäßdurchmesser, desto höher ist die simulierte Nachlast, welche über die Zeit mit der Mortalität der Tiere korreliert (34). Gleichzeitig beeinflussen die Position der Konstriktion, mögliche Kalzium Ablagerungen und/oder Thromben im Bereich der Stenose sowie Vernarbungen im Bereich der pulmonal-arteriellen Gefäßwand den Schweregrad der Drucküberladung (35). Im weiteren Verlauf der Erkrankung treten erste Anzeichen eines dekompensierten Rechtsherzversagens mit erhöhten diastolischen Drücken, diastolischer Dysfunktion, verringertem Herzzeitvolumen und Trikuspidalklappen-Insuffizienz auf (33, 36, 37). Das Tiermodell simuliert die myokardialen rechtsventrikulären Umbauprozesse des hypertrophen Myozytenwachstums, der Myokardfibrose sowie der Verringerung des Kapillarnetzwerks und der damit verbundenen metabolischen Veränderungen (34) (siehe Abb. 2).

Aufgrund der fixierten Nachlast mittels operativer Pulmonalarterienstenose ist es in diesem Tiermodell möglich, direkt die Effekte auf das Myokard zu untersuchen, da keine interferierenden Nachlastveränderungen auftreten können. Allerdings ist das Fortschreiten der induzierten Erkrankung stark vom Durchmesser der Stenose abhängig. Hauptsächlich wird der Grad der Verengung vom gewählten Radius, der Position der Konstriktion an der Pulmonalarterie und dem Wachstum des Tieres während der Versuchsdauer bestimmt. Eine zu geringe Konstriktion der Pulmonalarterie führt zur Ausbildung einer kompensatorischen rechtsventrikulären Hypertrophie und nicht zur Rechtsherzinsuffizienz (29, 34).



## Abb. 2: Therapeutische Ziele der Behandlung von PH-assoziiierter rechtsventrikulärer Dysfunktion und Insuffizienz

Als Folge der pathophysiologischen Veränderung der Lungenstrombahn bei PH adaptiert der rechte Ventrikel kompensatorisch, indem die rechtsventrikuläre Muskelmasse, die Kapillarversorgung sowie der Energiebedarf erhöht werden. Gleichzeitig werden die mitochondriale Funktion und die ventrikulär-arterielle Koppelung aufrechterhalten. Infolge einer einsetzenden Dekompensation kommt es zum Wachstumsstopp der Kardiomyozyten mit einer zusätzlichen Ausdünnung des Kapillarnetzwerks (reduzierte Angiogenese), was zu einer mangelhaften Blutversorgung des Muskelgewebes führt. Gleichzeitig reagiert die Zelle mit einem metabolischen Umschalten von Fettsäureoxidation auf glykolytische Energiegewinnung. Die mitochondriale Funktion kann nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zur Entkopplung der ventrikulär-arteriellen Einheit. Dies wird begleitet durch erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie extrazellulärer Matrixmoleküle. Letztendlich muss eine pharmakologische Intervention den genannten Eigenschaften der kardialen Dysfunktion entgegenwirken. Adaptiert aus (5).

#### **1.4 Stickstoffmonoxid (NO) als Signalmolekül**

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein farbloses Gas, das erstmals im Jahre 1980 beschrieben (38) und sieben Jahre später als Signalmediator identifiziert wurde (39, 40). Es ist ein bioaktives Molekül, welches als Intermediat zwischen molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) und Stickstoff ( $N_2$ ) als Radikal in Wasser gelöst eine Halbwertszeit von 0,1-10 Sekunden hat (41). NO wird von unterschiedlichen Zelltypen produziert, kann aufgrund seiner geringen Größe biologische Membranen passieren und dadurch sowohl autokrin als auch parakrin fungieren (42). Auf molekularer Ebene kann dieser Gasotransmitter Redox-Reaktionen mit anderen Molekülen und/oder additive Nitrierungen eingehen. Beispielsweise reagiert NO unter oxidativen Bedingungen mit dem Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ) zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), einer reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche unspezifisch die Aminosäure Tyrosin nitriert und dadurch Proteinfunktionen regulieren kann (43).

Der einzig derzeit bekannte NO-Rezeptor mit einer gezielten Signalweiterleitung im menschlichen Körper ist das Enzym Guanylatzyklase (44, 45). Die Bindung von NO an die Häm-Gruppe der löslichen Guanylatzyklase (sGC) aktiviert dieses Enzym 300-fach (46) und initiiert die vermehrte Produktion des Botenstoffs zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) (47, 48). Der limitierende Faktor dieser NO-sGC-cGMP Signalkaskade ist die Bioverfügbarkeit von NO. Für die Behandlung der PAH wird dieses Konzept bereits therapeutisch durch pharmakologisch aktive Substanzen, die NO-unabhängig die sGC modulieren wie z.B. Riociguat, genutzt (7, 49, 50). Des Weiteren spielt dieser Signalweg eine zentrale Rolle in der Regulation biologischer Prozesse im Gefäß- (Vasodilator, Thrombozytenaggregation) und Nervensystem (Neurotransmitter) sowie in der unspezifischen Immunabwehr (Zytotoxizität).

#### **1.5 Die Familie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)**

Auf zellulärer Ebene wird die endogene NO-Synthese in Säugetierzellen von einer Proteinfamilie mit derzeit drei beschriebenen Isoformen, den NO-Synthasen (NOS), katalysiert (51–53). Es werden NOS1 (100 kDa), NOS2 (130 kDa) und NOS3 (150 kDa) unterschieden, wobei die Proteine auch durch das Gewebe, aus welchem sie erstmals isoliert wurden, bezeichnet werden können. So trägt NOS1 auch den Namen neuronale NOS (nNOS), NOS2 wird auch induzierbare NOS (iNOS) und NOS3 endotheliale NOS (eNOS) genannt (54, 55). Inzwischen wurde die Expression der NOS-Proteine in verschiedenen Zelltypen und Geweben nachgewiesen (56). Die

NOS-Gene zeigen eine hohe Sequenzhomologie (zirka 50%) mit jeweils einer Kopie im haploiden humanen Genom. Die bidomäre Proteinstruktur, bestehend aus der N-terminalen Oxygenase- und C-terminalen Reduktase-Domäne, zeichnet sich durch Bindestellen für unterschiedliche Ko-Faktoren, wie NADPH, FAD, FMN, Häm und BH<sub>4</sub>, aus. Zusätzlich findet sich in allen Isoformen eine Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Bindestelle in der Reduktase-Domäne, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der Proteinaktivität spielt. Während NOS1 und NOS3 konstitutiv exprimiert und über Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Bindung in ihrer Aktivität moduliert werden, erfolgt die Regulation von NOS2 auf transkriptioneller Ebene, da die Calmodulin-Affinität dieser Isoform im Vergleich zu den anderen beiden deutlich höher ist und dieses, wenn verfügbar, bindet und dadurch Ca<sup>2+</sup>-unabhängig aktiv ist. Dadurch hat die Induktion der NOS2-Expression im Vergleich zu den anderen beiden konstitutiv exprimierten Isoformen die Bildung exzessiver Mengen an NO, bis zu µM-Konzentrationen, zur Folge. In der Promotorregion des NOS2-Gens sind sowohl NF-κβ-Bindestellen als auch Hypoxieempfindliche Bereiche (HRE) lokalisiert, sodass die NOS2 Induktion unter anderem durch inflammatorische und ischämische Prozesse ausgelöst werden kann (53–59).

### **1.6 NO-Synthese und -Signaltransduktionsmechanismen**

Das Enzym NOS katalysiert die Biosynthese von NO in einer zweistufigen Reaktion als Nebenprodukt der Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin. Dazu formiert sich bei Bindung von L-Arginin an die Oxygenase-Domäne der NOS ein katalytisch aktives Dimer, welches durch die Ko-Faktoren BH<sub>4</sub> und Häm stabilisiert wird und für die Umsetzung der Reaktion NADPH und Sauerstoff benötigt (60, 61). Die initiale Hydroxylierung von L-Arginin führt zur Bildung von NG-hydroxy-L-Arginin, gefolgt von der Oxidation des Intermediates mittels eines Elektrons von NADPH um L-Citrullin und NO zu bilden (62–64). Gleichzeitig wird in der Literatur die Katalyse zusätzlicher Produkte diskutiert. Insbesondere die Entstehung des Superoxid-Anions (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) unter oxidativen Bedingungen und Substrat- sowie Ko-Faktor-Mangel ist chemisch möglich und therapeutisch interessant (65, 66). Dieser Zustand, in welchem Superoxid anstelle von NO gebildet wird, wird auch als Entkoppeln der NOS bezeichnet (67, 68).

Die Signaltransduktion durch NO erfolgt hauptsächlich über den einzig bekannten NO-Rezeptor, die sGC (siehe auch Abb. 3). Strukturell bindet NO mit hoher Affinität an die reduzierte Häm-Gruppe der sGC, wodurch vermehrt cGMP gebildet wird. cGMP wiederum aktiviert cGMP-abhängige Kinasen und moduliert dadurch unter

## Einleitung

---

anderem intrazelluläre Kalzium-Spiegel. Der zelluläre cGMP-Abbau erfolgt durch PDEs, deren Inhibition therapeutisch genutzt wird, um das hohe cGMP-Level aufrechtzuerhalten. Hauptsächlich wird diese NO-sGC-cGMP Signalverstärkungskaskade durch die Bioverfügbarkeit von NO reguliert (45–48).

Des Weiteren bindet NO unter oxidativen Bedingungen Moleküle aus der unmittelbaren Umgebung (vgl. Abb. 3) und bildet auf diese Weise reaktive Sauerstoff-(ROS) und/oder Stickstoffspezies (RNS). Beispielsweise führt die Reaktion von NO mit dem Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ) zur Bildung des starken Oxidants Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), was wiederum direkt mit Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren interagiert und so biologische Prozesse beeinflusst (43). Die exzessive Produktion freier Radikale (wie NO und Superoxid), welche das Anti-Oxidationssystem überwältigt und dadurch das zelluläre Redox-Gleichgewicht in Richtung einer stark oxidativen Umgebung verschiebt, wird im Allgemeinen als oxidativer Stress bezeichnet (69). Die Rolle von oxidativem Stress und Peroxynitrit in der Entwicklung von Herzinsuffizienz wird derzeit kontrovers diskutiert (43, 70, 71).

Zelluläre Signalprozesse werden außerdem durch direkte Bindung von NO an Aminosäuren reguliert (vgl. Abb. 3). Dabei werden Thiol-Gruppen, insbesondere Cystein-Residuen, S-nitrosyliert, wodurch die sterische Proteinkonformation verändert und die Aktivität moduliert wird. Ein Beispiel stellt das Enzym Arginase 1 dar, welches NOS2-abhängig post-translational durch S-Nitrosylierung seiner Cystein-Residuen in der Aktivität inhibiert wird (62, 72, 73).

Zusammenfassend lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Modulation biologischer Prozesse auf zellulärer Ebene über die Bioverfügbarkeit von NO und dessen unmittelbare Redox-Umgebung bestimmt wird. In Abhängigkeit von der NO-Konzentration (siehe Abb. 3) erfolgt eine gezielte Signalweiterleitung über die NO-sGC-cGMP Achse, aber auch über unspezifische NO-vermittelte Effekte (74).



**Abb. 3: NOS2-vermittelte Signalweiterleitung ist konzentrationsabhängig**

Die NO-Bioverfügbarkeit spielt eine entscheidende Rolle in der Modulation biologischer Prozesse. Auf zellulärer Ebene erfolgt die NO-Synthese durch NOS Isoenzyme, wobei insbesondere die Induktion der NOS2-Expression und der damit verbundene, exzessive Anstieg der NO-Konzentration eine wichtige Rolle in der NO-vermittelten Signalweiterleitung spielen. Geringe NO-Konzentrationen aktivieren die NO-sGC-cGMP Achse, die hauptsächlich für die vasodilatorischen Effekte im kardio-pulmonalen System verantwortlich ist. Exzessive NO-Konzentrationen vermitteln direkte Effekte auf Proteine, andere Radikale, Lipide oder Nukleinsäuren via Nitrosylierungen, Nitrosierungen, Nitrierungen und Oxidierungen. Aus (41).

**1.7 Die Rolle von NO im kardio-vaskulären System**

Physiologisch basale NO Konzentrationen gelten als Produkt der konstitutiv aktiven NOS-Isoformen NOS1 und NOS3 (54, 57, 68). Die Induktion der Expression von NOS2 dagegen resultiert in einem lokalen, zeitlich begrenzten, exzessiven Anstieg der NO-Spiegel (bis hin zu  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen) (41). Im pulmonalen Gefäßsystem sind die vasodilatorischen Eigenschaften von NO bekannt und werden therapeutisch genutzt (7, 49, 75, 76). Zusätzlich fungiert NO als direkter Modulator der kardialen Kontraktilität. Auf molekularer Ebene aktiviert NO das sGC $\alpha$ -sGC $\beta$ -Heterodimer in den Kardiomyozyten, was die vermehrte Bildung von cGMP zur Folge hat. Die Aktivierung dieser NO-sGC-cGMP Signaltransduktionskaskade führt letztendlich zu einer inotropen Antwort (42). Im Stadium der chronischen Drucküberladung des Ventrikels ist die Aktivierbarkeit der sGC vermindert (77).

Der genetisch hergestellte simultane Funktionsverlust aller drei NOS-Isoformen sowie die dadurch erzeugte maximale Reduktion der endogenen NO-Synthese

## Einleitung

---

wurden experimentell bereits studiert. Interessanterweise sind Mäuse ohne jegliche NOS-Aktivität im Herzen lebensfähig, jedoch in ihrer Fertilität eingeschränkt und weisen eine erhöhte Mortalität auf (78). In diesen Tieren wurden kardio-vaskuläre Anomalien detektiert, die sich durch eine deutliche Kardiomyozyten-Hypertrophie mitsamt diastolischer Dysfunktion durch eine Verdreifachung des Kollagenanteils im linken Ventrikel auszeichnen (21).

Darüber hinaus wird in der Literatur die NO-abhängige Modulation der kardialen Funktion über ein biphasisches Profil beschrieben. Während geringe NO-Konzentrationen unter normalen, nicht-gestressten Bedingungen, einen positiv-inotropen Effekt auf das Myokard haben, resultieren exzessive Mengen, möglicherweise durch erhöhte ROS-Formation, in einem negativ-inotropen Effekt (79). Dabei spielt die räumliche Anordnung der NOS-Isoformen eine wesentliche Rolle. Während in Kardiomyozyten NOS1 mit dem sarkoplasmatischen Retikulum und dem Ryanodin-Rezeptor assoziiert ist, wird NOS3 in den *Caveolae* des Sarkolemmas in der unmittelbaren Nähe der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren und dem L-Typ Kalziumkanal lokalisiert (80). Studien an NOS1- und NOS3-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass beide Isoformen unterschiedliche und teils gegensätzliche Rollen in Kardiomyozyten einnehmen. Während NO, das von NOS1 synthetisiert wird, die  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Kalzium-Freisetzung im sarkoplasmatischen Retikulum verstärkt, unterdrückt NOS3-abhängiges NO diese Antwort durch einen hemmenden Effekt auf den L-Typ Kalzium-Kanal. Die simultane Funktionsunfähigkeit beider NOS-Isoformen supprimiert ebenfalls die  $\beta$ -adrenerge Antwort und resultiert zusätzlich in einer ausgeprägten konzentrischen ventrikulären Hypertrophie (80), wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine funktionelle Interaktion beider Isoformen in der Zelle stattfindet und auf diese Weise jeweils den einen oder den anderen Phänotyp beeinflusst (81). Im Gegensatz zu der räumlichen Abhängigkeit der konstitutiv aktiven NOS-Isoenzyme wird die induzierbare NOS2 im Zytoplasma exprimiert (20, 82).

In Patienten mit mild-bis-moderatem und schwerem terminalen Linksherzversagen wurde die kardiale Expression von NOS2 im Gewebe nachgewiesen (83–85) (siehe auch Abb. 4). Daraufhin wurde über die Rolle des Enzyms sowie seines Reaktionsprodukts in der Pathogenese des Linksherzversagens spekuliert (20, 82). Allerdings können erfolgreiche Therapiekonzepte zur Behandlung linksventrikulärer Dysfunktion oder Insuffizienz nicht *per se* auf den rechten Ventrikel übertragen

## Einleitung

---

werden. Der Grund dafür ist, dass der rechte Ventrikel strukturell mit seiner vergleichsweise dünnen freien Wand bogenförmig um den linken Ventrikel angeordnet ist und geringere Drücke gegen einen geringeren Widerstand entwickelt, sodass der Sauerstoffverbrauch im rechten Ventrikel deutlich geringer ist, was sich wiederum im koronaren Blutfluss widerspiegelt (86). Die vasodilatorische Wirkung von NO in den Koronargefäßen, die zur erhöhten Sauerstoffversorgung und Nährstoffversorgung des Myokards führt, ist bereits bekannt (87, 88). Auf molekularer Ebene gibt es Ventrikel-spezifische Unterschiede bei der zellulären Signalweiterleitung sowie bei der Kalzium-Verarbeitung (89, 90). Möglicherweise liegt der Ursprung dieser Divergenz bereits in der frühen Herzentwicklung, da Kardiomyozyten des linken Ventrikels aus dem sogenannten primären und die Kardiomyozyten des rechten Ventrikels aus dem sekundären Herzfeld differenzieren (91). Insbesondere die Therapieansprache der zwei Ventrikel bei der Behandlung von rechtsventrikulärer Insuffizienz in Patienten mit kongenitalen Herzerkrankungen demonstriert die Auswirkungen der beschriebenen Unterschiede bestmöglich. Verschiedene klinische Studien haben gezeigt, dass die Behandlung dieser rechtsventrikulären Insuffizienz mit Standard-Therapien für Patienten mit linksventrikulärer Insuffizienz (u.a.  $\beta$ -Blocker, ACE-Inhibitoren, ATIIIR-Blocker) keine Auswirkung auf die kardiale Funktion oder das Patientenüberleben hat (92–94).

Derzeit ist für die Behandlung von Patienten mit rechtsventrikulärer Dysfunktion keine zugelassene Therapiestrategie verfügbar um gezielt die Progression der Erkrankung zu verlangsamen, gar aufzuhalten oder ultimativ die maladaptive Transition hin zur Insuffizienz zu verhindern. Allerdings sind mittlerweile zwei Therapieformen zur Behandlung unterschiedlicher PAH-Varianten klinisch zugelassen die mit dem NO-sGC-cGMP Signalweg interferieren – die direkte sGC-Stimulation und Hemmung der cGMP-Degradierung durch PDE5-Inhibition (7, 95). Beiden Konzepten ist gemein, dass sie auf zellulärer Ebene das initiale Signal der Kaskade, die NO-Bioverfügbarkeit, an einem nachgeschalteten Effektor imitieren und dadurch das Signal selektiv amplifizieren oder aufrechterhalten (96).

Die NO-Bioverfügbarkeit wird wie bereits erwähnt endogen maßgeblich durch die Aktivität der drei NOS-Isoenzyme reguliert. Interessanterweise wird die persistierende PH in Neugeborenen direkt über NO-Inhalation und die dadurch provozierte Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit in der Lungenstrombahn therapiert (97). Allerdings sind Erwachsene PH-Patienten zu einem signifikanten Anteil nicht



## Einleitung

---

empfindlich für inhaliertes NO und gleichzeitig ist die Dauer der pulmonalen Vasodilatation sehr kurz, gefolgt von häufig auftretender starker Vasokonstriktion direkt nach Beendigung der NO-Inhalation. Des Weiteren haben Studien zu den Auswirkungen hoher inhalierter NO-Konzentrationen gezeigt, dass in diesen Fällen die Wahrscheinlichkeit für unspezifische Interaktionen von NO mit unterschiedlichsten Biomolekülen erhöht ist (98). Eine direkte Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit im Blutkreislauf kann ebenfalls über die Zufuhr von NO-Donoren, organische Nitrate wie Natrium-Nitroprussid (SNP), S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin (SNAP) oder Nitroglycerin, erreicht werden. Die Applikation dieser Substanzen führt in der Tat unspezifisch zur Vasodilatation der Blutgefäße, sodass dadurch die Nachlast verringert wird (99). Gegen eine langfristige Behandlung von PH-Patienten spricht jedoch die schnelle Entwicklung einer NO-Toleranz, sodass eine ausreichende Vasodilatation der Blutgefäße anschließend nicht mehr über exogen zugeführtes NO erzielt werden kann (100). Aufgrund der unspezifischen, vasodilatatorischen Wirkung von organischen Nitraten treten außerdem nachteilige systemische Effekte wie beispielsweise Hypotension oder Hypoxämie durch eine beeinträchtigte Anpassung von Ventilation zu Perfusion auf (101). Eine weitere Möglichkeit artifiziell die NO-Bioverfügbarkeit zu erhöhen ist die Supplementation von L-Arginin. Diese Aminosäure fungiert als Substrat der NOS-Isoenzyme und ist für die endogene NO-Synthese essentiell. Obwohl die L-Arginin Konzentration in den meisten Zellen ausreichend ist um die maximale NOS-Enzymaktivität zu gewährleisten, kann die Zufuhr von L-Arginin die NO Synthese weiter erhöhen, ein Phänomen, das auch als L-Arginin-Paradoxon bekannt ist (102). Klinische Studien zur Effektivität der L-Arginin-Supplementation lieferten allerdings kontroverse Resultate. Eine Vielzahl an Studien konnte keinen Effekt der L-Arginin-Zugabe auf die NO-Bioverfügbarkeit sowie unterschiedlichste kardio-vaskuläre Parameter feststellen (103, 104) und in Studien nach Myokardinfarkt wurde sogar eine Tendenz zur erhöhten Mortalität der L-Arginin-Empfänger detektiert (105). Im Gegensatz dazu zeigten Studien, in denen der Blutdruck als Zielparameter betrachtet wurde oftmals eine offensichtlich durch Vasodilatation der Blutgefäße ausgelöste Verringerung der erhöhten Drücke (106). Derzeit ist unzureichend verstanden, warum die klinischen Beobachtungen infolge von L-Arginin-Supplementation und erhöhter endogener NO-Synthese in solch einem Maße divers sind. Patientenselektion, Dosierungen und große individuelle Variationen in der außerklinischen täglichen L-Arginin Aufnahme

## Einleitung

spielen möglicherweise eine Rolle. Ein weiteres Problem ist, dass L-Arginin zusätzlich zur Erhöhung der Aktivität aller drei NOS-Isoformen gleichzeitig auch weitere Enzyme und deren Signalwege beeinflusst. Diese sind allerdings wiederum völlig unabhängig von der NO-Produktion, wie beispielsweise Arginasen, die als Schlüsselenzyme im Harnstoff-Zyklus ebenfalls L-Arginin als Substrat benötigen (107). Aufgrund dessen dienen derzeit selektiv nur diejenigen Komponenten der NO-sGC-cGMP Signalkaskade als therapeutische Zielstrukturen, die die direkte sGC-Stimulation oder die Aufrechterhaltung der cGMP-Konzentration fördern, um gleichzeitig die genannten unspezifischen Nebenwirkungen zu minimieren.

Dementsprechend ist eine detaillierte Untersuchung zum Verständnis der Beteiligung von NOS2 an der Entstehung von rechtsventrikulärer Dysfunktion sowie den strukturellen myokardialen Umbauprozessen erstrebenswert. Dazu stellt das Modell der Pulmonalarterienstenose ein geeignetes tierexperimentelles Werkzeug dar, um nachlast-unabhängig die Wirkung einer globalen NOS2-Defizienz auf den rechten Ventrikel bei chronischer Drucküberbelastung zu untersuchen.

	NOS1	NOS2	NOS3
In normal hearts			
Anti-hypertrophic effect	✓		✓
Pro-hypertrophic effect		✓ or –	
Inhibition of L-type Ca <sup>2+</sup> current	✓	–	✓
Net negative inotropic effect	✓	–	✓
Attenuates the $\beta$ -adrenergic receptor-stimulated increase in myoc. contractility	✓		✓
Pro-apoptotic effect		✓ or –	
Pro-fibrotic effect		✓ or –	
Induces LV remodeling and failure		✓ or –	
During hypertrophy/failing/coronary artery occlusion			
Upregulated expression	✓	✓	
Downregulated expression			✓
Protects against remodeling	✓		✓
Protects against calcium overload	✓		
Limits infarct size		✓	
Improves contractile recovery after I/R		✓	

### Abb. 4: Übersicht über den Einfluss der NOS in gesunden und hypertrophen/insuffizienten Herzen

Alle in Säugetieren beschriebenen NOS-Isoenzyme werden im Herzen exprimiert und synthetisieren NO. Die Rollen der konstitutiv aktiven Isoformen NOS1 und NOS3 ist weitestgehend aufgeklärt, während die Ergebnisse experimenteller Studien zur Funktion von NOS2 kontroverse Resultate zeigten, sodass dessen Rolle im gesunden sowie im hypertrophierten und insuffizienten Herzen nicht hinreichend verstanden ist. Übernommen aus (83).

### **1.8 NO, Superoxid, Peroxynitrit und oxidativer Stress**

Die Rolle von NO als Radikalfänger, bei der Superoxid in einer schnellen Radikal-Radikal-Reaktion abgefangen wird und sich Peroxynitrit formiert, wurde bereits mehrfach beschrieben (108, 109). Die erhöhte Produktion von Superoxid im Ventrikel infolge von chronischer Drucküberladung wurde in experimentellen (110–113) und in klinischen Untersuchungen (114–116) adressiert. Dabei wurden unterschiedliche experimentelle Konzepte angewandt, um zum einen die Quelle(n) exzessiver Superoxid-Produktion zu identifizieren und zum anderen die Auswirkungen veränderter Radikalmengen zu studieren. Als mögliche Superoxid-Quellen wurden dabei unter anderem ein Entkoppeln von NOS3 (108, 117), NADPH-Oxidasen (118, 119) sowie Xanthin-Oxidasen (120, 121) und die mitochondriale Atmungskette identifiziert (122). Des Weiteren ist es aus therapeutischer Sicht sinnvoll, die Bildung von Peroxynitrit im Gewebe zu minimieren oder die durch Peroxynitrit aktivierten Signalwege zu inhibieren. Dies kann entweder über Hemmung der exzessiven NO-Synthese oder durch Inhibition der vermehrten Superoxid-Produktion erfolgen. Da jedoch sowohl basale NO-Mengen zur Aktivierung der NO-sGC-cGMP Achse (49, 98, 123) als auch Superoxid-Radikale als Signalmediatoren (unter anderem in Mitochondrien) benötigt werden (124), sind starke anti-oxidative Therapiestrategien meist unspezifisch und häufig mit teils schweren Nebenwirkungen verbunden (125, 126).

Experimentelle Untersuchungen zu den Mechanismen, die zum Entkoppeln von NOS3 und somit zur vermehrten Synthese von Superoxid anstelle von NO führen, identifizierten unter anderem eine erhöhte Oxidation des Ko-Faktors und Radikalfängers BH<sub>4</sub> als kritischen Vorgang im Gewebe (53, 127). BH<sub>4</sub> ist strukturell entscheidend für die Dimerisierung zweier NOS-Monomere und somit für die NOS3 Enzymaktivität. Experimentelle Daten suggerieren, dass die NO-Synthese im drucküberladenen Ventrikel zunächst ansteigt aber über einen längeren Zeitraum nicht weiter aufrechterhalten werden kann. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass BH<sub>4</sub> ab einem unbestimmten Zeitpunkt überwiegend zu BH<sub>2</sub> oxidiert wird und somit NOS3 Superoxid anstelle von NO synthetisiert (128). Gleichzeitig reduziert eine Therapie mit BH<sub>4</sub> hauptsächlich aufgrund von verringerter Superoxid-Produktion durch Inhibition der NOS3-Entkopplung die Peroxynitrit-Formation und verringert dadurch die Ausbildung myokardialer Fibrose. Die Supplementation von BH<sub>4</sub> wurde in PAH-Patienten bereits in klinischen Studien adressiert (ClinicalTrials.gov Identifier:

## Einleitung

---

NCT00435331), zeigte jedoch keine Verbesserungen der angestrebten Zielparameter. Auch in anderen medizinischen Indikationen demonstrierten weitere klinische Studien mit oraler BH<sub>4</sub>-Supplementation widersprüchliche Resultate. Während beispielsweise die endotheliale Dysfunktion in Patienten mit Hypercholesterinämie nach BH<sub>4</sub>-Behandlung deutlich verbessert wurde (129), hatte die Behandlung in Patienten mit koronarer Herzerkrankung keinen Einfluss auf die vaskuläre Funktion oder die Superoxid-Produktion (130). *Ex vivo* Studien lieferten erste Hinweise, dass möglicherweise die schnelle Oxidation von BH<sub>4</sub> zu BH<sub>2</sub> im Gewebe die Wirksamkeit der Ko-Faktor-Zufuhr beeinträchtigt und zusätzlich die vaskuläre BH<sub>4</sub>/BH<sub>2</sub> Balance in Richtung oxidiertes BH<sub>2</sub> verschiebt, sodass das NOS3-Entkoppeln und die Superoxid-Produktion gefördert und nicht reduziert werden (130). Dementsprechend wird derzeit die Ko-Administration von BH<sub>4</sub> mit anti-oxidativ wirkenden Folaten oder Vitamin C diskutiert, um die zelluläre Redox-Umgebung zu beeinflussen und die direkte BH<sub>4</sub>-Oxidation zu verhindern. Die Ergebnisse dieser klinischen Studien mit BH<sub>4</sub> Supplementation und Ko-Administration von Folaten/Vitaminen zum Re-Koppeln von NOS3 in Patienten mit endothelialer Dysfunktion, peripheren Arterienerkrankungen, systemischer Hypertension und Arteriosklerose stehen noch aus.

Eine erhöhte myokardiale NADPH-Oxidase (Nox) -Aktivität, insbesondere der Nox2-Isoform und dadurch erhöhte Superoxid-Konzentrationen wurden im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz detektiert (118). Die experimentelle Inhibition der Nox2-Enzymaktivität resultierte in einer signifikant reduzierten Superoxid-Produktion und verringerter myokardialer Fibrose nach trans-aorten Konstriktion (TAC) (119). Ebenso resultierte die Inhibition der Xanthin-Oxidasen durch Allopurinol oder strukturellen Analoga ebenfalls in verringerten Superoxid- und Peroxynitrit-Konzentrationen sowie reduzierter myokardialer Fibrose nach TAC (120, 131, 132). In diesem Zusammenhang demonstrierte eine kleine klinische Studie erfolgsversprechende Ergebnisse infolge von Allopurinol-Administration - einem unentbehrlichen Arzneimittel für die Behandlung von Gicht - in Patienten mit Herzinsuffizienz (121). Interventionen am beeinträchtigten anti-oxidativen System, welches Superoxid-Radikale zu Wasserstoffperoxid verstoffwechselt, resultierten nach SOD3-Funktionsverlust in erhöhten Superoxid-Konzentrationen und verstärkter myokardialer Fibrose nach TAC (111). Im Gegensatz dazu konnte die Superoxid-Produktion und die Ausbildung myokardialer Fibrose durch die Behandlung TAC-

## Einleitung

---

operierter Tiere mit einem SOD- und Katalase-Mimetikum deutlich inhibiert werden (133). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass die erhöhte Superoxid-Produktion und die Formation von Peroxynitrit im drucküberladenen Ventrikel kritische Mediatoren der Entwicklung myokardialer Fibrose sind und dass deren Reduktion einen signifikanten therapeutischen Effekt haben kann.

Ein weiterer Produzent von ROS im Herzen sind Mitochondrien (134, 135). Während der normalen Zellatmung werden in diesen Zellorganellen basale ROS-Mengen produziert, die als Signalmediatoren die biochemischen Prozesse der Atmungskette aufrechterhalten (135) und die Energieproduktion in Form von ATP gewährleisten. Die physiologische Funktion von NO in den Mitochondrien ist die Regulation des Sauerstoffverbrauchs durch reversible kompetitive Hemmung der Cytochrom-C Oxidase (Komplex 4 der Atmungskette) (136). Die exzessive NO-Produktion durch NOS führt dabei zur Unterbrechung der Elektronentransportkette an der Cytochrom-C Oxidase, was wiederum zur erhöhten Freisetzung von Superoxid in die mitochondriale Matrix und schließlich auch zur vermehrten Formation von Peroxynitrit führt (137, 138). Analysen des Proteoms von drucküberladenen linken und rechten Ventrikeln haben Veränderungen in der Expression sowohl metabolischer als auch mitochondrialer Proteine detektiert (139–141). Infolge von mitochondrialer Dysfunktion, die bei PAH und chronischer Drucküberladung auftritt (142, 143), werden exzessive ROS-Mengen (unter anderem Superoxid und Peroxynitrit) produziert (144). Eine Intervention mit Dichloressigsäure (DCA), einem Molekül welches zur Behandlung angeborener Mitochondrien-Abnormalitäten eingesetzt wird, inhibiert die mitochondriale Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK) (145) und erhöht dadurch das Pyruvat-Laktat Verhältnis, sodass die Funktionalität der Atmungskette theoretisch wieder hergestellt werden kann (146, 147). In der medizinischen Indikation der PAH erzielt die DCA-Therapie in einer Teilgruppe von Patienten einen positiven Effekt.

Aufgrund der hohen Reaktivität und kurzen Halbwertszeit des Peroxynitrit-Radikals ist es zwingend erforderlich dieses Molekül verlässlich zu detektieren und in Untersuchungen selektiv den Effekt dieser hochreaktiven Spezies zu analysieren (148, 149). Studien an isolierten perfundierten Herzen mit Infusion einer Kombination aus NO-Donor und einem Superoxid-Stimulator oder dem Peroxynitrit-Generator SIN-1 haben gezeigt, dass die akute Zufuhr von Peroxynitrit konzentrations-abhängig ventrikuläre Dysfunktion induziert (150). Die akute systemische Infusion von

## Einleitung

---

Peroxynitrit in anästhesierten Ratten resultierte zwar initial ebenfalls durch Vasodilatation in einer robusten Verringerung des systemischen Blutdrucks, wurde jedoch schnell gefolgt von Tachypylaxie und der Rückkehr zum Ausgangsblutdruck (151). Des Weiteren inhibierte die intravenöse Gabe von 3-Nitrotyrosin, einem stabileren Peroxynitrit-Derivat, die hämodynamische Antwort der anästhesierten Ratten auf Katecholamine (Nor-Epinephrin und Epinephrin), einem  $\alpha$ -Adrenorezeptor Agonist (Phenylephrin), dem  $\beta$ -Rezeptoragonist Isoprenalin sowie Angiotensin II (152–156). Insbesondere die verringerte Antwort auf die unterschiedlichen kardioaktiven Substanzen bringen Peroxynitrit in den Zusammenhang mit der Pathogenese von Herzinsuffizienz. Obwohl Peroxynitrit durch die Initiation der Apoptose ein zellschädigendes Potential in unterschiedlichen Zelltypen besitzt, wird die Hypothese, dass eine vermehrte Peroxynitrit-Formation zu myokardialen und vaskulären Schädigungen beiträgt, derzeit kritisch diskutiert (43, 157, 158).

Klinische Daten machen deutlich, dass in der pulmonalen Vaskulatur und im rechten Ventrikel von PAH-Patienten oxidativer Stress erhöht und die anti-oxidative Kapazität beeinträchtigt ist (114, 116). Eine neue vielversprechende therapeutische Strategie adressiert die Hemmung der durch oxidativen Stress ausgelösten pathologischen Signalweiterleitung. In diesem Zusammenhang wurde das Protein ASK1 (*Apoptosis-signal regulating kinase 1*) als kritischer Knotenpunkt der oxidativen Stress-induzierten Signalweiterleitung in der pulmonalen Vaskulatur und im rechten Ventrikel identifiziert (159, 160). ASK1 wird ubiquitär exprimiert, aber exklusiv in einer oxidierenden Umgebung aktiviert (113). Die Aktivierung dieser redox-sensitiven MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) löst eine Signalkaskade aus, die fibrotische, inflammatorische, proliferative und apoptotische Signalwege reguliert (161–164). Derzeit werden erste Resultate einer klinischen Phase II Studie zur Testung der Effektivität eines hochselektiven ASK1 Inhibitors in erwachsenen PAH-Patienten mit großem Interesse erwartet (ClinicalTrials.gov: NCT02234141).

## **2. Ziel dieser Arbeit**

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Gasotransmitter mit vasodilatorischen Eigenschaften im kardio-pulmonalen Gefäßsystem, dessen Bioverfügbarkeit die so genannte NO-sGC-cGMP Signaltransduktionskaskade reguliert. Des Weiteren resultieren exzessive NO-Mengen in der Formation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), deren Produktion mit einer beeinträchtigten kardialen Funktion assoziiert wird. In Säugetieren wird NO endogen von drei Isoenzymen, den NO Synthasen (NOS), gebildet, wobei exklusiv die Induktion der NOS2-Isoform in exzessiven NO-Konzentrationen und demnach auch in einer erhöhten Formation von ROS resultiert. Vorangegangene experimentelle Studien identifizierten NOS2 als kritischen Mediator der Pathogenese pulmonaler Hypertonie (PH). Inwieweit die beobachteten Resultate exklusiv durch eine Verringerung des pulmonal-arteriellen Widerstands und dementsprechend durch Reduktion der Nachlast oder durch einen direkten Effekt auf das Myokard bedingt sind, wurde in diesen Studien nicht adressiert. Da außerdem im Myokard von Patienten mit mild-bis-moderatem und schwerem Herzversagen eine erhöhte NOS2-Expression bereits beschrieben ist, war es Ziel dieser Arbeit die Rolle von NOS2 in der experimentellen Rechtsherzhypertrophie und Dysfunktion zu charakterisieren.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

In dieser Studie wurden ausschließlich männliche Mäuse (*Mus musculus*) der Inzuchtlinie C57Bl/6J verwendet. Genetisch unveränderte (Wildtyp-) Kontrolltiere werden in dieser Arbeit mit NOS2<sup>+/+</sup> bezeichnet, Mäuse die einen homozygoten globalen NOS2 Gendefekt tragen und der Zuchtlinie B6.129P2-NOS2<sup>tm1Lau/J</sup> entstammen, werden im Folgenden als NOS2<sup>-/-</sup> betitelt. Eine gezielte Veränderung im NOS2-Gen wurde über die Insertion einer Neomycin-Kassette in Exon zwölf und dreizehn herbeigeführt. Da diese Regionen für die Ca<sup>2+</sup>-bindende Calmodulin-Bindestelle kodieren, welche essentiell für die Proteinaktivität ist, kann das NOS2 Protein trotz erfolgreicher Expression aufgrund der genetischen Alteration kein NO synthetisieren (verifiziert in (165)). Zuchtbetrieb und Lieferant dieser Tiere im Alter zwischen acht und zehn Wochen waren die Charles River Laboratorien in Sulzfeld.

Während der Versuchsdauer wurden die Tiere im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter kontrollierten Bedingungen gehalten. Dazu zählte ein unbegrenzter Zugang zu Leitungswasser, *ad libitum* Fütterung mit Altromin 1234 Halteungsdiät für Nager (Altromin, Lage), ein zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus sowie eine mittlere Umgebungstemperatur von zirka 25° C.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt und können unter dem Aktenzeichen 43/2014 eingesehen werden.

#### 3.2 Pulmonalarterienstenose

Invasive Eingriffe wurden an Mäusen mit einem Körpergewicht zwischen 18-22 g vorgenommen. Dazu erfolgte zunächst eine analgetische Versorgung aller Tiere (0,3 mg/kg Buprenorphin, CEVA Tiergesundheit, Düsseldorf), um anschließend den invasiven Eingriff einzuleiten. Unter Einsatz des Inhalationsanästhetikums Isofluran (3% (v/v) in 100% Sauerstoff, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) wurden alle Tiere intubiert und über ein Beatmungsgerät (Mini Vent Type 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) mechanisch ventiliert (Tidalvolumen 220 µl/Atemzug, Beatmungsfrequenz 200-250 Atemzüge/Minute gegen eine 1 cm Wassersäule). Die Öffnung des Thorax erfolgte zwischen der ersten und zweiten Rippe um Zugang zur Brusthöhle zu erlangen. Anschließend konnte das Perikard eröffnet, die



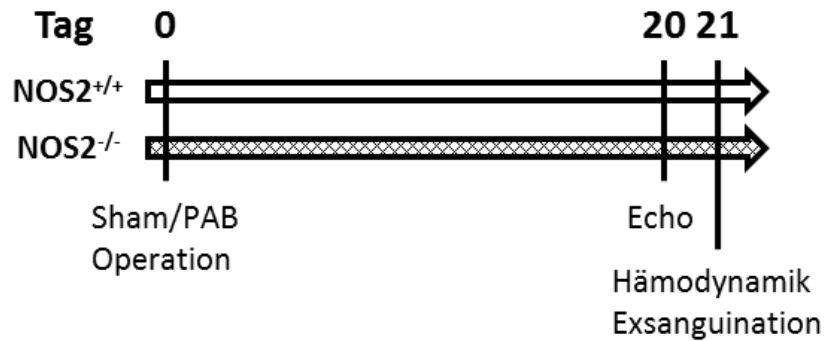
## Material und Methoden

---

Pulmonalarterie lokalisiert und vom umgebenden Fettgewebe isoliert werden. Die Pulmonalarterienstenose wurde mittels eines Titanium-Ligaturclips (Weck Hemoclip, RICA Surgical Products, Inc., Illinois, USA) mit einem definierten Durchmesser von 0,3 mm induziert. Kontrolltiere, in dieser Studie als Sham (d.h. Schein) bezeichnet, unterliefen einer identischen Prozedur mit Ausnahme der Stenose (dementsprechend Schein-operiert). Final wurde die Brusthöhle über den Rippen eins und zwei geschlossen (Vicryl Plus, 5-0 Nadel-Faden-Kombination, Ethicon, Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt), die Thoraxmuskeln re-positioniert und die Haut mit der Nadel-Faden-Kombination vernäht. Abschließend konnte die Isofluran-Zufuhr gestoppt und die Aufwachphase eingeleitet werden, sodass nach dem Einsetzen der eigenständigen Atmung extubiert und der Eingriff abgeschlossen werden konnte.

### 3.3 Studiendesign

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl  $\text{NOS2}^{+/+}$  als auch  $\text{NOS2}^{-/-}$  Mäuse einem invasiven Eingriff unterzogen. Dabei wurde in jedem Genotyp zufällig eine selektive rechtsventrikuläre Drucküberladung induziert oder eine Sham-Operation durchgeführt (vg. 3.2). 20 Tage nach dem jeweiligen Eingriff erfolgte die Phänotypisierung der jeweiligen Versuchsgruppe. Dazu wurde zunächst nicht-invasiv, durch echokardiographische Bildgebung die kardiale Funktion charakterisiert (vgl. 3.4). Im Anschluss daran konnte am darauffolgenden Tag invasiv intra-kardial die hämodynamische Leistung des Herzens untersucht werden (vgl. 3.5). Die Terminierung des Experiments wurde schließlich durch Exsanguination (d.h. Ausblutung) herbeigeführt. Die nachstehende Abbildung verdeutlicht das beschriebene Studiendesign.



### Abb. 5: Studiendesign

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurden invasive Eingriffe an Mäusen vorgenommen um entweder eine chronische Drucküberladung des rechten Ventrikels zu induzieren (PAB) oder eine Kontrollsituation (Sham, Schein-OP) herbeizuführen. Die Auswirkungen dieser experimentellen Pulmonalarterienstenose auf die kardiale Funktion wurde *in vivo* in NOS2<sup>+/+</sup> und NOS2<sup>-/-</sup> Tieren studiert. Dazu wurde 20 Tage nach dem operativen Eingriff eine nicht-invasive transthorakale echokardiographische Auswertung der rechtsventrikulären Funktion in allen Mäusen durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurden die kardialen Eigenschaften zusätzlich invasiv mittels intra-kardialer Druck-Volumen Bestimmung analysiert. Final erfolgten die Exsanguination der Tiere sowie die Aufbereitung der Organe für weiterführende Analysen.

### 3.4 Echokardiographie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden dem in Abb. 5 dargestellten Studiendesign nicht-invasive trans-thorakale echokardiographische Analysen an Mäusen durchgeführt. Dazu wurde am Tag 20 nach dem jeweiligen invasiven Eingriff eine anhaltende Narkose mittels Isofluran (1,5-2% (v/v) in 100% Sauerstoff, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) eingeleitet, das Körpergewicht bestimmt und die Körpertemperatur, Respiration sowie Herzfrequenz der Tiere während der gesamten Untersuchungsdauer kontrolliert. Elektrokardiogramme (EKG) wurden fortlaufend geschrieben. Die Datenerfassung erfolgte durch Dr. Baktybek Kojonazarov mittels Ultraschallgerät (Vevo2100, Visualsonics, Toronto, Kanada) ausgestattet mit einem 40 MHz Schallkopf. Folgende Messparameter wurden erhoben:

#### Rechtsventrikulärer interner Durchmesser

Im apikalen Vier-Kammer-Blick wurde die maximale Distanz von der rechtsventrikulären freien Wand bis zum Septum in der End-Diastole gemessen (RVIDd).

Systolische Auslenkung des Trikuspidalklappenannulus

Die quantitative Beurteilung der longitudinalen Ventrikelfunktion erfolgte über die Bestimmung der Auslenkung des Trikuspidalklappenannulus in der Systole (TAPSE). Dazu wurde im Vier-Kammer-Blick die Untersuchungslinie des M-Modus am Annulus der Trikuspidalklappe platziert und die Distanz der maximalen Ausdehnung in der Systole gemessen.

Herzzeitvolumen

Die Bestimmung des Herzzeitvolumens (*cardiac output*, CO) erfolgte aus dem pulmonal-arteriellen Fluss-Geschwindigkeit Zeitintegral (PA VTI), gemessen mittels *pulsed-wave* Doppler. Die Berechnung des CO erfolgte aus der Kombination von PA VTI, der Fläche der Pulmonalarterie und der Herzfrequenz wie in (25, 32) beschrieben. Die Beschreibung des Herzzeitvolumens erfolgte in dieser Arbeit in Bezug zum Körpergewicht (BW) des jeweiligen Tieres (*cardiac index*,  $CI=CO/BW$ ).

Myokardialer Funktionsindex

Der myokardiale Funktionsindex (MPI), auch Tei-Index genannt, wurde mittels Gewebedopplerechokardiographie auf der rechtsventrikulären freien Wand bestimmt. Der Funktionsindex berechnet sich aus dem Quotienten von isovolumetrischer Kontraktionszeit (IVCT) plus isovolumetrischer Relaxationszeit (IVRT) zur Auswurfzeit (ET) und reflektiert die globale kardiale Funktion ( $MPI=(IVCT+IVRT)/ET$ ).

Rechtsventrikuläre Wanddicke

Die Bestimmung der rechtsventrikulären Wanddicke erfolgte als Distanzmessung der freien Wand in der End-Diastole (RVWTD).

**3.5 Hämodynamische Messungen**

21 Tage nach dem jeweiligen operativen Eingriff wurden alle Tiere hämodynamisch evaluiert. Dazu wurde die Narkose mittels Isofluran (1,5-2% (v/v) in 100% Sauerstoff, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) eingeleitet und über eine nicht-invasive Atemmaske während der Messung aufrechterhalten. Die Kontrolle der Körpertemperatur (37° C) sowie der Herzfrequenz erfolgte ebenfalls über die gesamte Versuchsdauer. Ein 1F Druck-Volumen Katheter (PVR1030, ADInstruments, Oxford, UK), angeschlossen an ein MPVSultra Datenerfassungssystem (ADInstruments, Oxford, UK), wurde vor jeder Messung in 37° C warmer physiologischer Kochsalzlösung mit der entsprechenden Software kalibriert (MPVS Ultra Control Interface, ADInstruments, Oxford, UK).

## Material und Methoden

---

Die rechtsventrikuläre intra-kardiale Messung erfolgte über die Punktion der rechten externen Jugularvene und dem langsamen Vorschieben des Katheters in den rechten Ventrikel. Im Anschluss an eine Equilibrierungsphase wurden erste stationäre Signale aufgezeichnet. Im Anschluss daran konnte direkt unterhalb des *Processus xiphoideus* ein kleiner Schnitt gesetzt, die Leber arrangiert und die *Vena cava inferior* lokalisiert werden. Mit Hilfe eines Baumwollstäbchens (871-PC DBL, Puritan, Maine, USA) erfolgte eine temporäre Okklusion des Gefäßes zur Änderung des venösen Blutrückflusses während der Datenerfassung. Im Anschluss an diese Messung wurde der Katheter über die Jugularvene entfernt, die rechte Jugularvene okkludiert und die rechte Karotidarterie mit dem gleichen Katheter punktiert um den systemischen und linksventrikulären Blutdruck zu messen.

Die Datenanalyse erfolgte in der Software Labchart 8 (ADInstruments, Oxford, UK) mit installiertem Druck-Volumen Modul. Das gemessene Herzzeitvolumen aus der echokardiographischen Analyse wurde verwendet um das Kathetervolumensignal in jeder Maus individuell zu kalibrieren, wie es bereits an Modellen der Ratte mehrfach beschrieben wurde (31, 34, 166–170). Hämodynamische Parameter wie Herzfrequenz, rechtsventrikulärer systolischer (RVSP) und diastolischer (RVDP) Druck, systemischer Blutdruck (SBP<sub>sys</sub>) und linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP) wurden direkt gemessen. Der Nachlast-unabhängige Parameter endsystolische Elastizität (E<sub>es</sub>) wurde als Steigung des endsystolischen Druck-Volumen Verhältnisses (ESPVR) von der Labchart Software berechnet. Das Schlagvolumen (SV) wurde aus dem Herzzeitvolumen geteilt durch die Herzfrequenz kalkuliert. Die arterielle Elastizität (E<sub>a</sub>) wird über den rechtsventrikulären systolischen Druck dividiert durch das Schlagvolumen beschrieben. Die ventrikuläre-arterielle Kopplung kann über den Quotienten von E<sub>es</sub>/E<sub>a</sub> dargestellt werden.

Terminal erfolgte die Tiertötung über Exsanguination mit direkter Blutentnahme aus dem rechten Ventrikel in Lithium-Heparin-Monovetten (S-Monovette Lithium-Heparin, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht). Nach mehrmaligen Spülen in eiskaltem PBS zur Entfernung überflüssiger Blutzellen und anschließender *ex vivo* Bestimmung des rechten Ventrikels sowie linker Ventrikel plus Septum (LV+S) Gewichtes wurde das Gewebe für molekularbiologische Analysen direkt in flüssigen Stickstoffstoff schockgefroren. Proben für die histologischen Untersuchungen wurden dagegen entweder in ein Einbettmedium zum Anfertigen von Gefrierschnitten (Tissue Tek, Qiagen, Venlo, Niederlande) mit anschließendem Schockfrieren in Flüssigstickstoff

oder für 48 Stunden in 3,5% Paraformaldehyd-Lösung (Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken) fixiert, in PBS gewaschen und in einer Entwässerungsmaschine (Leica Microsystems, GmbH, Nussloch) mit 70% Ethanol dehydriert. Das behandelte Gewebe wurde anschließend in Paraffin eingebettet und 3 µm dünne histologische Schnitte mittels Rotationsmikrotom (Leica Microsystems GmbH, Nussloch) angefertigt.

### **3.6 Histologische Methoden**

#### **3.6.1 Pikrosiriusrot Färbung**

Zur Bestimmung des Gesamtkollagengehalts im rechten Ventrikel wurden 3 µm dünne Gewebeschnitte von Sham und PAB operierten NOS2<sup>+/+</sup> sowie NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen histologisch gefärbt. Die Deparaffinierung des Gewebes erfolgte bei 58° C für eine Stunde gefolgt von dreimaligem Waschen in Xylol. Anschließend wurde das Gewebe in einer Alkoholreihe (99,6%, 96%, 70% Ethanol) für jeweils fünf Minuten rehydriert. Die Färbung der Kollagenfasern erfolgte über Inkubation des Gewebes mit 0,1% Siriusrot in 1,2% Pikrinsäure (pH=2) für 60 Minuten. Im Anschluss daran wurde das Gewebe drei Mal für jeweils zwei Minuten in 1% Essigsäure gewaschen und darauffolgend in einer steigenden Ethanol-Reihe (70%, 96%, 99,6%) entfärbt. Final wurde das Gewebe in Xylol für eine Minute gewaschen und anschließend mittels Entellan-Schnelleindeckelmedium (Merck, KGaA, Darmstadt) auf Objektträgern eingedeckelt. Die Analyse der Schnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop mit integrierter Kamera (Leica Microsystems GmbH, Nussloch) durch die Software Leica Q Win V3 (Leica Microsystems GmbH, Nussloch). Die angefärbten Schnitte wurden mit wenigstens 35 Gesichtsfeldern pro Herz mäanderförmig gescannt, sodass der Mittelwert aller Gesichtsfelder den prozentualen, fibrotischen Anteil eines Herzens repräsentiert. Insgesamt wurden wenigstens vier unterschiedliche Herzen pro Gruppe mit randomisierten Gesichtsfeldern verblindet betrachtet.

#### **3.6.2 WGA-FITC Färbung**

Der Durchmesser der rechtsventrikulären Kardiomyozyten wurde in Gewebeschnitten mit Hilfe von Weizenkeimagglutinin (WGA) bestimmt, welches an das fluoreszierende Molekül Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt war. WGA bindet an Sialinsäure-Resten von membranständigen Glykoproteinen und färbt durch seine FITC-Kopplung unspezifisch die Umrisse der Zellen in den Gewebeschnitten an, sodass der Zelldurchmesser ausgemessen werden kann. Dazu erfolgte analog zur Pikrosiriusrot

## Material und Methoden

Färbung zunächst für eine Stunde bei 58° C die Deparaffinierung des Gewebes, gefolgt von dreimaligem Waschen in Xylol. Rehydrierung der Schnitte wurde durch jeweils fünf minütige Waschschriffe in einer abnehmenden Alkoholreihe (99,6%, 96%, 70% Ethanol) erreicht. Im Anschluss daran wurden potentielle freie WGA-Bindestellen mit 10% BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation des Gewebes mit 0,15 µg/ml WGA-FITC Lösung (L-4895, Sigma Aldrich, Steinheim) im Dunkeln für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Darauf folgend wurde die Färbelösung mit PBS abgewaschen (6x10 min), sodass anschließend die Gewebeschnitte mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-diamidin-2-phenylindol, D1306, Life Diagnostik, Köln) zur Visualisierung der Zellkerne inkubiert (0,01% in PBS für 10 min) werden konnten. Im Anschluss an erneutes dreimaliges fünfminütiges Waschen in PBS wurden die gefärbten Schnitte mit Dako-Fluoreszenz-Eindeck-Medium (Dako, Glostrup, Dänemark) auf Objektträgern eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop indem einzelne Zellen über den DAPI-gefärbten Zellkern identifiziert und der Durchmesser der WGA-FITC-gefärbten Kardiomyozyten mit der Analysesoftware Leica Q Win V3 (Leica Microsystems GmbH, Nussloch) bestimmt wurde. Verblindet wurden pro Gewebeschnitt randomisiert mindestens vier Herzen pro Gruppe, mit allen sichtbaren, im Querschnitt lokalisierten, Kardiomyozyten ausgewertet.

### **3.6.3 Immunfluoreszenz**

Die spezifische Färbung distinkter Zelltypen in rechtsventrikulärem Gewebe erfolgte mit Antikörpern gegen Tropomyosin (T2780, Sigma Aldrich, Steinheim) und DDR2 (sc-8989, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg). Gleichzeitig wurde in beiden Kombinationen ein Antikörper gegen NOS2 (Kat.-Nr. NB300-605, Novus Biologicals, Littleton, USA) eingesetzt. Freie Bindestellen wurden auf Gefriergewebeschnitten des rechten Ventrikels (5 µm) mit 5% Ziegenserum in 0,2% Tween-20 in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. An die Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper auf dem Gewebeschnitt schloss sich die Inkubation mit dem Zweitantikörper, welcher an ein Fluorochrom (Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 594, beide Invitrogen, Karlsruhe) gekoppelt war, an. Als Kontrolle diente ein Antikörper aus der gleichen Spezies in der identischen Verdünnung (IgG Isotypenkontrolle, Kat.-Nr. 3900, Cell signaling, Leiden, Niederlande) wie der eingesetzte NOS2 Antikörper.

Die Erfassung der Färbung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Keyence, Neu-Isenburg). Diese Färbungen wurden von Dr. Tatyana Novoyatleva durchgeführt.

### **3.7 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.7.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese**

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus rechtsventrikulärem Gewebe erfolgte nach Anleitung des *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen, Venlo, Niederlande). Dazu wurde Gewebe in RLT Lysispuffer, versetzt mit  $\beta$ -Mercaptoethanol, mechanisch homogenisiert (Precellys, Peqlab, Erlangen) und die Gesamt-RNA, tRNA, rRNA und mRNA, isoliert. Spektralphotometrisch wurde die RNA-Konzentration bestimmt (NanoDrop, Thermo Scientific, Rockford, USA) und jeweils 40 ng zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) eingesetzt. Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit dem *iScript cDNA Synthese Kit* (Biorad, München) nach Anleitung. Synthetisierte cDNA wurde fünffach in Wasser verdünnt und anschließend für Genexpressionsnachweise mittels quantitativer Echtzeit-PCR genutzt.

#### **3.7.2 Quantitative Echtzeit-PCR**

Die Expression ausgewählter Gene wurde mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*real-time* PCR) analysiert. Dazu wurden Oligonukleotide (*Primer*) mittels bioinformatischer Verfahren erstellt, die komplementär zur spezifischen mRNA-Sequenz des Zielgens sind (siehe Tab. 1) und dementsprechend in der PCR ein distinktes Amplikon mit definierter Länge bestehend aus der dazugehörigen cDNA-Sequenz vervielfältigen. Diese Reaktion erfolgte in Reaktionsgefäßen mit 2  $\mu$ l der fünffach-verdünnten cDNA. 1x iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, München) mit jeweils 300 nM der sequenzspezifischen Vorwärts (fw)- und Rückwärts (rv)-Primer in einem Mx3000P qPCR System (Agilent, Frankfurt am Main). Nach zehnminütiger initialer Denaturierung bei 95° C folgten 40 Zyklen mit jeweils 10 Sekunden Denaturierung bei 95° C gefolgt von Hybridisierung bei 59° C und Elongation bei 72° C. Abschließend wurde ein Dissoziationsprofil mit einer Minute bei 95° C, 30 Sekunden bei 55° C und progressiver Temperaturerhöhung alle 30 Sekunden bis zu 95° C erstellt. Zur Datenanalyse wurden die Amplifikations- und Dissoziationskurven analysiert. Zur Überprüfung der Primerspezifität wurde zusätzlich die Größe des finalen Amplikons in einer Agarose-Gelelektrophorese visualisiert. Zeitgleich zur Ziel-mRNA wurde die mRNA des Referenz-Gens PBGD (*porphobilinogen deaminase*) unter identischen Bedingungen

mitgemessen. Die erhaltenen Ct-Werte der Ziel-mRNAs wurden mit den Ct-Werten der Referenz-mRNA verrechnet und als  $\Delta$ Ct-Wert dargestellt, wobei der Ct-Wert der jeweiligen Ziel-mRNA vom Ct-Wert der PBGD-mRNA subtrahiert wurde.

**Tab. 1: Eingesetzte Primer für die Genexpressionsanalyse mittels Echtzeit-PCR**

Gen	Sequenz (5'-3')	Amplikonlänge
NOS1	fw- CTCTACCTTGGGCGATCCAG	208 bp
	rv- GAGCCCCAGGTCCTTAAACC	
NOS2	fw- GAGCAGGGCCACCTCTACAT	187 bp
	rv- TTGCCCCATAGGAAAAGACTG	
NOS3	fw- ACACAAGGCTGGAGGAGCTG	147 bp
	rv- TGGCATCTTCTCCCACACAG	
ANP	fw- AGTGCGGTGTCCAACACAGA	234 bp
	rv- TCTATCGGAGGGGTCCCAGG	
BNP	fw- TATCTGTCACCGCTGGGAGG	145 bp
	rv- GGCCTTGGTCCTTCAAGAGC	
$\beta$ MHC	fw- AGGCCTGGGCTTACCTCTCT	233 bp
	rv- TGACTTTGCCACCCTCTCGG	
Col1A1	fw- CCGGCTCCTGCTCCTCTTAG	122 bp
	rv- CCTCGGGTTTCCACGTCTCA	
Col3A1	fw- CCAGGAGCCAGTGGCCATAA	182 bp
	rv- GGGGCACCAGGAGAACCATT	
PBGD	fw- GGGAACCAGCTCTCTGAGGA	121 bp
	rv- GAATTCCTGCAGCTCATCCA	

### 3.8 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.8.1 Proteinisolation

Die Aufreinigung der Proteine aus rechtsventrikulärem Gewebe erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Homogenisierungs-Gerät Precellys (PepLab, Erlangen). Dazu wurde der rechte Ventrikel in RIPA-Puffer, versetzt mit 50 mM EDTA und einem Protease-Phosphatase-Inhibitor Cocktail (alle Thermo Scientific, Rockford, USA), homogenisiert. Im Anschluss an die mechanische Zerkleinerung wurde das Gewebe für weitere 30 Minuten bei 4° C chemisch aufgeschlossen und



darauffolgend bei 15000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, sodass der Überstand mit den enthaltenen Proteinen abgenommen werden konnte. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach dem Bicinchoninsäure-Prinzip nach Herstellerangaben (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, USA).

### 3.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen (Roti-Load 1, Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe) wurde rechtsventrikuläres Proteinlysate auf 3 µg/µl verdünnt, sodass mit 10 µl letztendlich 30 µg Gesamtprotein pro Tasche eines Polyacrylamidgels aufgetragen werden konnten. Im Anschluss an die Proteinseparation (100 V) bei Raumtemperatur erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Roti-NC, Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe) bei 100 V, 400 mA für eine Stunde unter durchnässten Bedingungen. Freie Antikörperbindungsstellen wurden daraufhin mit 5% Magermilchpulver (Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe) in TBS-T für 1,5 h bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4° C mit einem entsprechenden Erstantikörper (siehe Tab. 2), verdünnt in entweder 5% Milchpulver oder 5% BSA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) plus TBS-T Lösung inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran in TBS-T für jeweils 10 Minuten und eine anschließende Inkubation für 1,5 h bei Raumtemperatur in Milchpulver plus TBS-T Lösung mit einem der Spezies entsprechenden HRP-gekoppelten Zweitantikörper (Kat.-Nr. A8919, A9044 oder A9169, alle Sigma Aldrich, Steinheim). Im Anschluss an erneutes dreimaliges Waschen für 10 Minuten in TBS-T wurden die Membranen mit Entwicklerlösung (Super Signal West Femto, Thermo Scientific, Rockford, USA) benetzt und die Proteine in einer Entwicklermaschine (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) über Chemilumineszenz detektiert. Gegebenenfalls wurden die Antikörperbindungen entwickelter Membranen anschließend chemisch gelöst (30 Minuten bei Raumtemperatur in Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific, Rockford, USA) und erneut dreimal in TBS-T gewaschen sowie über Nacht bei 4° C mit Erstantikörper inkubiert.

**Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper**

Antigen	MW	Spezies	Verdünnung	Kat.-Nr.	Firma
NOS1	100 kDa	Ziege	1:1.000	AF2416	R&D
NOS2	130 kDa	Maus	1:500	610431	BD Bioscience
NOS3	150 kDa	Maus	1:1.000	610297	BD Bioscience
sGCβ1	75 kDa	Kaninchen	1:1.000	Ab154841	Abcam
Nitrotyrosin	Multiple	Maus	1:500	7048	Abcam
pan-Actin	45 kDa	Kaninchen	1:1.000	4968	Cell signaling

### 3.8.3 NOS2-Enzymaktivitätsmessung

Die Bestimmung der spezifischen NOS2-Enzymaktivität in rechtsventrikulärem Gewebehomogenisat erfolgte nach Anleitung des *ultrasensitive NOS Assay Kit* (Oxford Biomedical Research, Köln). Dazu wurden zunächst Proteine aus dem rechten Ventrikel in PBS mit 50 mM EDTA-Lösung (Thermo Scientific, Rockford, USA) und Protease-Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific, Rockford, USA) isoliert und die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend konnte durch Einsatz von 50 µg Gesamtprotein und 3 Stunden Inkubation bei 37° C in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> die spezifische NOS2-Enzymaktivität über eine Farbreaktion bestimmt werden. Die Farbreaktion detektiert die Konzentration der stabileren NO Reaktionsprodukte Nitrit und Nitrat. Die Kalkulation der Aktivität erfolgte in Relation zur optischen Dichte der Standardkurve.

### 3.8.4 NO-Konzentrationsbestimmung

Eine fluorometrische Bestimmung des NO Gehalts in rechtsventrikulärem Gewebe erfolgte mit Hilfe des *NO Fluorometric Assay Kit* (BioVison, Milpitas, USA). Für die Konzentrationsbestimmung wurde jeweils 10 mg Gewebe in 200 µl Assay Puffer, versetzt mit 50 mM EDTA-Lösung (Thermo Scientific, Rockford, USA) und Protease-Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific, Rockford, USA), mechanisch zerkleinert (Precellys, Peqlab, Erlangen), sodass 10 µl des unverdünnten Proteinlysats für die NO Bestimmung eingesetzt werden konnten. Der NO-Nachweis erfolgte indirekt über die Bestimmung der stabileren Reaktionsprodukte Nitrit und Nitrat. Die NO-Konzentration wurde in Relation zur mitgemessenen Standardkurve bestimmt.

### **3.9 ESR-Spektroskopie**

Im Rahmen dieser Studie wurde die ROS-Produktion im rechten Ventrikel mittels Elektronenspinresonanz (ESR) Spektroskopie nachgewiesen. Dazu wurde das Gewebe des rechten Ventrikels direkt nach Exsanguination der Tiere isoliert und jeweils in Präsenz von Methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH; 0,05 mM; Noxygen Science Transfer&Diagnostics GmbH, Elzach) homogenisiert sowie anschließend für 30 min bei 37° C in An- bzw. Abwesenheit des Enzyms Superoxid-Dismutase-1 (SOD1, 100 U/ml, Sigma Aldrich, Steinheim) inkubiert. Initial wurde Gewebe von Sham und PAB operierten Wildtyp-Tieren mit dem unspezifischen NOS-Inhibitor L-NNA (400 µM, Sigma Aldrich, Steinheim) inkubiert um die Beteiligung der NOS Isoenzyme an der ROS-Produktion zu untersuchen. Im weiteren Verlauf dieser Studie wurde Gewebe nach Sham- oder PAB- Operation sowohl von NOS2<sup>+/+</sup> als auch von NOS2<sup>-/-</sup> Tieren untersucht. Alle Proben, unabhängig von der Zusammensetzung der Inkubationslösung, wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufnahme der ESR-Spektren erfolgte bei 77° K mit einem MS100 ESR-Spektrometer (Magnettech, Berlin) und den folgenden Einstellungen: die Frequenz der Mikrowellen betrug 9,78 GHz, die Modulationsfrequenz 100 kHz, die Modulationsamplitude 5 x g und die Mikrowellenleistung 8 mW. Die Analyse der erhaltenen Spektren erfolgte über die Software Magnettech (Magnettech, Berlin). In jeder Probe wurde die Oxidation der Sonde durch Luftsauerstoff, auch Auto-Oxidation genannt, bestimmt. Gleichzeitig wurde der ROS-Anteil in Abwesenheit von SOD1 bestimmt. Die Differenz reflektiert den Gesamt-ROS Anteil in der Probe. Außerdem wurde der ROS-Anteil in Anwesenheit von SOD1 bestimmt, sodass die Differenz von Gesamt-ROS und ROS in Anwesenheit von SOD1 den Superoxidanteil abbildet. Freundlicherweise wurde die Probenaufarbeitung und Aufnahme der ESR-Spektren von Dr. Florian Veit durchgeführt.

### **3.10 Analyse primärer Zellen in Kultur**

#### **3.10.1 Isolation rechtsventrikulärer Fibroblasten**

Die Isolation kardialer Fibroblasten erfolgte aus 3-6 Herzen pro Gruppe, wie es bereits durch Novoyatleva und Mitarbeiter beschrieben wurde (171). Zusammengefasst, im Anschluss an die Präparation des rechten Ventrikels wurden Gewebestücke mehrerer Tiere zusammengeführt, mehrfach in eiskaltem PBS

## Material und Methoden

---

gewaschen, sodass anschließend über einen Verdau mit dem Enzym Liberase DH (Kat. Nr. 05401089001, Roche, Mannheim) die Zellen vereinzelt werden konnten. Die Separation der Zelltypen erfolgte über mehrere Zentrifugationsschritte bis final rechtsventrikuläre Fibroblasten in DMEM Medium (Kat.-Nr. E15-806, PAA, Cambridge, UK) mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin kultiviert werden konnten. Alle Experimente wurden mit Zellen der ersten oder zweiten Passage durchgeführt.

Die kultivierten Fibroblasten wurden im Anschluss an 24 Stunden unter Serum-freien Konditionen mit IL-1 $\beta$  (pharmakologisches Werkzeug zur Stimulation der NOS2) oder S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP, Kat.-Nr. N3398, Sigma Aldrich, Steinheim) in den jeweils angegebenen Konzentrationen für 72 Stunden stimuliert. Der spezifische NOS2-Inhibitor L-NIL (L-NIL Hydrochlorid, Kat.-Nr. 80310, Cayman, Ann Arbor, USA) wurde gegebenenfalls eine Stunde vor der Zellstimulation zum Medium hinzugefügt. L-Ascorbinsäure, ein essentieller Ko-Faktor für die Kollagensynthese, wurde nach der Stimulation täglich in einer Konzentration von 0,25 mM zum Medium hinzugegeben.

### 3.10.2 Kollagen-Bestimmung im Zellkulturmedium

Die Bestimmung des sezernierten Kollagenanteils im Zellkulturmedium erfolgte nach Anleitung des *Sircol Soluble Collagen Assay* nach Herstellerangaben (Biocolor Ltd, Carrickfergus, UK). 72 Stunden nach Stimulation der jeweiligen Zellen wurde Zellkulturmedium mit dem *Isolation & Concentration Reagent* über Nacht bei 4° C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Kollagen in der Probe spezifisch angefärbt und die Konzentration mittels Spektralphotometer im Vergleich zu einer Standardkurve bestimmt.

### 3.10.3 NO-Konzentrationsbestimmung im Zellkulturmedium

Die Bestimmung der NO-Konzentration im Zellkulturmedium erfolgte indirekt über die Bestimmung der Nitrit-Konzentration mittels *NO Fluorometric Assay Kit* nach Herstellerangaben (BioVison, Milpitas, USA). Dazu wurden jeweils 75 µl unverdünntes Medium bei einer Inkubationszeit von drei Stunden eingesetzt. Die Berechnung der finalen NO-Konzentration im Medium wurde im Vergleich zur mitgemessenen Standardkurve bestimmt.

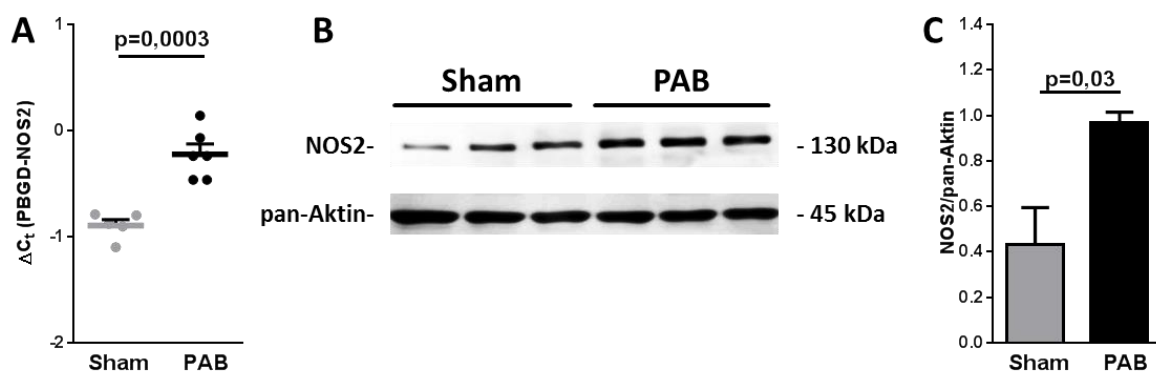
### **3.11 Statistische Auswertung**

Alle Daten werden als Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, kurz SEM) oder prozentualer Anteil angezeigt. Falls angemessen, wurden die erhobenen Daten mittels zweiseitigem t-Test der Mittelwerte oder als Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Newman-Keuls' Test statistisch ausgewertet. Signifikanz wurde für einen p-Wert kleiner als 0,05 festgelegt. Die Kalkulation erfolgte mit der GraphPad Prism 6 Software (La Jolla, CA, USA).

## 4. Ergebnisse

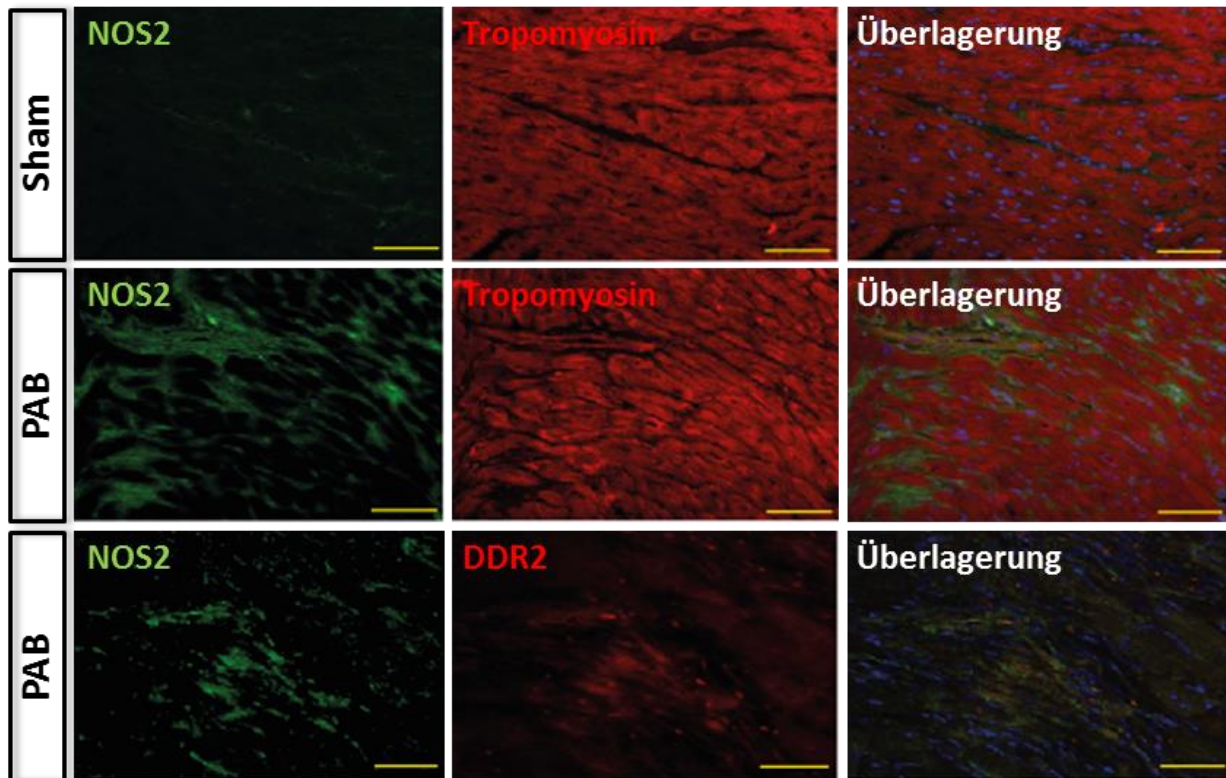
### 4.1 Expression, Lokalisation und Proteinaktivität von NOS2 im rechten Ventrikel

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nach der Rolle von NOS2 in der experimentellen Rechtsherzhypertrophie nachgegangen. Dazu wurde zunächst das Vorhandensein von NOS2 und dessen Regulation nach einer Pulmonalarterienstenose mittels Expressionsnachweisen im Gewebe und Lokalisationsuntersuchungen an histologischen Präparaten studiert.



**Abb. 6: Induktion der NOS2 Expression im drucküberladenen rechten Ventrikel** NOS2 mRNA-Expression im rechten Ventrikel von Sham- und PAB-operierten Wildtyp-Mäusen (A). Repräsentative Bilder nach NOS2 und pan-Aktin Western-Immunoblotting in rechtsventrikulärem Gewebelysat Sham- und PAB-operierter Tiere an Tag 21 (B). Densitometrische Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten (C).  $n=5-6$  Tiere pro Gruppe.

Die mRNA-Expression des NOS2-Gens wurde in rechtsventrikulärem Gewebelysat von Sham (Schein-) und PAB-operierten Wildtypmäusen mittels Echtzeit-PCR quantifiziert (siehe 3.7.2). 21 Tage nach chronischer Drucküberladung des rechten Ventrikels war die NOS2 mRNA-Expression im Vergleich zu Sham-operierten Kontrolltieren signifikant erhöht ( $p=0,0003$ ) (Abb. 6A). Zusätzlich konnte eine erhöhte Proteinexpression dieser NOS Isoform im kardialen Gewebe infolge von PAB detektiert werden (Abb. 6B). Die densitometrische Quantifizierung der detektierten Bandenintensitäten im Vergleich zur pan-Aktin-Ladekontrolle zeigte eine Verdopplung der NOS2 Proteinexpression im drucküberladenen rechten Ventrikel im Vergleich zu Sham-operierten Kontrolltieren ( $0,97 \pm 0,05$  versus  $0,43 \pm 0,16$ ;  $p=0,03$ ) (Abb. 6C).

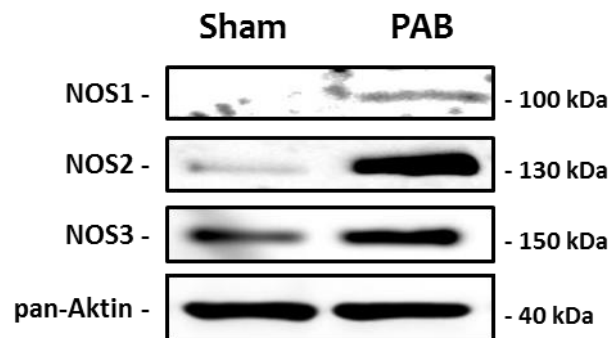


**Abb. 7: Lokalisation von NOS2 im Zytosol von Kardiomyozyten und Fibroblasten im rechten Ventrikel**

Lokalisation des NOS2-Proteins mittels immunhistologischer Färbung von rechtsventrikulären Gefrierschnitten. 21 Tage nach Sham- oder PAB-Operation wurde das NOS2-Protein (grün) im rechten Ventrikel mit Tropomyosin-positiven Kardiomyozyten (rot) ko-lokalisiert (**Oben** und **Mitte**). Ko-Lokalisation von NOS2 (grün) mit DDR2-positiven Fibroblasten (rot) nach PAB (**Unten**). Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau angefärbt. Maßstabsbalken = 50 µm.

Die Untersuchung zur Lokalisation des NOS2-Proteins erfolgte mittels immunhistologischer Färbungen von Gefrierschnitten aus rechtsventrikulärem Gewebe mit spezifischen Antikörpern gegen NOS2 sowie dem Kardiomyozyten-Marker Tropomyosin und dem Fibroblasten-Marker *Discoidin Domain Receptor 2* (DDR2). Zellkerne wurden über den DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau markiert (siehe 3.6.3). In Sham-operierten Tieren konnte an Tag 21 nach dem invasiven Eingriff eine basale Expression des NOS2 Proteins im Zytosol rechtsventrikulärer Zellen detektiert werden (Abb. 7). Die Überlagerung der NOS2-Färbung mit der Tropomyosin-Färbung identifizierte NOS2-exprimierende Zellen als Kardiomyozyten. Da aus der Literatur bekannt ist, dass im gesunden rechten Ventrikel der Anteil an kardialen Fibroblasten (zirka 25 %) (172, 173) im Vergleich zu den Kardiomyozyten geringer ist, wurde in der vorliegenden Arbeit auf einen

spezifischen Nachweis des NOS2-Proteins in Fibroblasten von Sham-operierten Tieren verzichtet. Infolge der chronischen Drucküberladung des rechten Ventrikels durch PAB war das NOS2-Signal in den Kardiomyozyten im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen erhöht. Zusätzlich visualisierte die NOS2-Färbung Zellen in fibrotischen Arealen, die mit dem kardialen Fibroblasten-Marker DDR2 gefärbt werden konnten. Dementsprechend liefern diese Befunde eine eindeutige Evidenz, dass NOS2 sowohl verstärkt im Zytosol von Kardiomyozyten als auch im Zytosol von kardialen Fibroblasten infolge von PAB exprimiert wird (Abb. 7).



**Abb. 8: Expression der NOS-Isoenzyme in isolierten rechtsventrikulären Fibroblasten**

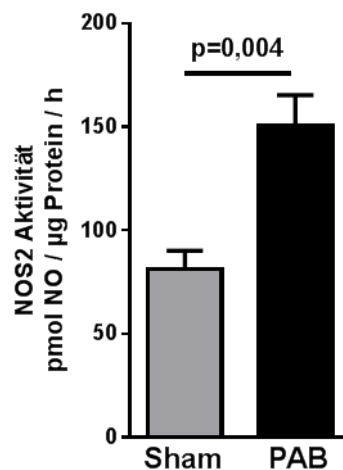
*Detektion der NOS-Expression in isolierten rechtsventrikulären Fibroblasten 21 Tage nach Sham- oder PAB-Operation mittels Western-Immunoblotting. n=3-6 Tiere pro Gruppe.*

Um die erhöhte NOS2-Expression in Fibroblasten aus dem rechten Ventrikel infolge von PAB zu bestätigen, wurde am Tag 21 nach Sham- oder PAB-Operation dieser Zelltyp selektiv aus Wildtyp-Mäusen isoliert (siehe 3.10.1) und die Proteinexpression aller drei NOS-Isoenzyme untersucht (vgl. 3.8.2). Da sich aus dem rechten Ventrikel einer einzelnen Maus, insbesondere aus Sham-operierten Tieren, nur eine sehr geringe Anzahl an primären kardialen Fibroblasten isolieren lässt, wurden die Zellen aus mehreren Mäusen den Gruppen entsprechend nach den Angaben unter 3.10.1 vereint. In den rechtsventrikulären Fibroblasten aus Sham-operierten Kontrolltieren konnte eine prominente Expression der NOS3-Isoform detektiert werden wohingegen sowohl NOS2 als auch NOS1 nur schwach exprimiert wurden (Abb. 8). Infolge von PAB erfolgte eine Erhöhung der NOS1-Expression im Vergleich zu den Zellen aus Sham-operierten Kontrolltieren. Zusätzlich induzierte PAB in den rechtsventrikulären Fibroblasten eine robuste Hochregulation des NOS2-Proteins, vergleichbar zu den Befunden aus der mRNA-Expressionsanalyse (Abb. 6) und den immunhistologischen Färbungen (Abb. 7). Gleichzeitig hatte diese Expressionsinduktion zur Folge, dass in



den Fibroblasten nach PAB die NOS2-Isoform im Vergleich zu den anderen beiden Isoenzymen am stärksten exprimiert wurde. Die NOS3-Isoform wurde in den Fibroblasten aus PAB-Tieren ebenfalls vermehrt exprimiert, im direkten Vergleich zu den anderen beiden Isoformen war der Faktor der Hochregulation jedoch geringer (Abb. 8).

Diese Beobachtungen bestätigen, dass NOS2 vermehrt in rechtsventrikulären Fibroblasten 21 Tage nach PAB exprimiert wird und liefern den Beweis, dass die Induktion der NOS-Expression und möglicherweise die Formation von NO in kardialen Fibroblasten eine funktionelle Rolle im chronisch überladenen rechten Ventrikel spielen.



**Abb. 9: NOS2-Enzymaktivität in rechtsventrikulärem Gewebekomogenisat**

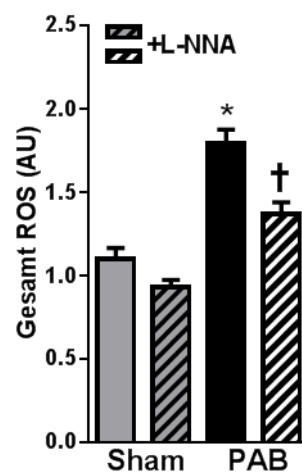
Die spezifische NOS2-Enzymaktivität wurde in rechtsventrikulärem Gewebekomogenisat 21 Tage nach Sham- oder PAB-Operation detektiert. Dazu wurde unter Kalzium-freien Bedingungen die Produktion von Nitrit und Nitrat gemessen.  $n=5$  Tiere pro Gruppe.

Zur Überprüfung der funktionellen NO-Produktion durch NOS2 in rechtsventrikulärem Gewebe nach Sham- oder PAB-Operation wurde dessen Enzymaktivität bestimmt (siehe 3.8.3). Da NOS2, aber nicht NOS1 oder NOS3,  $Ca^{2+}$ -unabhängig die Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO katalysiert, konnte in Anwesenheit des Chelators EDTA, welcher divalente Kationen wie  $Ca^{2+}$  bindet, die spezifische NOS2-Aktivität im Gewebe ermittelt werden. 21 Tage nach dem invasiven Eingriff, zeigten die Proben aus den Sham-operierten Tieren eine basale NOS2 Enzymaktivität von  $81,16 \pm 8,98$  pmol NO/ $\mu$ g Protein/h welche sich infolge einer PAB-Operation etwa verdoppelte ( $150,30 \pm 14,94$  pmol NO/ $\mu$ g Protein/h,  $p=0,004$  vs. Sham). Dementsprechend wird im

überladenen rechten Ventrikel zirka zweimal mehr NO durch das Enzym NOS2 synthetisiert als in den Sham-operierten Kontrollmäusen (Abb. 9).

#### 4.2 Effekt der NOS Inhibition auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im rechten Ventrikel

In diesem Versuch wurde untersucht, ob die NOS-Isoenzyme oder deren Reaktionsprodukt an der Formation reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) im rechten Ventrikel beteiligt sind. Dazu wurden die Auswirkungen einer unspezifischen NOS-Inhibition (via L-NNA) auf die ROS-Produktion in rechtsventrikulärem Gewebelysat 21 Tage nach Sham oder PAB-Operation mittels CMH-Sonden und anschließender ESR-Spektroskopie beobachtet (vgl. 3.9).



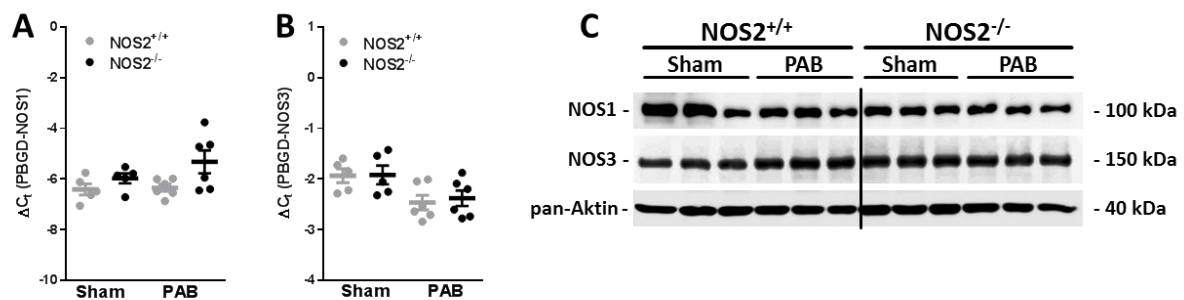
#### Abb. 10: Einfluss der unspezifischen NOS-Inhibition auf die ROS-Produktion im rechten Ventrikel

Die Bestimmung der Gesamt ROS-Formation im rechten Ventrikel erfolgte an Tag 21 nach Sham- oder PAB-Operation mittels Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie und CMH-Sonden in An- bzw. Abwesenheit des unspezifischen NOS-Inhibitors L-NNA.  $n=5-6$  Tiere pro Gruppe. \*:  $p<0,05$  vs. Sham; †:  $p<0,05$  vs. PAB.

Infolge der chronischen Drucküberladung des Ventrikels durch PAB stieg der gemessene Anteil an ROS im Vergleich zu Sham-operierten Kontrolltieren signifikant an ( $1,79\pm 0,08$  versus  $1,10\pm 0,06$ ,  $p<0,05$ ). Die unspezifische NOS-Inhibition hatte dabei in den Sham-operierten Kontrolltieren keinen Einfluss auf die ROS-Produktion ( $0,93\pm 0,04$  versus  $1,10\pm 0,06$ ;  $p>0,05$ ). Allerdings reduzierte die Zugabe von L-NNA die ROS-Formation im Gewebelysat der PAB-operierten Tiere signifikant ( $1,37\pm 0,07$  versus  $1,79\pm 0,08$ ;  $p<0,05$ ). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass eine NOS-Inhibition die ROS-Formation im überladenen rechten Ventrikel verringert (Abb. 10).

### 4.3 Expressionsanalyse der konstitutiv aktiven Isoenzyme NOS1 und NOS3

Um selektiv die Rolle der NOS2-Isoform in der Entwicklung der experimentell-induzierten rechtsventrikulären Hypertrophie zu untersuchen wurden Mäuse mit einer genetisch herbeigeführten NOS2-Defizienz ( $NOS2^{-/-}$ ) eingesetzt (siehe 3.1). Die Expression der konstitutiv aktiven NOS Isoformen, NOS1 und NOS3, wurde sowohl in  $NOS2^{+/+}$  als auch in  $NOS2^{-/-}$  Mäusen untersucht um eine Gegenregulation der funktionellen Isoenzyme und mögliche kompensatorische Effekte auszuschließen.



#### Abb. 11: Expression der konstitutiv aktiven NOS-Isoenzyme im rechten Ventrikel von $NOS2^{+/+}$ und $NOS2^{-/-}$ Mäusen

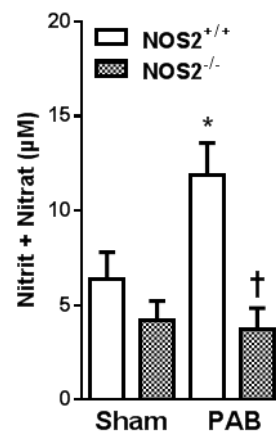
Sowohl in  $NOS2^{+/+}$  als auch in  $NOS2^{-/-}$  Mäusen wurde an Tag 21 nach Sham- oder PAB-Operation die mRNA- und Protein-Expression der konstitutiv aktiven NOS-Isoenzyme NOS1 und NOS3 detektiert. NOS1 (A) und NOS3 (B) mRNA-Expression. Repräsentative Western-Immunoblottings gegen NOS1 und NOS3 (C).  $n=5-6$  Tiere pro Gruppe.

Dabei konnte in  $NOS2^{+/+}$  Mäusen auf mRNA-Ebene keine signifikante Regulation von NOS1 oder NOS3 infolge von PAB detektiert werden. Allerdings zeigte die NOS3-Genexpression infolge von PAB die Tendenz einer leichten Expressionsverringering. Der  $NOS2^{-/-}$  Genotyp hatte im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren nach Sham oder PAB Operation keine Auswirkungen auf die Genexpression von NOS1 oder NOS3 (Abb. 11A+B).

Zusätzlich zeigte die Analyse der Proteinexpression in Wildtyp-Mäusen keine Veränderung nach chronischer Drucküberladung des rechten Ventrikels für NOS1 oder NOS3 (Abb. 11C). Des Weiteren konnten keine Auswirkungen des  $NOS2^{-/-}$  Genotyps auf die Proteinexpression der funktionellen Isoenzyme detektiert werden. Dementsprechend zeigen diese Beobachtungen, dass die genetisch erzeugte Funktionsunfähigkeit von NOS2 keine Gegenregulation der weiterhin funktionellen Isoenzyme NOS1 oder NOS3 zur Folge hat.

#### 4.4 Rolle der NOS2 in der Aufrechterhaltung der NO-Bioverfügbarkeit und Formation reaktiver Sauerstoffspezies

Die Bioverfügbarkeit von NO ist ein kritischer Regulator unterschiedlicher Signalwege (siehe 1.6). Um die Auswirkungen einer NOS2-Defizienz auf die NO-Bioverfügbarkeit und deren Signalweiterleitung zu untersuchen, wurde zunächst das Vorhandensein von NO und dessen Regulation infolge von PAB in rechtsventrikulärem Gewebe untersucht. Dazu wurde an Tag 21 nach dem jeweiligen operativen Eingriff die Nitrit- und Nitrat-Konzentration im rechten Ventrikel bestimmt (vgl. 3.8.4).



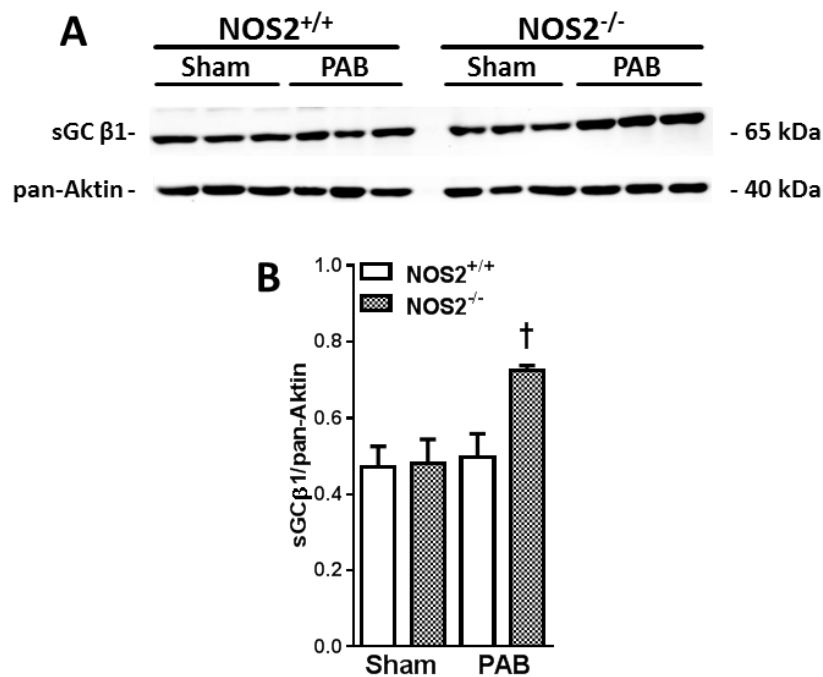
#### Abb. 12: Nitrit und Nitrat Konzentrationen im rechten Ventrikel

Die Detektion der stabileren NO-Reaktionsprodukte Nitrit und Nitrat erfolgte in rechtsventrikulärem Gewebelysate von Sham- und PAB-operierten NOS2<sup>+/+</sup> und NOS2<sup>-/-</sup> Tieren an Tag 21.  $n=4-6$  Tiere pro Gruppe. \*:  $p<0,05$  vs. Sham; †:  $p<0,05$  vs. NOS2<sup>+/+</sup>.

In Wildtyp-Mäusen induzierte PAB einen robusten Konzentrationsanstieg im Vergleich zu Sham operierten Kontrolltieren ( $11,88 \pm 1,69 \mu\text{M}$  versus  $6,36 \pm 2,90 \mu\text{M}$ ,  $p<0,05$ ). Die basale Nitrit- und Nitrat-Konzentration in NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen war nach Sham-Operation vergleichbar zu der in Sham-operierten Wildtyp-Tieren ( $4,20 \pm 1,03 \mu\text{M}$  versus  $6,36 \pm 2,90 \mu\text{M}$ ;  $p>0,05$ ). Allerdings blieb der Anstieg der Konzentration infolge von PAB an Tag 21 in den NOS2<sup>-/-</sup> Tieren aus ( $4,90 \pm 1,48 \mu\text{M}$  versus  $11,88 \pm 1,69 \mu\text{M}$ ;  $p<0,05$ ), sodass letztendlich die NOS2-Funktionsunfähigkeit eine Erhöhung der Nitrit- und Nitrat-Spiegel und damit der NO-Bioverfügbarkeit im überladenen rechten Ventrikel in seinem Ausmaß beschränkt (Abb. 12).

Die NO-Signalweiterleitung in der Zelle erfolgt unter anderem über die  $\beta 1$ -Untereinheit der sGC (siehe 1.6). In der Promotorregion dieser Untereinheit ist eine Häm-NO/Sauerstoff (H-NOX) Domäne lokalisiert, welche über NO-Bindung

dessen Bioverfügbarkeit detektiert und die Expression der Untereinheit reguliert (174). Um das Vorhandensein dieses NO-Rezeptors nachzuweisen und dessen Regulation in Zusammenhang mit der NO-Bioverfügbarkeit zu detektieren, wurde die Proteinexpression der sGC $\beta$ 1-Untereinheit in rechtsventrikulärem Gewebelysat von NOS2<sup>+/+</sup> und NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen nach Sham- oder PAB-Operation untersucht (siehe 3.8.2).

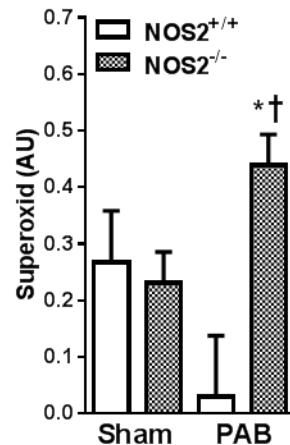


### Abb. 13: Nachweis der sGC $\beta$ 1-Proteinexpression im rechten Ventrikel

Die Proteinexpression der sGC $\beta$ 1-Untereinheit wurde im rechten Ventrikel an Tag 21 nach Sham- oder PAB-Operation mittels Western-Immunoblotting in NOS2<sup>+/+</sup> und NOS2<sup>-/-</sup> Tieren untersucht. Repräsentative Western-Immunoblots (A). Densitometrische Quantifizierung der sGC $\beta$ 1-Expression (B). n=3 Tiere pro Gruppe, †: p<0,05 vs. NOS2<sup>+/+</sup>.

In Wildtyp- und NOS2-defizienten Mäusen konnte die Expression der sGC $\beta$ 1-Untereinheit nachgewiesen werden und in NOS2<sup>+/+</sup> Tieren hatte die experimentelle Drucküberladung des rechten Ventrikels keinen Einfluss auf die sGC $\beta$ 1-Expression (0,47±0,05 versus 0,50±0,06; p>0,05). Im Gegensatz dazu war die Expression in NOS2<sup>-/-</sup> Tieren infolge von PAB im Vergleich zu Sham-operierten Mäusen signifikant erhöht (0,72±0,01 versus 0,48±0,06; p<0,05). Dementsprechend erhöhte PAB die sGC $\beta$ 1-Expression exklusiv in den NOS2<sup>-/-</sup> Tieren (0,72±0,01 versus 0,50±0,06 p<0,05). Diese Beobachtungen beweisen, dass die verringerte NO-Bioverfügbarkeit im rechten Ventrikel der NOS2<sup>-/-</sup> Tiere in einer kompensatorischen Hochregulation der sGC $\beta$ 1-Untereinheit resultiert (Abb. 13).

Unabhängig von der NO-Signalweiterleitung über die sGC, kann das NO-Radikal unter oxidativen Bedingungen lokal mit dem Superoxid Anion ( $O_2^-$ ) reagieren und so Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) bilden (siehe auch 1.8). In diesem Versuch wurde der Einfluss des NOS2-Funktionsverlusts auf die Produktion von Superoxid und die Formation von Peroxynitrit im rechten Ventrikel untersucht (vgl. 3.9).



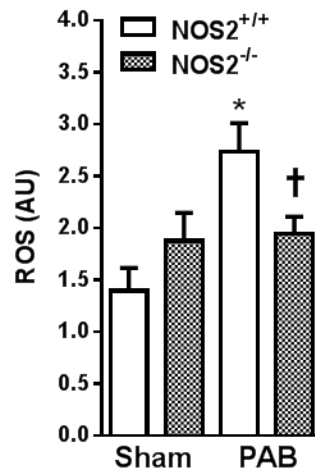
#### Abb. 14: Detektion der Superoxid-Produktion im rechten Ventrikel

Die Superoxid-Produktion wurde im rechten Ventrikel von Sham- und PAB-operierten NOS2<sup>+/+</sup> und NOS2<sup>-/-</sup> Tieren an Tag 21 mittels ESR-Spektroskopie und CMH-Sonden als SOD1-inhibierbarer Anteil detektiert.  $n=5$  Tiere pro Gruppe. \*:  $p<0,05$  vs. Sham, †:  $p<0,05$  vs. NOS2<sup>+/+</sup>.

Infolge von PAB wurde im rechten Ventrikel von Wildtyp-Mäusen keine signifikante Veränderung im Superoxid-Anteil im Vergleich zu Sham-operierten Kontrolltieren detektiert ( $0,03 \pm 0,10$  versus  $0,27 \pm 0,09$ ;  $p<0,05$ ). Allerdings zeigten PAB-operierte Tiere eine Tendenz zu einer geringeren Superoxid-Präsenz. In den NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen hatte die 21-tägige Drucküberladung eine signifikante Erhöhung der Superoxid-Produktion zur Folge ( $0,44 \pm 0,05$  versus  $0,23 \pm 0,05$ ;  $p<0,05$ ). Dementsprechend demonstrierte der Vergleich von NOS2<sup>+/+</sup> und NOS2<sup>-/-</sup> Tieren, dass infolge von PAB signifikant mehr Superoxid im drucküberladenen rechten Ventrikel der Tiere mit funktionsunfähiger NOS2 gebildet wurde ( $0,44 \pm 0,05$  versus  $0,03 \pm 0,10$ ;  $p<0,05$ ) (Abb. 14).

Zusätzlich wurde infolge von PAB in NOS2<sup>+/+</sup> Mäusen ein signifikanter Anstieg der ROS Formation gemessen ( $2,73 \pm 0,28$  versus  $1,40 \pm 0,22$ ,  $p<0,05$ ). Im Vergleich dazu wurde im rechten Ventrikel der NOS2<sup>-/-</sup> Tiere keine Veränderung der ROS-Formation infolge der chronische Drucküberladung detektiert ( $1,95 \pm 0,16$  versus  $1,88 \pm 0,27$ ,  $p>0,05$ ). Dementsprechend war die ROS-Formation im rechten Ventrikel nach PAB

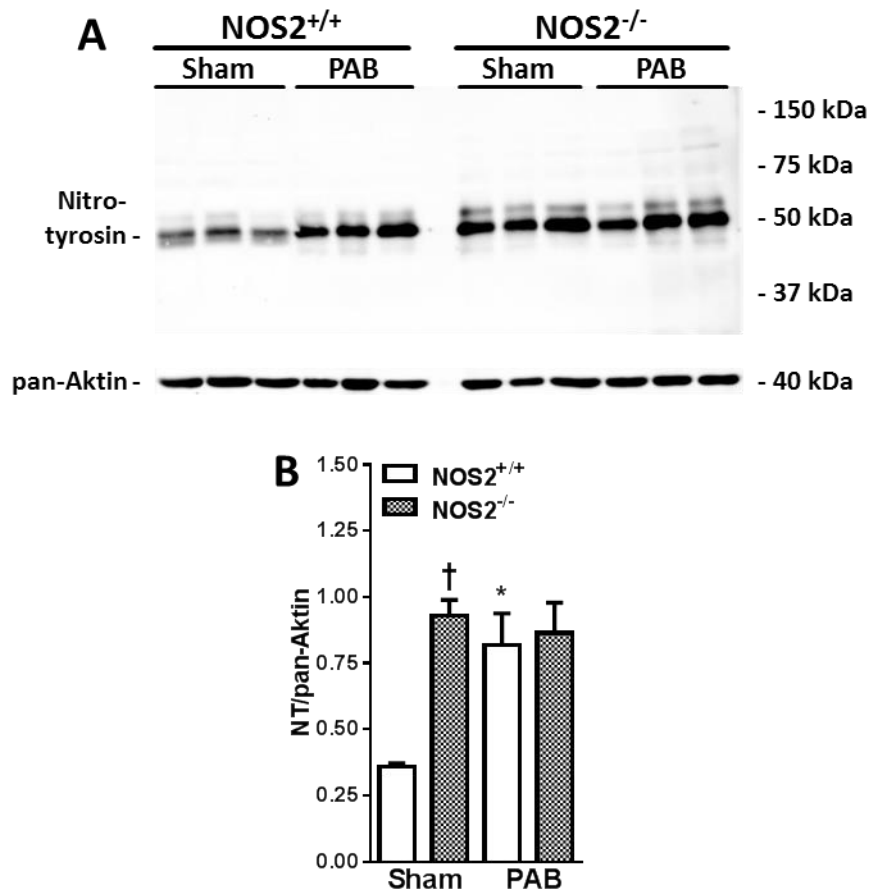
in den Wildtyp-Tieren signifikant höher als in den Tieren mit defizienter NOS2 ( $1,95 \pm 0,16$  versus  $2,73 \pm 0,28$ ,  $p < 0,05$ ) (Abb. 15). Dieser Versuch liefert Hinweise, dass im drucküberladenen rechten Ventrikel von  $\text{NOS2}^{-/-}$  Tieren vermehrt Superoxid und gleichzeitig weniger NO im Vergleich zu Wildtyp-Tieren präsent ist, was wiederum in einer verringerten Peroxynitrit-Bildung resultiert.



**Abb. 15: Detektion der ROS-Formation im rechten Ventrikel**

Die Detektion der ROS-Formation im rechten Ventrikel erfolgte mittels ESR-Spektroskopie und CMH-Sonden in Sham- und PAB-operierten  $\text{NOS2}^{+/+}$  und  $\text{NOS2}^{-/-}$  Mäusen.  $n=5$  Tiere pro Gruppe. \*:  $p < 0,05$  vs. Sham, †:  $p < 0,05$  vs.  $\text{NOS2}^{+/+}$ .

Zusätzlich zu der indirekten spektroskopischen Detektion kann Peroxynitrit ebenfalls indirekt über Nitrierung einzelner Tyrosin-Residuen an Proteinen nachgewiesen werden (vgl. 3.8.2).



### Abb. 16: Detektion der nitrotyrosinolierten Proteine im rechten Ventrikel

Die Formation von Peroxynitrit im rechten Ventrikel wurde über den Nachweis nitrotyrosinolierter Proteine mittels Western-Immunoblotting bestimmt. Repräsentativer Immunoblot (A). Densitometrische Quantifizierung der 50 kDa-Bande (B) an Tag 21 nach Sham- oder PAB-Operation.  $n=3$  Tiere pro Gruppe. \*:  $p < 0,05$  vs. Sham, †:  $p < 0,05$  vs. NOS2<sup>+/+</sup>.

Die Visualisierung der Nitrotyrosinolierungen identifizierte Proteinbanden bei einer Größe von zirka 50 kDa und 60 kDa. Dabei konnte in NOS2<sup>+/+</sup> Mäusen eine erhöhte Expression der 50 kDa Bande nach chronischer Drucküberladung im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden ( $0,36 \pm 0,01$  versus  $0,82 \pm 0,12$ ;  $p < 0,05$ ). Im NOS2<sup>-/-</sup> Genotyp hatte die chronische Drucküberladung des rechten Ventrikels keine Auswirkung auf die Bandenintensität der 50 kDa Nitrotyrosinbande ( $0,93 \pm 0,06$  versus  $0,86 \pm 0,12$ ;  $p > 0,05$ ). Allerdings wurde in den NOS2-defizienten Mäusen eine Bande bei einer Höhe von zirka 60 kDa sichtbar, welche im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eine erhöhte Intensität zeigte. Zusätzlich konnte bereits in Sham-operierten NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen eine erhöhte Bandenintensität im Vergleich zu den Wildtypen beobachtet werden ( $0,36 \pm 0,01$  versus  $0,93 \pm 0,06$ ;  $p < 0,05$ ). Infolge von PAB waren die



Bandenintensitäten in beiden Genotypen miteinander vergleichbar ( $0,82 \pm 0,12$  versus  $0,86 \pm 0,12$ ;  $p > 0,05$ ) (Abb. 16). Demnach weisen diese Ergebnisse auf eine erhöhte Formation von Peroxynitrit im rechten Ventrikel von Wildtyp-Mäusen unter Stressbedingungen hin und zeigen eine erhöhte Formation dieses Radikals unter basalen Konditionen in Tieren mit einer gezielten NOS2-Funktionsdefizienz.

#### 4.5 Einfluss von NOS2 auf die kardiale Funktion

Die funktionellen Konsequenzen der genetisch-induzierten NOS2-Defizienz auf die kardiale Funktion wurden *in vivo* mittels nicht-invasiver Bildgebung gefolgt von invasiven intra-kardialen hämodynamischen Untersuchung analysiert (vgl. 3.4 und 3.5). Dabei hatte die chronische Drucküberladung des rechten Ventrikels in allen Gruppen keine Auswirkungen auf das Körpergewicht der Tiere ( $25,3 \pm 0,5$  g versus  $26,3 \pm 0,7$  g in Wildtypen und  $27,1 \pm 0,5$  g versus  $27,5 \pm 0,6$  g in NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen), resultierte aber unabhängig vom Genotyp in einem signifikant erhöhten Quotienten von rechten Ventrikel zu Körpergewicht ( $1,11 \pm 0,05$  mg/g versus  $0,66 \pm 0,02$  mg/g in NOS2<sup>+/+</sup> und  $1,08 \pm 0,07$  mg/g versus  $0,72 \pm 0,02$  mg/g in NOS2<sup>-/-</sup> Tieren) und rechten Ventrikel zu linken Ventrikel plus Septum (Wildtyp:  $0,40 \pm 0,02$  versus  $0,20 \pm 0,01$ ; NOS2<sup>-/-</sup>:  $0,36 \pm 0,02$  versus  $0,23 \pm 0,01$ ) im Vergleich zu den Sham-operierten Kontrolltieren (siehe Tab. 3).

Bildgebende echokardiographische Untersuchungen identifizierten einen vergrößerten internen end-diastolischen rechtsventrikulären Durchmesser (RVID;  $2,09 \pm 0,07$  mm versus  $1,61 \pm 0,04$  mm in NOS2<sup>+/+</sup> und  $2,07 \pm 0,10$  mm versus  $1,64 \pm 0,04$  mm in NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen), eine Verdickung der rechtsventrikulären freien Wand in der End-Diastole (NOS2<sup>+/+</sup>:  $0,54 \pm 0,03$  mm versus  $0,29 \pm 0,01$  mm; NOS2<sup>-/-</sup>:  $0,55 \pm 0,04$  mm versus  $0,31 \pm 0,01$  mm) sowie eine verringerte systolische Auslenkung des Trikuspidalklappenannulus ( $1,01 \pm 0,05$  mm versus  $1,46 \pm 0,02$  mm in Wildtyp-Tieren und  $1,09 \pm 0,03$  mm versus  $1,50 \pm 0,03$  mm in NOS2 defizienten Tieren), 21 Tage nach PAB Operation. Alle genannten Messparameter waren dabei unabhängig vom Genotyp. Zusätzlich war die kardiale Auswurfleistung im Bezug zum Körpergewicht (CI) sowohl in NOS2<sup>+/+</sup> ( $0,39 \pm 0,02$  ml·min<sup>-1</sup>·BW versus  $0,52 \pm 0,02$  ml·min<sup>-1</sup>·BW) als auch in NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen ( $0,40 \pm 0,01$  ml·min<sup>-1</sup>·BW versus  $0,53 \pm 0,02$  ml·min<sup>-1</sup>·BW) infolge von PAB verringert. Der myokardiale Funktionsindex (MPI) war sowohl in NOS2<sup>+/+</sup> ( $0,39 \pm 0,02$  versus  $0,66 \pm 0,04$ ) als auch in NOS2<sup>-/-</sup> ( $0,40 \pm 0,01$  versus  $0,60 \pm 0,03$ ) Tieren nach 21-tägiger Drucküberladung reduziert. Des Weiteren

## Ergebnisse

beeinträchtigte PAB die Zeit der isovolumischen Relaxation normiert zum RR Intervall des Elektrokardiogramms (NOS2<sup>+/+</sup>: 17,28±0,86 % versus 12,13±0,68 %; NOS2<sup>-/-</sup>: 18,44±1,21 % versus 12,37±0,77 %) - unabhängig vom Genotyp (siehe Tab. 3).

**Tab. 3: Echokardiografische und hämodynamische Auswertung**

	NOS2 <sup>+/+</sup>		NOS2 <sup>-/-</sup>	
	<i>Sham</i>	<i>PAB</i>	<i>Sham</i>	<i>PAB</i>
n, Anzahl	10	11	11	11
Körpergewicht, g	26,3±0,7	25,3±0,5	27,5±0,6	27,1±0,5
RV/BW, mg/g	0,66±0,02	1,11±0,05*	0,72±0,02	1,08±0,07*
RV/(LV+S)	0,20±0,01	0,40±0,02*	0,23±0,01	0,36±0,02*
<b>Echokardiographie</b>				
RVIDd, mm	1,61±0,04	2,09±0,07*	1,64±0,04	2,07±0,10*
RVWTd, mm	0,29±0,01	0,54±0,03*	0,31±0,01	0,55±0,04*
TAPSE, mm	1,46±0,02	1,01±0,05*	1,50±0,03	1,09±0,03*
CI, ml·min <sup>-1</sup> ·BW <sup>-1</sup>	0,52±0,02	0,39±0,02*	0,53±0,02	0,40±0,01*
MPI, Tei index	0,66±0,04	0,98±0,04*	0,60±0,03	0,99±0,07*
IVRT/RR, %	12,13±0,68	17,28±0,86*	12,37±0,77	18,44±1,21*
<b>Hämodynamik</b>				
Herzfrequenz, bpm	454±8	469±7	471±15	497±14
RVSP, mmHg	24,78±1,08	48,10±1,48*	23,89±0,54	46,45±1,48*
RVDP, mmHg	0,88±0,29	3,28±0,47*	1,01±0,27	2,91±0,42*
SBPsys, mmHg	72,0±5,0	70,8±2,1	76,8±2,7	73,0±3,3
LVSP, mmHg	77,3±6,1	78,4±3,0	79,6±1,4	78,1±2,9
<b>IVC Manöver</b>				
n, Anzahl	5	6	5	6
Ea, mmHg·μl <sup>-1</sup>	0,77±0,08	2,44±0,31*	0,97±0,10	2,94±0,59*
Ees, mmHg·μl <sup>-1</sup>	0,53±0,05	1,49±0,18*	0,59±0,05	1,61±0,20*
Ees/Ea	0,71±0,08	0,61±0,03	0,62±0,04	0,59±0,07

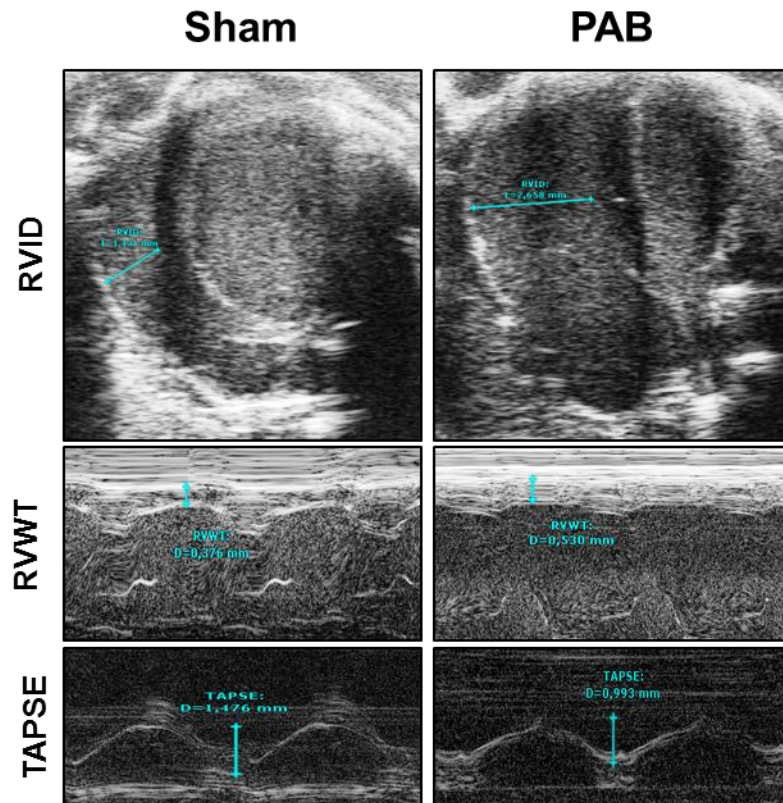
\*: p<0,05 vs. Sham

## Ergebnisse

---

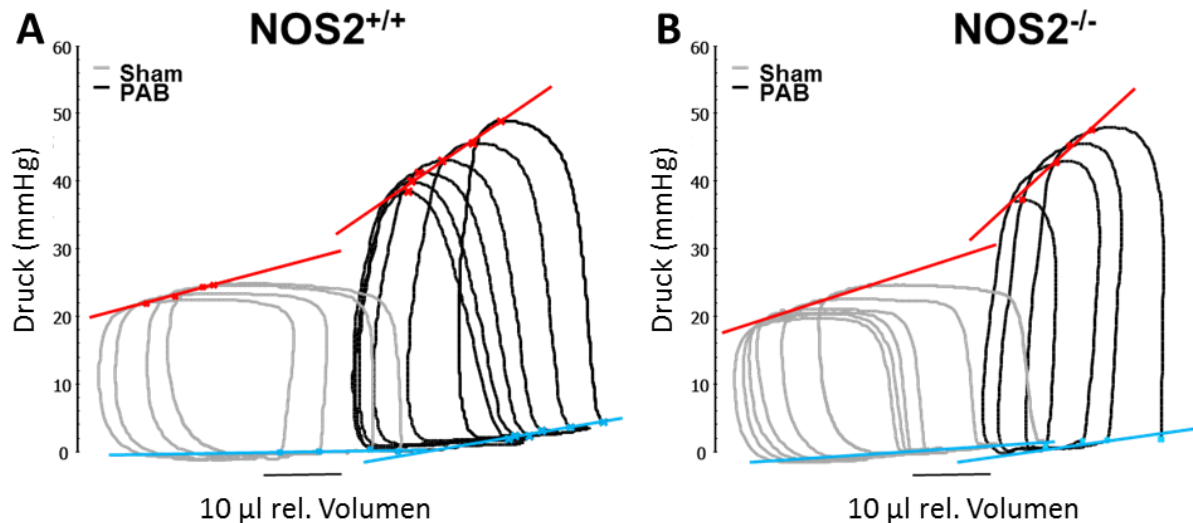
Intra-kardiale Messungen ergaben in allen Versuchsgruppen vergleichbare Herzfrequenzen am Tag 21 nach PAB-Operation im Vergleich zu Sham-operierten Tieren ( $469 \pm 7$  bpm versus  $454 \pm 8$  bpm in  $\text{NOS2}^{+/+}$  und  $497 \pm 14$  bpm versus  $471 \pm 15$  bpm in  $\text{NOS2}^{-/-}$  Mäusen) (vgl. Tab. 3). Die chronische Konstriktion der Pulmonalarterie resultierte in einem merklichen Anstieg des rechtsventrikulären end-systolischen ( $\text{NOS2}^{+/+}$ :  $48,1 \pm 1,5$  mmHg versus  $27,8 \pm 1,1$  mmHg;  $\text{NOS2}^{-/-}$ :  $46,5 \pm 1,5$  mmHg versus  $23,9 \pm 0,5$  mmHg) und end-diastolischen Drucks ( $\text{NOS2}^{+/+}$ :  $3,3 \pm 0,5$  mmHg versus  $0,9 \pm 0,3$  mmHg;  $\text{NOS2}^{-/-}$ :  $2,9 \pm 0,4$  mmHg versus  $1,0 \pm 0,3$  mmHg) - unabhängig vom Genotyp. Gleichzeitig hatte die Blutdruckerhöhung im rechten Ventrikel keinen Einfluss auf den systemisch-arteriellen Blutdruck ( $\text{NOS2}^{+/+}$ :  $70,8 \pm 2,1$  mmHg versus  $72,0 \pm 5,0$  mmHg;  $\text{NOS2}^{-/-}$ :  $73,0 \pm 3,3$  mmHg versus  $76,8 \pm 2,7$  mmHg) oder auf den Blutdruck im linken Ventrikel ( $78,4 \pm 3,0$  mmHg versus  $77,3 \pm 6,1$  mmHg in Wildtyp und  $78,1 \pm 2,9$  mmHg versus  $79,6 \pm 1,4$  mmHg in  $\text{NOS2}^{-/-}$  Tieren) (siehe Tab. 3).

Nachlast-unabhängige Parameter der kardialen Funktion wurden aus Druck-Volumen-Schleifen während einer experimentellen Veränderung des venösen Rückfluss durch Okklusion der *Vena cava inferior* (IVC) ermittelt (siehe 3.5). Die arterielle Elastizität ( $E_a$ ) war infolge von PAB unabhängig vom Genotyp nach 21 Tagen signifikant um zirka das Dreifache erhöht ( $2,44 \pm 0,31$  mmHg/ $\mu$ l versus  $0,77 \pm 0,08$  mmHg/ $\mu$ l in  $\text{NOS2}^{+/+}$  Mäusen und  $2,94 \pm 0,59$  mmHg/ $\mu$ l versus  $0,97 \pm 0,10$  mmHg/ $\mu$ l in  $\text{NOS2}^{-/-}$  Mäusen) (vgl. Tab. 3). Diese Veränderung wurde von einem robusten zirka dreifachen Anstieg der end-systolischen Elastizität ( $E_{es}$ ) in beiden Genotypen begleitet ( $1,49 \pm 0,18$  mmHg/ $\mu$ l versus  $0,53 \pm 0,05$  mmHg/ $\mu$ l in Wildtypen und  $1,61 \pm 0,20$  mmHg/ $\mu$ l versus  $0,59 \pm 0,05$  mmHg/ $\mu$ l in  $\text{NOS2}^{-/-}$  Tieren). Dementsprechend war die ventrikuläre-arterielle Kopplung ( $E_{es}/E_a$ ) infolge von PAB zwar tendenziell aber nicht statistisch signifikant reduziert ( $\text{NOS2}^{+/+}$ :  $0,61 \pm 0,03$  versus  $0,71 \pm 0,08$ ;  $\text{NOS2}^{-/-}$ :  $0,59 \pm 0,07$  versus  $0,62 \pm 0,04$ ). In allen in dieser Arbeit betrachteten physiologischen Parametern konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den PAB-operierten  $\text{NOS2}^{+/+}$  und  $\text{NOS2}^{-/-}$  Mäusen ermittelt werden, sodass diese Resultate darauf hindeuten, dass eine globale  $\text{NOS2}$  Defizienz sowohl basal, als auch nach chronischer Drucküberladung, keine Konsequenzen für die kardiale Funktion drei Wochen nach PAB hat (siehe Tab. 3).



### Abb. 17: Repräsentative echokardiographische Aufnahmen und Kalkulationen

Die kardiale Funktion aller Tiere wurde nicht-invasiv mittels echokardiographischer Bildgebung evaluiert. In dieser Abbildung sind repräsentative transthorakaler Ultraschalluntersuchungen illustriert, welche die pathologischen Veränderungen infolge von chronischer Drucküberladung durch PAB visualisiert. Im Vier-Kammern Blick ist deutlich sichtbar, dass der interne rechtsventrikuläre Durchmesser (**RVID**) infolge von PAB merklich erhöht ist, was ebenfalls durch die eingezeichneten Pfeile visualisiert wird. Des Weiteren demonstrieren Messungen der rechtsventrikulären Wanddicke (**RVWT**) eine signifikante Hypertrophie des rechten Ventrikels im Vergleich zu Sham-operierten Kontrolltieren. Die Auslenkung des Trikuspidalklappenannulus (**TAPSE**), ein Parameter der mit der rechtsventrikulären Funktion korreliert, zeigt eine signifikante Beeinträchtigung der rechtsventrikulären Funktion infolge von PAB.

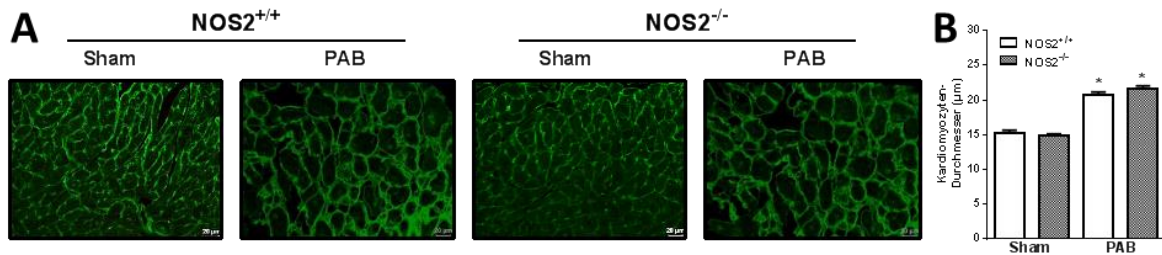


### Abb. 18: Repräsentative intra-kardiale Druck-Volumen-Messungen

Repräsentative intra-kardiale Druck-Volumen-Schleifen im rechten Ventrikel von Sham- und PAB-operierten Mäusen illustrieren charakteristische rechtsventrikuläre Parameter. Sowohl in  $NOS2^{+/+}$  als auch in  $NOS2^{-/-}$  Tieren induzierte die Konstriktion der Pulmonalarterie einen Anstieg des end-systolischen und end-diastolischen rechtsventrikulären Druckes. Zusätzlich war das Schlagvolumen verringert und die ventrikuläre Füllung erhöht. Die Bestimmung der myokardialen Kontraktilität als Steigung der Geraden durch die end-systolischen Druckpunkte während einer Veränderung des venösen Blutrückflusses über Konstriktion der inferior vena cava (IVC) verdeutlicht hier repräsentativ die hyper-Kontraktilität des rechten Ventrikels nach PAB im Vergleich zu Sham operierten Tieren in  $NOS2^{+/+}$  und  $NOS2^{-/-}$  Mäusen (Steigung der eingezeichneten roten Verbindungslinie). Innerhalb der Gruppen konnte kein Unterschied in der rechtsventrikulären Funktion zwischen den Genotypen sowohl nach Sham- als auch nach PAB-Operation detektiert werden.

#### 4.6 Rolle der NOS2 in der myokardialen Umstrukturierung

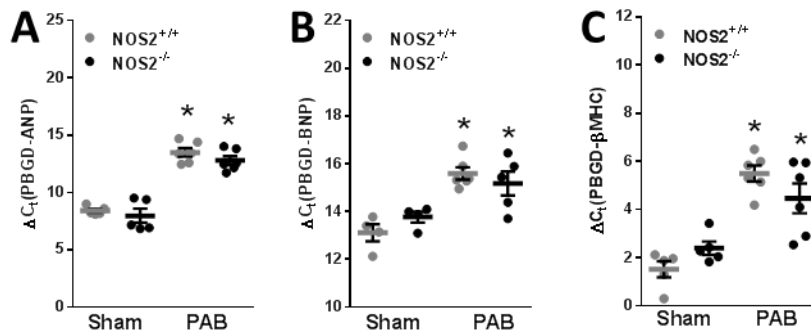
Die Umstrukturierung myokardialen Gewebes wurde in Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten von  $NOS2^{+/+}$  und  $NOS2^{-/-}$  Mäusen jeweils nach Sham- oder PAB-Operation untersucht (vgl. 3.6). Da die Expression der NOS2 sowohl in Kardiomyozyten als auch in rechtsventrikulären Fibroblasten nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 7), wurden die Auswirkungen der NOS2-Defizienz auf die Kardiomyozyten-Hypertrophie (siehe 3.6.2) und auf die myokardiale Fibrose (siehe 3.6.1) untersucht. Dementsprechend wurde zunächst am Tag 21 nach chronischer Drucküberladung des rechten Ventrikels durch PAB der Durchmesser der Kardiomyozyten im Querschnitt quantifiziert.



### Abb. 19: Quantifizierung der Kardiomyozyten-Durchmesser im rechten Ventrikel

Die Bestimmung der zellulären Hypertrophie erfolgte über die Quantifizierung des Kardiomyozyten-Durchmessers in Gewebeschnitten von Sham- oder PAB-operierten  $NOS2^{+/+}$  und  $NOS2^{-/-}$  Tieren. Repräsentative Aufnahmen (A). Quantifizierung des Kardiomyozyten-Durchmessers (B).  $n=4-5$  Tiere pro Gruppe. \*:  $p < 0,05$  vs. Sham

Infolge von PAB vergrößerte sich der durchschnittliche Durchmesser der Zellen in Wildtyp-Tieren ( $20,67 \pm 0,46 \mu\text{m}$  versus  $15,24 \pm 0,41 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ) und in  $NOS2$ -defizienten Mäusen ( $21,55 \pm 0,47 \mu\text{m}$  versus  $14,88 \pm 0,24 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den Sham-operierten Kontrollen signifikant. Der  $NOS2^{-/-}$  Genotyp hatte dabei keine Auswirkung auf die Größenzunahme der Kardiomyozyten nach PAB ( $21,55 \pm 0,47 \mu\text{m}$  versus  $20,67 \pm 0,46 \mu\text{m}$ ;  $p > 0,05$ ) (Abb. 19).

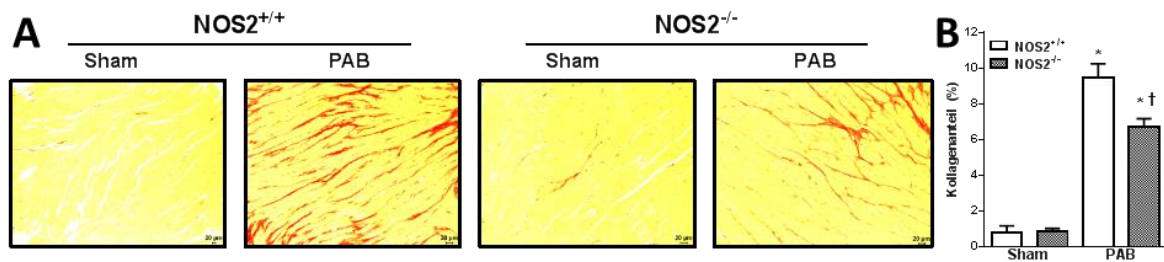


### Abb. 20: Expressionsnachweise ausgewählter Herzinsuffizienz-Markergene

mRNA-Expressionsanalysen ausgewählter Herzinsuffizienz-Markergene in rechtsventrikulärem Gewebekomogenisat von Sham- und PAB-operierten  $NOS2^{+/+}$  und  $NOS2^{-/-}$  Tieren. Natriuretisches Peptid Typ A (ANP, A), Natriuretisches Peptid Typ B (BNP, B), schwere  $\beta$  Myosinkette ( $\beta\text{MHC}$ , C).  $n=5-6$  Tiere pro Gruppe, \*:  $p < 0,05$

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression ausgewählter Herzinsuffizienz-Markergene im rechten Ventrikel mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht (siehe auch 39). Die Expression des natriuretischen Peptids Typ A (ANP) und Typ B (BNP) sowie der schweren Myosinkette  $\beta$  ( $\beta\text{MHC}$ ) war infolge von PAB unabhängig vom Genotyp

signifikant erhöht (alle  $p < 0,05$ ). Dabei konnte kein Unterschied in der Genexpression zwischen  $\text{NOS2}^{+/+}$  und  $\text{NOS2}^{-/-}$  Mäusen detektiert werden (alle  $p > 0,05$ ) (Abb. 20).

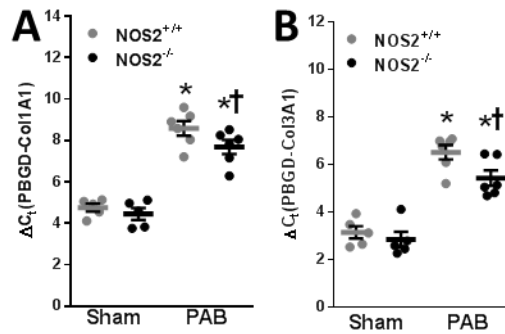


### Abb. 21: Quantifizierung des Kollagenanteils im rechten Ventrikel

Die spezifische Färbung der Kollagenfasern in Gewebeschnitten des rechten Ventrikels ermöglichte eine Quantifizierung des Gesamtkollagenanteils Sham- und PAB-operierter  $\text{NOS2}^{+/+}$  und  $\text{NOS2}^{-/-}$  Tiere. Repräsentative Aufnahmen (A). Quantifizierung des Kollagenanteils (B).  $n=4-6$  Tiere pro Gruppe. \*:  $p < 0,05$  vs. Sham, †:  $p < 0,05$  vs.  $\text{NOS2}^{+/+}$ .

Des Weiteren wurde der Einfluss des NOS2-Funktionsverlusts auf die Ausbildung myokardialer Fibrose infolge von PAB untersucht. Eine spezifische Färbung der Kollagenfasern ermöglichte die Quantifizierung des Gesamt-Kollagenanteils im rechten Ventrikel (siehe 3.6.1). Fibrotische Areale wurden insbesondere in den PAB-operierten Tieren interstitiell identifiziert (vgl. Abb. 21). 21 Tage nach chronischer Drucküberladung war der Gesamtkollagenanteil in den  $\text{NOS2}^{+/+}$  Mäusen im Vergleich zu den Sham-operierten Kontrolltieren signifikant erhöht ( $9,45 \pm 0,80$  % versus  $0,82 \pm 0,35$  %;  $p < 0,05$ ). In Schnitten von  $\text{NOS2}^{-/-}$  Tieren wurde ebenfalls am Tag 21 nach dem operativen Eingriff ein erhöhter Kollagengehalt im rechten Ventrikel detektiert ( $6,75 \pm 0,44$  % versus  $0,85 \pm 0,18$  %;  $p < 0,05$ ). Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren war der Gesamtkollagenanteil nach PAB in den  $\text{NOS2}^{-/-}$  Mäusen signifikant reduziert ( $6,75 \pm 0,44$  % versus  $9,45 \pm 0,80$  %;  $p < 0,05$ ) (Abb. 21).





### Abb. 22: Expressionsnachweise ausgewählter Fibrose-Markergene

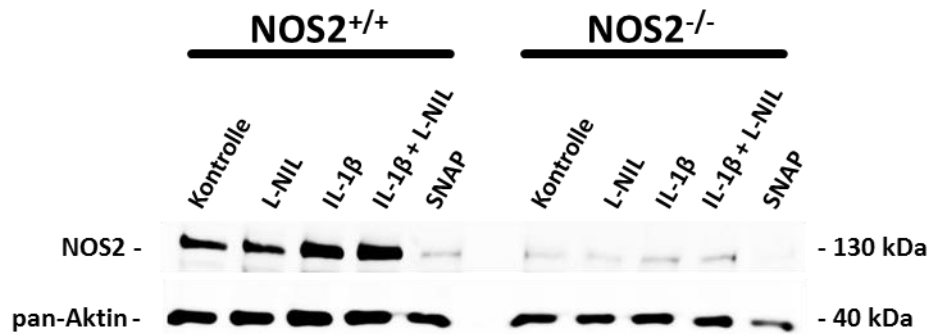
21 Tage nach Sham- oder PAB-Operation wurde mittels Echtzeit-PCR in NOS2<sup>+/+</sup> und NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen die Expression der Kollagene 1A1 (A) und 3A1 (B) im rechten Ventrikel quantifiziert.  $n=5-6$  Tiere pro Gruppe. \*:  $p<0,05$  vs. Sham, †:  $p<0,05$  vs. NOS2<sup>+/+</sup>.

Zusätzlich konnte in Genexpressionsanalysen via quantitativer Echtzeit-PCR eine erhöhte Expression der Fibrose-Markergene Kollagen 1A1 (Col1A1) und 3A1 (Col3A1) infolge von PAB in beiden Genotypen nachgewiesen werden (alle  $p < 0,05$ ). Die NOS2-Defizienz hatte dabei keine Auswirkungen auf die Expression der Kollagene nach Sham-Operation ( $p > 0,05$ ). Infolge von PAB jedoch, war der Kollagenanteil in den NOS2<sup>-/-</sup> Tieren ebenfalls erhöht (beide  $p < 0,05$ ), allerdings verringert im Vergleich zu den PAB-operierten Wildtyp-Kontrollmäusen (beide  $p < 0,05$ ) (Abb. 22). Diese Daten zeigen, dass NOS2 eine Rolle in der Ausbildung stressbedingter myokardialer Fibrose spielt.

### 4.7 Rolle von NOS2 in der Kollagen-Sekretion kardialer Fibroblasten

*In vitro* wurde die Rolle von NOS2 auf die Kollagen-Sekretion isolierter rechtsventrikulärer Fibroblasten untersucht. Dazu wurden isolierte Zellen aus NOS2<sup>+/+</sup> und NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen (siehe 3.10.1) mit dem spezifischen NOS2-Inhibitor L-NIL (100  $\mu$ M), dem bekannten Induktor der NOS2-Expression Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ; 1 ng/ml), der Kombination aus beiden Substanzen oder dem NO-Donor SNAP (100  $\mu$ M) für 72 Stunden pharmakologisch stimuliert (siehe 3.10). Im Anschluss wurden die Proteinexpression von NOS2, die NO-Konzentration im Medium und die Menge des sezernierten Kollagens gemessen.

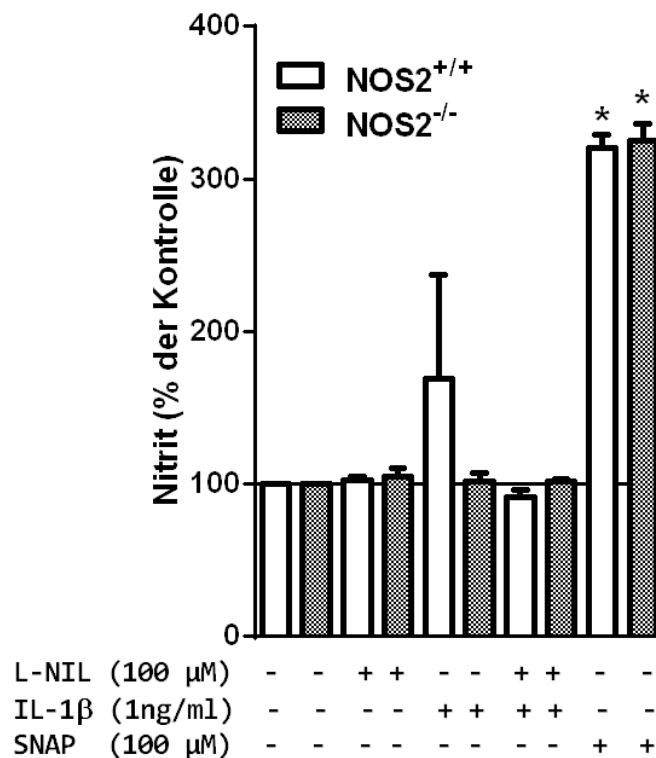




**Abb. 23: NOS2-Expression in ex vivo kultivierten rechtsventrikulären Fibroblasten**

Fibroblasten wurden selektiv aus dem rechten Ventrikel von  $NOS2^{+/+}$  und  $NOS2^{-/-}$  Mäusen isoliert und für 72 Stunden mit dem spezifischen NOS2-Inhibitor L-NIL (100  $\mu M$ ), dem Zytokin IL-1 $\beta$  (1 ng/ml), der Kombination aus beiden Substanzen oder dem NO-Donor SNAP (100  $\mu M$ ) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Detektion der NOS2-Proteinexpression via Western-Immunoblotting, wie hier repräsentativ dargestellt.

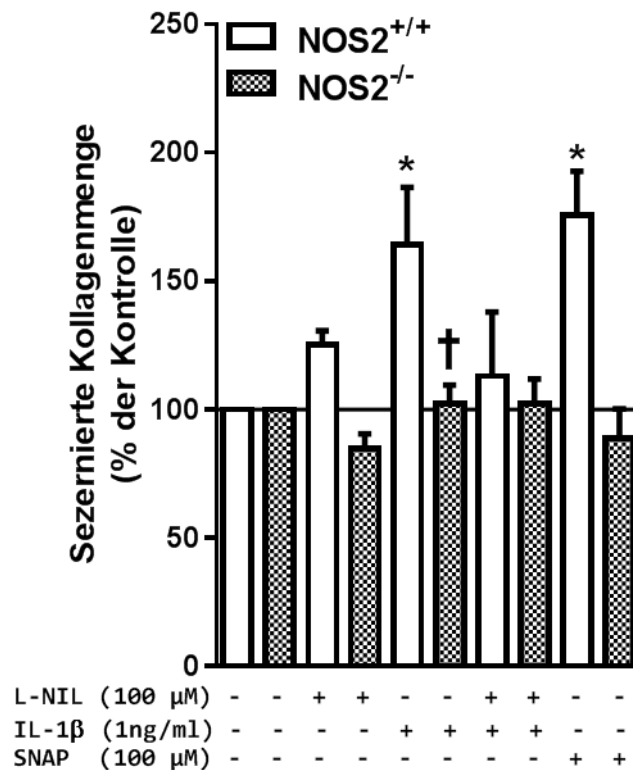
Die Stimulation der isolierten Fibroblasten aus Wildtyp-Tieren mit L-NIL hatte keinen Einfluss auf die NOS2-Proteinexpression im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  erhöhte die Proteintranslation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen genauso wie die Kombination aus IL-1 $\beta$  und L-NIL. Die Zugabe von SNAP in das Medium verringerte die Expression von NOS2 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutlich. Isolierte Fibroblasten aus Mäusen, in denen das NOS2-Gen gezielt funktionsunfähig gemacht wurde, zeigten eine stark verringerte NOS2-Expression im Vergleich zu Zellen aus Wildtyp-Mäusen (Abb. 23).



#### Abb. 24: Nitrit-Konzentrationen im Medium rechtsventrikulärer Fibroblasten

Die Bestimmung der Nitrit-Konzentration als stabileres NO-Reaktionsprodukt erfolgte im Zellkulturmedium isolierter rechtsventrikulärer Fibroblasten 72 Stunden nach Stimulation der Zellen mit dem spezifischen NOS2-Inhibitor L-NIL (100 μM), dem Zytokin IL-1β (1 ng/ml), der Kombination aus beiden Substanzen oder dem NO-Donor SNAP (100 μM). n=3 Messungen. \*: p<0,05 vs. Kontrolle.

Im Anschluss an die jeweilige Stimulation der Zellen wurde im Kulturmedium die Nitrit- und Nitrat-Konzentration bestimmt, um die Funktionalität der NOS2-Induktion zu bestimmen (vgl. 3.10.3). Die Zugabe von L-NIL hatte sowohl in Fibroblasten aus NOS2<sup>+/+</sup> (102,2±2,7 %) als auch in Zellen aus NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen (104,9±5,6 %) keinen Einfluss auf die NO-Produktion. Allerdings resultierte die pharmakologische Induktion der NOS2-Expression durch IL-1β in Zellen aus Wildtyp-Tieren (168,8±68,1 %), aber nicht in Fibroblasten mit funktionsunfähigen NOS2 (101,7±5,2 %), in einem stark variierenden Anstieg der NO-Konzentration (vgl. Abb. 24). Die Zugabe des NOS2-Inhibitors blockierte diesen Konzentrationsanstieg (91,1±4,8 %). Als positiver Kontrollstimulus wurden erwartungsgemäß exzessive Mengen an NO durch den NO-Donor SNAP im Medium unabhängig vom Genotyp der Zellen detektiert (319,8±9,4 % in Wildtyp Zellen und 325,0±10,9 % in Fibroblasten aus NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen, beide p<0,05) (siehe Abb. 24).



**Abb. 25: Quantifizierung der sezernierten Kollagenmenge isolierter rechtsventrikulärer Fibroblasten**

Die Bestimmung der sezernierten Kollagenmenge erfolgte im Zellkulturmedium isolierter rechtsventrikulärer Fibroblasten 72 Stunden nach Stimulation der Zellen mit dem spezifischen NOS2-Inhibitor L-NIL (100 μM), dem Zytokin IL-1β (1 ng/ml), der Kombination aus beiden Substanzen oder dem NO-Donor SNAP (100 μM). n=3 \*: p<0,05 vs. Kontrolle, †: p<0,05 vs. NOS2<sup>+/+</sup>.

Als physiologischer Messparameter wurde in den isolierten Fibroblasten unter den jeweiligen Bedingungen zusätzlich der sezernierte Kollagenanteil gemessen, um Aussagen zur Rolle von NOS2 in der Entwicklung der myokardialen Fibrose treffen zu können (siehe 3.10.2). Die spezifische Inhibition von NOS2 hatte sowohl in Fibroblasten aus NOS2<sup>+/+</sup> (125,2±5,5 %) als auch in Zellen aus NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen (85,0±5,7 %) keinen Einfluss auf die Kollagensekretion. Die pharmakologische Induktion von NOS2 durch IL-1β resultierte in Wildtyp-Zellen nicht aber in Fibroblasten mit funktionsunfähigem NOS2 in einem robusten Anstieg der Kollagensekretion (164,4±22,2 % in Zellen aus NOS2<sup>+/+</sup> versus 102,2±7,4 % in Fibroblasten aus NOS2<sup>-/-</sup> Mäusen, p<0,05). Dieser Anstieg der Kollagensekretion konnte spezifisch durch den NOS2-Inhibitor L-NIL verringert werden (113±25 %, p<0,05). Interessanterweise konnte eine verstärkte Sekretion des Kollagens

ebenfalls durch Zugabe des NO-Donors in Fibroblasten aus Wildtyp-Zellen erzielt werden. Im Gegensatz dazu hatte die exzessive NO-Konzentration im Medium der Zellen aus NOS2<sup>-/-</sup> Tieren keinen Effekt auf die Kollagensekretion (175,7±17,2 % versus 89,0±11,4 %, p<0,05) (siehe Abb. 25).

Dementsprechend liefern diese Beobachtungen Evidenzen, dass exzessive NO-Mengen, die durch Induktion der NOS2-Expression in rechtsventrikulären Fibroblasten im gestressten rechten Ventrikel produziert werden, eine Rolle in der Ausbildung der myokardialen Fibrose spielen.

## 5. Diskussion

In experimentellen Modellen der chronischen PH ist das Protein NOS2 ein kritischer Mediator pathologischer Veränderungen in der Lungenstrombahn (175, 176). Inwieweit die Induktion dieses Proteins und die daraus resultierende exzessive NO-Synthese im drucküberladenen rechten Ventrikel die kardiale Funktion direkt beeinflusst ist in diesen Studien nicht adressiert worden, weshalb im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von NOS2 in der Entwicklung der PH-assoziierten rechtsventrikulären Hypertrophie und Dysfunktion untersucht worden ist (siehe auch 2).

Das Auftreten einer isolierten chronischen Drucküberladung des rechten Ventrikels wurde operativ mittels Stenose der Pulmonalarterie (PAB, *pulmonary artery banding*) mit definiertem Durchmesser herbeigeführt (siehe 1.3). Dementsprechend wurde dieses Tiermodell zur gezielten Betrachtung der PH-assoziierten rechtsventrikulären Hypertrophie und Dysfunktion eingesetzt, da es zum einen in der PH-Forschergemeinschaft etabliert ist (29, 34, 167) und zum anderem auch durch die Arbeitsgruppe Pulmonale Pharmakotherapie des „Universities of Giessen and Marburg Lung Center (UGMLC)“ mehrfach publiziert wurde (32, 33, 177). In dieser Arbeit wurde ein Stenosen-Durchmesser von 0,3 mm gewählt, der zirka eine 50 prozentige Einschnürung der Pulmonalarterie erzeugt. Bogaard und Mitarbeiter lieferten im Jahre 2009 erste Evidenz (29), dass sich im rechten Ventrikel von Ratten infolge einer moderater Pulmonalarterienstenose deutliche myokardiale Hypertrophie und Dilatation ausbilden. Allerdings wurden keine Veränderungen in Bezug auf kardiale Fibrose, Ausdünnung des Kapillarnetzwerkes oder Reduktion der Auswurfleistung sechs Wochen nach Krankheitsinduktion detektiert, sodass dieses Modell eine kompensatorische Form von Hypertrophie beschreibt. Im Gegensatz dazu demonstrierten Borgdorff und Mitarbeiter in 2015 (34), dass eine sehr starke Pulmonalarterienverengung die Entstehung rechtsventrikulärer Hypertrophie, eine merklich reduzierte Auswurfleistung, aber auch eine diastolische Dysfunktion und klinische Anzeichen von Herzinsuffizienz zur Folge hat und somit eine dekompensatorische Form des rechten Ventrikels reflektiert. Unter den Voraussetzung der hier vorliegenden Arbeit resultierte die chronische Drucküberladung in der Ausbildung einer myokardialen rechtsventrikulären Hypertrophie begleitet durch eine verringerte rechtsventrikuläre Auswurfleistung, welche sieben Tage nach der Operation bereits vollständig etabliert war (nicht

gezeigte Daten). Drei Wochen nach erfolgter PAB-Operation war die Auswurfleistung des hyper-kontraktiven rechten Ventrikels im Vergleich zu Sham-operierten Kontrollmäusen weiterhin verringert, die Hypertrophie aufrechterhalten und interstitielle myokardiale Fibrose präsent (siehe 4.5 und 4.6). Dementsprechend kann das hier angewandte Mausmodell als Zwischenstufe zwischen ausgebildeter kompensatorischer Hypertrophie und noch nicht etablierter Dekompensation eingeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde drei Wochen nach chronischer rechtsventrikulärer Drucküberladung durch PAB eine vermehrte Expression (vgl. Abb. 6) und Enzymaktivität (vgl. Abb. 9) der NOS2-Isoform im Zytosol von Kardiomyozyten und Fibroblasten im rechten Ventrikel (vgl. Abb. 7 und Abb. 8) nachgewiesen (siehe 4.1). Bereits im Jahre 1992 demonstrierten Schulz und Mitarbeiter die Induktion einer Kalzium-unabhängigen NOS-Isoform in Kardiomyozyten nach Stimulation mit unterschiedlichen Zytokinen (178). Diese NOS2-Isoform wurde drei Jahre später in Kardiomyozyten und in kardialen Fibroblasten lokalisiert und es wurde gezeigt, dass NOS2-Stimulation mit diversen Zytokinen in beiden Zelltypen die NO-Synthese um ein Vielfaches erhöht (179, 180). Untersuchungen der Promotorregion dieses NOS2-Gens haben daraufhin mehrere Bindestellen für NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of B-cells*) identifiziert (181, 182). Mittlerweile ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B redox-sensitiv, aber auch durch Stimulation mit Zytokinen aktiviert und infolge von ventrikulärer Drucküberladung vermehrt in Kardiomyozyten exprimiert wird (183–187). Des Weiteren moduliert Sauerstoffmangel die NOS2-Expression über HIF1 $\alpha$  (HIF=*hypoxia-inducible factor*) und eine HRE-Sequenz (HRE=*hypoxia response element*) in der NOS2-Promotorregion (188). Es wurde bereits gezeigt, dass HIF1 $\alpha$  infolge von chronischen Drucküberladung vermehrt im rechten Ventrikel als kritischer Mediator der zellulären Antwort auf Hypoxie bzw. Ischämie exprimiert wird (29). Im hypertrophen rechten Ventrikel entsteht Sauerstoffmangel durch kapillare Ausdünnung gepaart mit verringerter Angiogenese (29). Dementsprechend besteht möglicherweise ein kausaler Zusammenhang zwischen der HIF1 $\alpha$ -Hochregulation, NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der in dieser Arbeit beobachteten vermehrten NOS2-Expression im rechten Ventrikel infolge von PAB (siehe 4.1).

Die NOS2-Induktion im rechten Ventrikel infolge von PAB geht einher mit Untersuchungen am linken Ventrikel nach experimentell-induzierter chronischer

## Diskussion

---

linksventrikulärer Drucküberladung durch Trans-Aorten-Konstriktion (TAC, *trans aortic constriction*) (189). Außerdem demonstrieren klinische Daten eine vermehrte NOS2-Expression im linken Ventrikel von Patienten mit mild-bis-moderatem und mit schwerem terminalen Linksherzversagen (84, 85). Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe 1.7), unterscheiden sich linker und rechter Ventrikel anatomisch, funktionell und in den Mechanismen der Herzinsuffizienz-Entstehung, sodass Befunde aus dem linken Ventrikel nicht *per se* auf den rechten Ventrikel übertragen werden können.

Aufgrund der zuvor erwähnten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren HIF1 $\alpha$  und NF- $\kappa$ B, die die NOS2-Expression induzieren, ist es nicht verwunderlich, dass im Modell der Zigarettenrauch-induzierten PH, welches mit inflammatorischen sowie ischämischen Prozessen und erhöhter NF- $\kappa$ B-Aktivität im Lungengewebe assoziiert ist, NOS2 eine kritische Rolle einnimmt (175). Des Weiteren wurde NOS2 im Modell der chronisch alveolaren Hypoxie, indem HIF1 $\alpha$  durch chronischen Sauerstoffmangel im Gewebe stabilisiert wird, ebenfalls als Mediator der PH-Pathogenese und Progression identifiziert (176).

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass die hier gemessene NOS2-Enzymaktivität im Gewebehomogenisat (vgl. Abb. 9) nicht auf einen distinkten Zelltyp zurückzuführen ist und dass die Aktivitätserhöhung keine Hyperaktivität des NOS2-Dimers beschreibt. Vielmehr geht die insgesamt verstärkte NOS2-Aktivität im rechten Ventrikel auf eine zirka Zweifache gesteigerte NOS2-Gesamtproteinexpression im Gewebe zurück. Da in der Aktivitätsmessung zwar für alle untersuchten Tiergruppen eine identische Gesamtproteinmenge eingesetzt wurde, die relative Menge an NOS2-Protein in den PAB-Proben jedoch doppelt so hoch wie in den Sham-Proben war, bestätigt die Verdopplung der gemessenen spezifischen NOS2-Enzymaktivität im Grunde den zuvor beschriebenen Befund.

Unspezifische zelluläre Effekte löst NO hauptsächlich über die Formation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Gewebe aus (siehe 1.8). Dazu reagieren NO-Moleküle unter anderem in der unmittelbaren Umgebung des Superoxid-Anions ( $O_2^-$ ) zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) (190). Im überladenen rechten Ventrikel nach PAB konnte im Rahmen dieser Arbeit ein erhöhter ROS-Anteil detektiert werden (vgl. Abb. 10). Dieser ROS-Anteil reflektiert aufgrund der hohen Affinität der in der Messung eingesetzten CMH-Sonden hauptsächlich Superoxid und Peroxynitrit, aber auch einen geringen Anteil an unspezifischer Auto-Oxidation (191, 192). Die erhöhte ROS-

## Diskussion

---

Formation im drucküberladenen rechten Ventrikel konnte durch unspezifische Hemmung der NOS-Aktivität signifikant verringert werden (siehe 4.2). Demnach liefern diese Resultate den wissenschaftlichen Beweis, dass eine Hemmung der NO-Synthese die ROS-Produktion im drucküberladenen rechten Ventrikel signifikant reduzieren kann.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass die quantitative Proteinexpression der konstitutiv aktiven NOS-Isoformen (NOS1 und NOS3) im drucküberladenen rechten Ventrikel infolge von PAB unverändert bleibt (vgl. Abb. 11). Die Lokalisation dieser Isoenzyme in den Kardiomyozyten, die durchaus die Funktion der NOS-Isoformen beeinflusst (siehe 1.7), wurde nicht näher adressiert, da dies nicht Gegenstand der hier vorliegenden Untersuchungen war. Vielmehr trat die Beobachtung in den Vordergrund, dass eine globale NOS2-Defizienz keine Gegenregulation der konstitutiv aktiven NOS-Isoformen zur Folge hatte (siehe 4.3). Die Rolle der konstitutiv aktiven NOS-Isoenzyme in der Entstehung linksventrikulärer Dysfunktion infolge von Drucküberladung ist bereits mehrfach beschrieben worden (vgl. Abb. 4). So identifizierten Untersuchungen an genetisch veränderten Mäusen mit einer konditionellen NOS1-Überexpression in Kardiomyozyten eine Rolle für NOS1 bei der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase in den kontrahierenden Zellen durch Modulation der Kalzium-Verarbeitung im sarkoplasmatischen Retikulum. Außerdem resultierte die Kardiomyozyten-spezifische Überexpression der NOS1-Isoform funktionell in diastolischer Dysfunktion (193). In einer weiteren Studie mit TAC-operierten Mäusen, die NOS1 spezifisch in Kardiomyozyten überexprimieren, wurde keine Veränderung der kardialen Fibrose aber eine erhöhte Kapillarisation des ventrikulären Gewebes detektiert (194). Diese Beobachtungen gehen einher mit den Befunden aus den in der Einleitung beschriebenen Ergebnissen zur NOS1-Lokalisation (siehe 1.7). Studien von Moens *et al.* aus dem Jahre 2009 am linken Ventrikel drei Wochen nach TAC haben gezeigt, dass die chronische Drucküberladung die Gesamt-NOS-Aktivität leicht und den ROS-Anteil im linken Ventrikel deutlich erhöht (110). Die Autoren dieser Studie erklären die erhöhte Superoxid-Produktion im Gewebe durch ein Entkoppeln von NOS3 (siehe 1.8), sodass Superoxid anstelle von NO synthetisiert wird (82). Gleichzeitig zeigen sie aber, dass im überladenen linken Ventrikel kein Mangel am entscheidenden Ko-Faktor für diesen Vorgang, Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), vorliegt (110) und Studien mit BH<sub>4</sub>-Supplementation lieferten kontroverse Resultate (siehe 1.8) Niu *et al.*



## Diskussion

---

beschrieben 2012 eine unveränderte NOS1-Expression im überladenen linken Ventrikel und zeigten, dass der robuste ROS-Anstieg im Gewebe drei Wochen nach TAC NOS1-unabhängig ist (112). Da im Rahmen dieser Arbeit die PAB-induzierte ROS-Produktion eindeutig durch unspezifische NOS-Hemmung verringert werden konnte (siehe Abb. 10), eine NOS1-Hemmung aber keinen Einfluss auf die ROS-Produktion hat, kann der Effekt der ROS-Verringerung auf NOS2 und/oder NOS3 zurückgeführt werden. Zusätzlich wurde auch in der zuvor erwähnten Studie die erhöhte Superoxid-Produktion durch ein Entkoppeln von NOS3 diskutiert.

Untersuchungen am drucküberladenen linken Ventrikel genetisch veränderter NOS3-Mäuse lieferten kontroverse Resultate (siehe auch Abb. 4). In einer Studie wird die NOS3-Defizienz mit myokardialer Fibrose und diastolischer Dysfunktion assoziiert (21). In einer weiteren wurde kein Einfluss auf Kardiomyozyten detektiert, obwohl diese Tiere infolge von TAC keine linksventrikuläre Dilatation ausbildeten (195) und in einer anderen Untersuchung konnte wiederum ein Effekt auf die Kardiomyozyten, Vergrößerung des Durchmessers und dadurch verstärkte Hypertrophie infolge von Drucküberladung sowie erhöhte kardiale Fibrose anlässlich von TAC (196), demonstriert werden. Diskrepanzen in der Dauer der aufrechterhaltenden Gefäßverengung sowie unterschiedliche Schweregrade der Aortenstenose erklären möglicherweise diese kontroversen Resultate. Interessanterweise zeigte eine Studie mit direktem Vergleich von TAC-operierten Wildtyp Mäusen zu NOS3-defizienten und NOS3-Kardiomyozyten-spezifisch überexprimierenden Tieren ein längeres Überleben der Mutanten mit funktionsunfähigem NOS3 und ein früheres Versterben der Tiere mit stark erhöhter NOS3-Expression (197). Die NOS3-Defizienz resultierte in einer reduzierten Superoxid-Produktion und verringerter rechtsventrikulärer myokardialer Fibrose sowie einer gesteigerten Angiogenese ohne Beeinträchtigung der Kardiomyozyten. Im Gegensatz dazu wurde in NOS3-überexprimierenden Mutanten eine stark erhöhte Superoxid-Produktion nachgewiesen, was ein NOS3-Entkoppeln vermuten lässt (197). Offensichtlich steht das verfrühte Versterben dieser Tiere in direktem Zusammenhang mit der erhöhten kardialen Superoxid-Produktion durch NOS3-Entkopplung sowie exzessiver myokardialer Fibrose.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine erhöhte endogene NO-Synthese im rechten Ventrikel infolge von PAB detektiert, die hauptsächlich durch NOS2-Enzymaktivität bedingt ist (vgl. Abb. 12). Gleichzeitig hat die NOS2-Funktionsunfähigkeit und die dadurch verringerte NO-Bioverfügbarkeit im drucküberladenen rechten Ventrikel zur

Folge, dass die NO-sensitive sGC $\beta$ 1-Untereinheit kompensatorisch hochreguliert wird (vgl. Abb. 13). Der Mangel an NO im gestressten rechten Ventrikel resultiert in einer erhöhten Superoxid-Präsenz (vgl. Abb. 14), da NO als Radikalfänger abwesend ist, und somit auch in einer verringerten ROS-Formation (vgl. Abb. 15 und siehe 4.4). Die bereits beschriebene erhöhte NOS2-Expression und Enzymaktivität im rechten Ventrikel drei Wochen nach PAB erklären die vermehrte NO-Produktion, welche auch im linken Ventrikel nach TAC in der Literatur beschrieben wurde (128). Die NO-Konzentration im Gewebe wurde in dieser Arbeit indirekt über die Detektion der stabileren Reaktionsprodukte Nitrit und Nitrat quantifiziert (vgl. 3.8.4). Diese Methode reflektiert zwar nicht exakt die NO-Konzentration im Gewebe (198), da Nitrit und Nitrat auch NO-unabhängig im Gewebe gebildet werden, unter anderem um NOS-unabhängig NO zu generieren (74), die Verhältnisse der einzelnen Gruppen zueinander werden aber zuverlässig repräsentiert.

Der physiologische Bedarf einer gesteigerten NO-Synthese im drucküberladenen rechten Ventrikel begründet sich möglicherweise durch vermehrt benötigte Energie, Sauerstoff und Nährstoffe im kardialen Muskelgewebe um die Auswurfleistung des rechten Ventrikels gegen die stark erhöhte Nachlast aufrechtzuerhalten. Die vermehrte NO-Bioverfügbarkeit könnte demnach zu einer Vasodilatation der Koronargefäße beitragen, sodass dadurch eine verbesserte Blutversorgung des myokardialen Gewebes erreicht und der Ausdünnung des Kapillarnetzwerks entgegen gewirkt werden kann. Dieser Effekt wurde in der hier vorliegenden Studie nicht explizit adressiert, der Einfluss von NO auf die Relaxation der Koronargefäße zur Aufrechterhaltung des koronaren Blutflusses wurde jedoch in der Literatur bereits beschrieben (88) und in einem experimentellen Modell der chronischen Herzinsuffizienz nachgewiesen (87).

Die Hochregulation der sGC $\beta$ 1-Expression (vgl. Abb. 13) validiert in gewisser Weise die verringerte NO-Konzentration im drucküberladenen rechten Ventrikel mit dysfunktionalem NOS2. Studien der Promotorregion des humanen sGC-Gens haben gezeigt, dass innerhalb dieser regulatorischen Sequenz unter anderem ein Häm-NO/Sauerstoff (H-NOX) Motiv lokalisiert ist (174, 199). Dieses Motiv gilt als zellulärer NO-Sensor, der je nach lokaler Präsenz entweder NO oder Sauerstoff bindet und bei reduzierter NO-Bioverfügbarkeit die Expression der sGC $\beta$ 1-Untereinheit kompensatorisch hochreguliert um die Signalweiterleitung über die NO-sGC-cGMP Achse aufrechtzuerhalten (200). Da die sGC $\beta$ 1-Untereinheit im Gewebehomogenisat

nachgewiesen wurde, kann die Expression an dieser Stelle nicht auf einen distinkten Zelltyp zurückgeführt werden. Interessanterweise zeigten Masuyama und Mitarbeiter, dass die NO-unabhängige sGC-Stimulation nach TAC keinen Einfluss auf den Blutdruck, aber einen anti-fibrotischen Effekt im linken Ventrikel hat. Des Weiteren demonstrierte diese Studie, dass *ex vivo* die NO-unabhängige Stimulation der sGC-Aktivität eine stärkere Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration in kardialen Fibroblasten im Vergleich zu Kardiomyozyten induziert (201). Allerdings liefern Daten aus der Literatur auch Hinweise, dass insbesondere in Kardiomyozyten die kompensatorische Hochregulation von sGC $\beta$ 1 den Bedarf an NO-sGC-cGMP Signalweiterleitung im drucküberladenen Ventrikel deckt (77). Außerdem konnte im linken Ventrikel gezeigt werden, dass unter stark oxidativen Bedingungen in denen die Häm-Gruppe oxidiert und dadurch die sGC-Aktivität verringert ist (98), eine Lokalisations- anstelle einer Expressions-Veränderung des Enzyms erfolgt (77). Die Ergebnisse der sGC-Lokalisationsstudien in der hier vorliegenden Arbeit stehen noch aus. Untersuchungen am rechten Ventrikel nach isolierter rechtsventrikulärer Drucküberladung und pharmakologischer sGC-Stimulation oder Aufrechterhaltung des Signals durch PDE5-Inhibition haben jedoch gezeigt, dass beide Konzepte Kardiomyozyten-unabhängig die rechtsventrikuläre Auswurfleistung verbessern und die myokardiale Fibrose exklusiv durch den sGC-Stimulator verringert wird (Doktorarbeit von Y. Schymura, JLU Giessen, 2013). Diese Befunde lassen den Rückschluss zu, dass die Aktivierung der NO-sGC-cGMP Signalkaskade durchaus einen anti-fibrotischen Effekt im rechten Ventrikel hat, wenngleich die genauen molekularen Mechanismen nicht näher bekannt sind. Inwieweit die einzelnen Zelltypen zu diesem Effekt beitragen ist derzeit nicht verstanden. Aber die Vermutung eines parakrinen Mechanismus liegt nahe, da bekannt ist, dass in der pulmonalen Vaskulatur NO in den Endothelzellen generiert wird, aber in den glatten Muskelzellen an die sGC bindet und dadurch Vasodilatation initiiert (49, 98, 202).

Die Detektion und Quantifizierung freier Radikale erfolgte in dieser Arbeit mittels ESR-Spektroskopie (siehe 3.9). Die eingesetzte CMH-Sonde weist zu bestimmten, klar definierten ROS-Molekülen eine höhere Affinität auf als zu anderen. CMH ist hochaffin für Superoxid-Radikale und detektiert diese in einem charakteristischen ESR-Spektrum (203–205). Die Bestimmung einer einzelnen Art von ROS ist hauptsächlich über die Inhibition eines ROS-Anteils möglich. Beispielsweise wird, wie auch in dieser Arbeit, das SOD1-Enzym als spezifischer Radikalfänger eingesetzt,

## Diskussion

---

um den Superoxid-Anteil eines gemessenen ESR-Signals zu bestimmen. Unter idealen Bedingungen reagiert exakt ein ROS-Molekül mit genau einem CMH-Sonden Molekül, sodass die Quantifizierung des deutlich stabileren Sonden-Signals dem ROS-Signal entspricht. Da nur ein ROS-Molekül mit einem Molekül der Sonde reagiert, ist die gemessene Amplitude proportional zur ROS-Menge (148, 149). Das Superoxid-Signal wird dementsprechend durch den durch SOD1-inhibierbaren Anteil reflektiert. Über entsprechende experimentelle Protein-freie Kontrollen wurde die Auto-Oxidation der Radikalfänger-Sonde durch Luftsauerstoff bestimmt, sodass die Subtraktion des Superoxid-Anteils bzw. der Auto-Oxidation vom gemessenen ROS-Anteil mit hoher Wahrscheinlichkeit die Peroxynitrit-Menge in der Probe widerspiegelt (206). Limitiert wird diese Methode zum einen durch die unbekannte Lokalisation der ROS-Quelle und zum anderen durch die Außerachtlassung weiterer Radikale. Das bedeutet, falls Superoxid beispielsweise im Gewebe durch SOD-Aktivität bereits zu Wasserstoffperoxid verstoffwechselt wurde, kann dies über die eingesetzten Sonden nicht detektiert werden. Dementsprechend wird hier ein sehr eingeschränktes Bild von ROS, hauptsächlich durch Superoxid-Produktion und Peroxynitrit-Formation, gezeichnet.

Die Peroxynitrit-Detektion kann ebenfalls über einen Nachweis von Nitrotyrosin-Epitopen erfolgen (vgl. 3.8.2). Diese indirekte Methode ist jedoch im Vergleich zur ESR-Messung unspezifisch und nicht quantitativ, da die Stöchiometrie von Peroxynitrit-Formation und Nitrotyrosinolyierung unklar ist (149). Die erhobenen Daten (vgl. Abb. 16) liefern jedoch die Evidenz, dass sich in Wildtyp Tieren infolge von PAB vermehrt Peroxynitrit formiert und bestätigen damit die ESR-Daten (vgl. Abb. 15). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass einzelne nitrotyrosinolierte Proteine über Western-Immunoblotting visualisiert und gegebenenfalls massenspektrometrisch identifiziert werden können. Die Identifikation einzelner, durch Peroxynitrit modifizierter Proteine stand in dieser Arbeit nicht im Zentrum der Betrachtung (vgl. 2). Aus diesem Grund wurden die nitrotyrosinolierten 50 und 60 kDa großen Proteine (noch) nicht massenspektrometrisch untersucht. Interessanterweise detektierte das Western-Immunoblotting gegen Nitrotyrosin lediglich die zwei genannten Banden (siehe Abb. 16) und keine Vielzahl an nitrotyrosinolierten Proteinen, wie es beispielsweise in Lungen-Homogenisat zu beobachten ist (175). Möglicherweise spielen Unterschiede in der Gewebezusammensetzung sowie in der Aufbereitung

## Diskussion

---

und technische Abweichungen in Bezug auf Belichtungszeit und eingesetzte Gesamtproteinmenge hier eine entscheidende Rolle.

Nicht-invasive echokardiographische Bildgebung (siehe 3.4) und invasive intrakardiale Druckmessungen (siehe 3.5) identifizierten keinen funktionellen Unterschied zwischen  $\text{NOS2}^{+/+}$  und  $\text{NOS2}^{-/-}$  Mäusen nach isolierter chronischer rechtsventrikulärer Drucküberladung (vgl. Tab. 3 und siehe 4.5). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen demonstrierten histomorphologische Analysen keine Veränderung der Kardiomyozyten-Hypertrophie (vgl. Abb. 19 und Abb. 20). Interessanterweise akkumulierten Tiere mit genetischer NOS2-Defizienz unter gestressten Bedingungen durch PAB signifikant weniger Kollagen im rechten Ventrikel als Wildtyp-Kontrolltiere (vgl. Abb. 21, Abb. 22 und siehe 4.6).

An dieser Stelle gilt es anzumerken, dass die Pulmonalarterienstenose erwartungsgemäß den rechtsventrikulären systolischen Druck zirka verdoppelte, was durch die Ausbildung einer myokardialen Hypertrophie, Dilatation und hyperkontraktilität des rechten Ventrikels begleitet wurde. Das Auswurfvolumen des rechten Ventrikels war infolgedessen nach drei Wochen chronischer Drucküberladung verringert und Anzeichen diastolischer Dysfunktion waren präsent - ohne Beeinträchtigung der systemischen Zirkulation (vgl. Tab. 3). Diese Resultate gehen einher mit den in der Literatur beschriebenen Befunden für das PAB-Modell in der Maus (33, 171, 207) und bestätigen, in Kombination mit der Messung der arteriellen Elastizität ( $E_a$ ), welche in etwa die Nachlast reflektiert, dass der Schweregrad der Konstriktion und die Ausbildung der Hypertrophie sowie Dysfunktion in den beobachteten Tieren angemessen war. Allerdings wird die physiologische Untersuchung dadurch limitiert, dass der Evaluationszeitpunkt an Tag 21 lediglich eine Momentaufnahme darstellt. Für eine detailliertere Charakterisierung müssten weitere Untersuchungszeitpunkte eingeführt werden. Außerdem wären Untersuchungen an Mäusen mit zelltyp-spezifischer NOS2-Überexpression bzw. -Defizienz sinnvoll um die Rolle von NOS2 in der Pathogenese der Herzinsuffizienz weiter aufzuklären. Vorangegangene experimentelle Studien zur Charakterisierung der Rolle von NOS2 in der Entwicklung von Linksherzinsuffizienz lieferten kontroverse Resultate (siehe auch Abb. 4). Bereits im Jahre 2001 wurde die Hypothese aufgestellt, dass die exzessive NO-Produktion durch NOS2 und der dadurch entstehende oxidative Stress zu myokardialer Dysfunktion und der Pathogenese von Herzinsuffizienz beiträgt. Untersuchungen an genetisch

veränderten NOS2-defizienten Tieren nach Myokardinfarkt lieferten erste Beweise dafür und bestätigten diese Hypothese (208). Allerdings konnten die beschriebenen Beobachtungen in weiteren unabhängigen Studien nicht reproduziert werden (209, 210). Möglicherweise spielen die Strategie der genetischen Modifikation, der Schweregrad des Myokardinfarkts sowie der Zeitpunkt der Evaluierung nach Krankheitsinduktion eine Rolle für die beobachtete Diversität. Eine 40-fache Kardiomyozyten-spezifische NOS2-Überexpression mit merklich erhöhten NO-Konzentrationen und Peroxynitrit-Formation resultierte *per se* nicht in der Ausbildung kardialer Dysfunktion (211). Nichtsdestotrotz assoziierten Mungrue und Mitarbeiter eine 10-fache NOS2-Überexpression in Kardiomyozyten mit Bradyarrhythmien und plötzlichem Herzversagen (212). Interessanterweise ist die linksventrikuläre Funktion infolge von TAC in den Tieren mit 40-facher Kardiomyozyten-spezifischer Überexpression lediglich geringfügig beeinträchtigt und die  $\beta$ -adrenerge Antwort deutlich reduziert (213), was andeutet, dass NOS2 kein treibender Faktor in der Pathogenese von Herzinsuffizienz ist.

Die globale Defizienz von NOS2 resultiert ebenfalls nicht *per se* in einer verbesserten kardialen Funktion (21, 83). Kontroverse Resultate lieferten Studien an TAC-operierten NOS2-defizienten Tieren. In einer Untersuchung hatte die linksventrikuläre Drucküberladung keinen Einfluss auf nicht-invasiv ermittelte und invasiv detektierte Parameter der kardialen Funktion (214). Im Gegensatz dazu demonstrierten Zhang und Mitarbeiter Verbesserungen der linksventrikulären Funktion sowie reduzierte myokardiale Fibrose in NOS2-funktionsunfähigen Tieren, was sie durch reduzierten oxidativen Stress infolge von NOS2-Defizienz erklären (189). Alles in allem liefern die teilweise widersprüchlichen physiologischen Daten dieser Untersuchungen an genetisch veränderten NOS2-Tieren eher den Beweis, dass alleine die Induktion von NOS2 kein treibender Faktor in der Pathogenese und/oder Progression kardialer Dysfunktion ist. In Übereinstimmung mit der Gesamtheit der Daten wurde in dieser Arbeit eine verringerte Ausbildung der myokardialen Fibrose (zirka 30 %) in NOS2-defizienten Tieren nach PAB im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen beobachtet, die aber keinen Einfluss auf die rechtsventrikuläre Funktion hatte (siehe 4.5 und 4.6). Möglicherweise ist dieser relativ geringe Unterschied von 30 % nicht ausreichend, um akut einen vorteilhaften physiologischen Effekt detektieren zu können. An dieser Stelle soll jedoch erwähnt werden, dass im weiteren Krankheitsverlauf, in dem die myokardiale Fibrose im rechten Ventrikel der Wildtyp-Tiere progressiv ansteigt, ab

einem gewissen Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den Genotypen detektiert werden könnte. Dies wiederum würde potentiell die Lebenserwartung dieser Tiere erhöhen, indem der Zeitpunkt des Übergangs hin zur dekomensatorischen Form der rechtsventrikulären Hypertrophie nach hinten verschoben würde. In diesem Zusammenhang soll ebenfalls angemerkt werden, dass dieser Effekt einer gering reduzierten rechtsventrikulären Kollagen-Akkumulation ohne physiologische Konsequenzen bereits in weiteren, nicht-publizierten Studien unserer Arbeitsgruppe beobachtet wurde.

Um den zellulären Mechanismus der *in vivo* beobachteten reduzierten Kollagen-Akkumulation im gestressten rechten Ventrikel genauer zu untersuchen wurden isolierte rechtsventrikuläre Fibroblasten in Zellkultur detaillierter untersucht (siehe 3.10). Dabei demonstrierte die *ex vivo* Charakterisierung dieser Primärzellen eine prominente NOS2-Induktion infolge von Zytokin-Stimulation mit IL-1 $\beta$  (vgl. Abb. 23), die in einer erhöhten NO-Produktion (vgl. Abb. 24) und vermehrter Kollagen-Sekretion in das Medium (vgl. Abb. 25) resultierte (siehe 4.7). Dieser Effekt war exklusiv in Zellen mit funktionsfähigem NOS2-Protein zu beobachten und konnte durch Zugabe des spezifischen NOS2-Inhibitors L-NIL auf den basalen Level reduziert werden. Interessanterweise hatte die NOS-unabhängige Zugabe exzessiver NO-Konzentrationen über den NO-Donor SNAP mehrere Effekte zur Folge. Zum einen war die NOS2-Proteinmenge deutlich reduziert - möglicherweise durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Des Weiteren war die NO-Konzentration erwartungsgemäß um ein Vielfaches erhöht, während die Kollagen-Sekretion in Wildtyp aber nicht in NOS2-defizienten Zellen auf ein ähnliches Niveau wie nach IL-1 $\beta$  Stimulation erhöht war. Dementsprechend liefern diese Daten Evidenz, dass die NOS2-Induktion und die darauf folgende vermehrte NO-Produktion an der Ausbildung myokardialer Fibrose möglicherweise durch Peroxynitrit-Formation beteiligt sind. Allerdings gilt es hier zu bedenken, dass die isolierten Fibroblasten lediglich mit IL-1 $\beta$  stimuliert wurden, was zur Induktion der NOS2 und erhöhter NO-Produktion führt aber nicht zwangsläufig zur simultan erhöhten Superoxid-Produktion und dadurch zur Peroxynitrit-Formation. Hinweise, dass IL-1 $\beta$  als potenter Induktor der NOS2-Expression durch exzessive NO-Produktion auch zur Formation von Peroxynitrit führt gibt es aus Studien an isolierten neonatalen und adulten kardialen Fibroblasten (215, 216). In endosomalen Vesikeln wird außerdem der Superoxid-Produzent Nox1 durch IL-1 $\beta$  aktiviert (217). Des Weiteren stellen einige Studien

einen direkten Zusammenhang zwischen einer vermehrten NOS2-Expression mit der Einleitung des programmierten Zelltodes über DNA-Schädigungen aufgrund der Interaktion von Peroxynitrit mit Ribonukleinsäuren her (43, 218–220). *Ex vivo* Untersuchungen an neonatalen linksventrikulären Fibroblasten zeigen aber, dass eine 72-stündige Inkubation mit dem potenten NOS2-Hemmer 1400W keinen Effekt auf die Kollagen-Synthese hat, allerdings signifikant die Migration der kardialen Fibroblasten inhibiert (221). Da in diesen Zellen die NOS2-Expression nicht induziert wurde, ist das Ausbleiben eines 1400W-Effektes auf die Kollagen-Sekretion nicht überraschend. Allerdings ist die beobachtete Hemmung der Fibroblasten-Migration ein interessanter Befund, da zum einen bekannt ist, dass die NOS2-Induktion in verschiedensten Zelltypen die Zellmigration induziert (206, 222–225) und da zum anderen für den linken Ventrikel gezeigt werden konnte, dass ein TGF $\beta$ -abhängiger Übergang von in den Ventrikel migrierenden endothelialen Zellen zu mesenchymalen pro-fibrotischen Zellen signifikant zur Ausbildung myokardialer Fibrose beiträgt (226, 227). Dementsprechend könnte eine Blockierung der Einwanderung pro-fibrotischer Zellen durch NOS2-Defizienz die verringerte Ausbildung myokardialer Fibrose im drucküberladenen rechten Ventrikel erklären. Gleichzeitig liefern die in dieser Arbeit generierten Daten den Beweis, dass die Kollagen-Sekretion durch NOS2-Inhibition simultan und direkt verringert wird (vgl. Abb. 25). In diesem Zusammenhang demonstrieren Studien an isolierten kardialen Fibroblasten eine Rolle für ROS, insbesondere Superoxid, in der Kollagen-Sekretion. Radikalfänger wie beispielsweise Tempol, EUK-8 oder PEG-SOD reduzieren signifikant die Angiotensin II induzierte Superoxid-Produktion in kardialen Fibroblasten, was in allen Fällen durch eine verringerte Kollagen-Sekretion und eine erhöhte Matrixmetalloproteinase (MMP) Aktivität begleitet wird (228–230). Dagegen liefert die vermehrte Kollagen-Sekretion infolge der NO-Donor-Applikation Hinweise, dass NO möglicherweise auch direkt bei pathologischen Umbauprozessen der extrazellulären Matrix eine kausale Rolle einnimmt. Dazu ist bekannt, dass die über NO-vermittelte Abnahme der Zytokin-induzierten MMP-9-Expression von einer Abnahme der MMP-9-Aktivität begleitet wird. Dabei wirkt NO aber nicht auf die MMP-9-Transkription, sondern in erster Linie über eine Veränderung der Stabilität der MMP-9-mRNA (231–233).

Obwohl in der vorliegenden Arbeit wertvolle Ergebnisse im Rahmen der *ex vivo* Zellkulturversuche erzielt werden konnten, soll darauf hingewiesen werden, dass das mit inflammatorischen Vorgängen assoziierte Zytokin IL-1 $\beta$  kein spezifischer NOS2-



Induktor ist, sondern ein Entzündungsmediator der *in vivo* bereits im Nanogramm-Bereich eine Immunantwort durch Bindung an die Interleukin-1-Rezeptoren auslöst (234). Diese Bindung aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, was wiederum zur Induktion von NOS2, aber auch zur Initiierung inflammatorischer Prozesse, wie beispielsweise der Transduktion von Cyclooxygenase-2, einer vermehrten Bildung von Prostaglandin-E<sub>2</sub> oder der Freisetzung von IL-6 führt (235, 236). Dementsprechend sind die beobachteten Effekte *per se* nicht ausschließlich auf die Induktion von NOS2 zurückzuführen. Der Einsatz des spezifischen NOS2-Inhibitors L-NIL und die dadurch zulässige Betrachtung des L-NIL abhängigen Effekts, lassen aber durchaus Rückschlüsse auf die Beteiligung von NOS2 an der IL-1 $\beta$  ausgelösten Antwort zu. Es kann an dieser Stelle natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass durch die NOS2-Hemmung kompensatorische oder additive Effekte bei IL-1 $\beta$  Stimulation erzielt werden.

Zusammengefasst liefern die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten eindeutige Evidenzen, dass NOS2 und die Synthese exzessiver NO-Mengen an der Ausbildung myokardialer Fibrose infolge chronischer rechtsventrikulärer Drucküberladung beteiligt sind, aber keine zentrale Rolle oder eine treibende Funktion in der Pathogenese der Herzinsuffizienz einnehmen. Hauptsächlich limitiert wird die hier vorliegende Studie durch die Versuchsdauer (vgl. Abb. 5), da drei Wochen nach operativer Pulmonalarterienstenose die myokardiale Hypertrophie zwar mit einem verdoppelten systolischen Druck durch rechtsventrikuläre hyper-Kontraktilität etabliert war, die Progression der Erkrankung aber nicht weiter verfolgt werden konnte. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit der Einfluss von NOS2 auf die Pathogenese der rechtsventrikulären Dysfunktion sowie auf die pathologische Umstrukturierung des rechten Ventrikels betrachtet, nicht aber deren Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf und somit auch nicht auf die Vorgänge, die zu einer terminalen rechtsventrikulären Herzinsuffizienz führen würden. Aufgrund der erhobenen Daten wäre es deshalb sinnvoll insbesondere die Progression der myokardialen Fibrose über eine längere Versuchsdauer fortlaufend zu betrachten, da durchaus zu erwarten ist, dass die NOS2-Funktionsunfähigkeit sowie die daraus resultierende verringerte Peroxynitrit-Formation die Divergenz der betrachteten Tiergruppen im weiteren Krankheitsverlauf erhöht und Verbesserungen der kardialen Funktion in der NOS2-defizienten Gruppe präserter werden. In diesem Zusammenhang gilt es zu erwähnen, dass die Gefäßverengung durch PAB eine

akute schwerwiegende Nachlasterhöhung mit sich bringt, die in der Regel in dieser Form in PH-Patienten nicht beobachtet werden kann. Einzige Ausnahme bildet eventuell das Krankheitsbild der pulmonalen Embolie. Ein ideales Modell würde die Nachlast transient über einen längeren Zeitraum erhöhen, wie es beispielsweise bei COPD-Patienten der Fall ist und so die rechtsventrikuläre Adaption infolge einer pathologischen Erhöhung des pulmonal-arteriellen Widerstands deutlich realistischer reflektieren. Für den grundlegenden Beweis (*proof-of-principle*) ist das eingesetzte Tiermodell aus den in der Einleitung bereits hinreichend erwähnten Gründen durchaus sinnvoll und folgerichtig ausgewählt (vgl. 1.3).

Die Möglichkeit einer klinischen Translation der globalen NOS2-Defizienz ist selbstverständlich nicht gegeben, jedoch kann das NOS2-Enzym gezielt durch kleine pharmakologisch aktive Substanzen inhibiert werden. Beispielsweise stellt das kommerziell erhältliche Molekül L-NIL einen Inhibitor dar, der hoch potent und selektiv NOS2 inhibiert, oral verfügbar ist und bereits in anderen experimentellen Studien eingesetzt wurde (175, 176). Bemerkenswerterweise wurde in der Lungenstrombahn die Effektivität der NOS2-Inhibition und das Potential zur Regeneration von Zigarettenrauch-geschädigtem Gewebe (175) sowie der vorteilhafte Effekt der NOS2-Hemmung bei chronisch hypoxischer Vasokonstriktion der Lungengefäße nachgewiesen (176), sodass eine NOS2-Therapie die gesamte kardio-pulmonale Einheit positiv beeinflussen könnte.

Aufgrund der Tatsache, dass NOS2 ubiquitär exprimiert aber exklusiv unter pathologischen Konditionen induziert wird, wäre eine NOS2-Inhibition lokal auf das Gewebe mit induzierter NOS2 begrenzt, sodass zu erwartende Nebenwirkungen möglichst gering ausfallen würden. Nichtsdestotrotz gilt es abzuwägen, inwieweit eine therapeutische Intervention mit einem selektiven NOS2-Inhibitor Auswirkungen auf den neuronalen Bereich und/oder die Immunantwort hat, da NOS2-synthetisierte exzessive NO-Mengen für unterschiedliche Prozesse in diesen Bereichen eine kritische Rolle einnehmen. Möglicherweise können Dosis-Titrations oder definierte Administrationsrouten (z.B. Inhalation eines NOS2-Inhibitors um die pulmonale Zirkulation zu adressieren, orale Gabe und Wirkstoffadsorption im Magen und/oder Magen-Darmtrakt um neuronale Effekte zu reduzieren, etc.) Nebenwirkungen minimieren. Abschließend stellt sich die Frage, inwieweit diese tierexperimentellen Daten auf die humane Situation übertragbar sind. Hier sollen zwei Beispiele genannt werden, um die Möglichkeit der Übertragbarkeit vom Tiermodell zum Menschen zu

demonstrieren. Erstens wurde in Studien zur Zigarettenrauch-induzierten PH die NOS2-Induktion in Lungen von COPD-Patienten nachgewiesen (175). Zweitens konnte die erhöhte Induktion dieser NOS-Isoform in mild-bis-moderatem und schwerem terminalen Linksherzversagen vorgefunden werden (83–85). Zusätzliche Evidenz könnte in explantiertem rechtsventrikulärem Gewebe von PAH-Patienten mit kompensatorischer sowie dekompensatorischer rechtsventrikulären Hypertrophie generiert werden. Selbstverständlich können final nur klinische Studien Verträglichkeit und Effektivität einer zukünftigen NOS2-Inhibitions-Therapie aufzeigen.

## **6. Ausblick**

Aufbauend auf den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten ergeben sich im Wesentlichen drei neue Fragestellungen deren Bearbeitung zur weiteren, detaillierteren Charakterisierung von NOS2 in der experimentellen rechtsventrikulären Hypertrophie und Dysfunktion beitragen würde.

Zunächst gilt es, die Beteiligung von NOS2 im weiteren Krankheitsverlauf und insbesondere dessen Rolle im Übergang vom kompensatorischen hin zum dekompensatorischen rechten Ventrikel zu untersuchen. Dazu ist der Zeitpunkt der kardialen Evaluierung entscheidend. Dementsprechend könnte eine Folgestudie diese Fragestellung adressieren, indem PAB-operierte Wildtyp und NOS2-defiziente Tiere zu späteren Zeitpunkten, vor und nach dem Übergang hin zur Dekompensation, mit identischen Methoden untersucht würden. An dieser Stelle sollten die Parameter und relevanten Indikatoren eines kompensatorischen sowie dekompensatorischen rechten Ventrikels möglichst exakt definiert werden.

Des Weiteren könnte auf Basis der in dieser Arbeit demonstrierten verringerten Kollagen-Akkumulation im drucküberladenen rechten Ventrikel die Rolle von NOS2 selektiv in kardialen Fibroblasten untersucht werden, um auch den molekularen Mechanismus hinter dieser verringerten Kollagenproduktion weiter aufzuklären. Dazu wäre es interessant, PAB-operierte Tiere mit jeweils Fibroblasten-spezifischer NOS2-Überexpression oder NOS2-Defizienz im Vergleich zu Wildtypen zu untersuchen.

Das translationale Potential einer NOS2-Hemmung könnte in einem therapeutischen Ansatz durch Administration eines hochselektiven NOS2-Inhibitors demonstriert werden. Dazu würden PAB-operierte Wildtyp-Tiere eine Woche nach dem operativen Eingriff, wenn rechtsventrikuläre Hypertrophie und Dysfunktion bereits vollständig etabliert sind, durch orale Gabe von L-NIL (spezifischer NOS2 Inhibitor) über das Trinkwasser therapiert. Diese Resultate hätten eine große translationale Relevanz und würden die Bedeutung von NOS2 in der Pathogenese, Progression und Therapie der rechtsventrikulären Hypertrophie und Dysfunktion weiter bekräftigen.

## 7. Zusammenfassung

Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwerwiegende Erkrankung des Lungengefäßsystems, die sich durch pathologische Umstrukturierungen der pulmonalen Gefäßwand und durch eine massiv erhöhte pulmonal-arterielle Resistenz auszeichnet. Der rechte Ventrikel kompensiert diesen erhöhten Widerstand durch funktionelle und strukturelle Adaptation. Stickstoffmonoxid (NO), endogen hergestellt durch NO-Synthasen (NOS), ist als pulmonaler Vasodilator und Modulator der kardialen Funktion bekannt. Die NOS2-Isoform wurde bereits als kritischer Mediator der Pathogenese pulmonal-vaskulärer Umstrukturierungen in experimentellen PH-Modellen identifiziert. Allerdings wurde in diesen Studien der direkte Effekt einer NOS2-Inhibition sowohl auf die rechtsventrikuläre Funktion als auch auf die rechtsventrikuläre myokardiale Umstrukturierung nicht hinreichend adressiert. Dementsprechend war es das Ziel dieser Arbeit, die Rolle von NOS2 in der experimentellen Rechtsherzhypertrophie und Dysfunktion zu charakterisieren.

Chronische rechtsventrikuläre Drucküberladung induzierte die NOS2-Expression und -Aktivität im rechten Ventrikel in Kardiomyozyten und Fibroblasten. Außerdem resultierte die aufrechterhaltene erhöhte Schubspannung auf den rechten Ventrikel in einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die durch unspezifische NOS-Hemmung auf den basalen Level reduziert wurde, was eine Rolle für NOS in der ROS-Produktion demonstriert. NOS2-defiziente Mäuse nach PAB-Operation zeigten sowohl keine Gegenregulation der konstitutiv aktiven NOS1- oder NOS3- Isoform als auch keine Drucküberladung-induzierte NO-Konzentrationserhöhung. Die reduzierte NO-Menge im rechten Ventrikel ging einher mit erhöhter Präsenz von Superoxid und verringerter ROS-Formation. Der abgeschwächte oxidative Stresslevel war mit einer reduzierten rechtsventrikulären myokardialen Fibrose drei Wochen nach PAB assoziiert. Allerdings demonstrierten Analysen der rechtsventrikulären Funktion zu diesem Zeitpunkt sowohl in nicht-invasiven, bildgebenden Verfahren als auch in invasiven intra-kardialen Druck-Volumen Bestimmungen keinen Unterschied zwischen NOS2<sup>+/+</sup>- und NOS2<sup>-/-</sup>-Tieren. In Übereinstimmung mit diesen Resultaten wurde die Kardiomyozyten-Hypertrophie durch den Genotyp nicht beeinflusst. *Ex vivo* Untersuchungen an isolierten rechtsventrikulären Fibroblasten unterstützten die Hypothese, dass NOS2 zur Ausbildung rechtsventrikulärer Fibrose durch Kollagensekretion in Zusammenhang

## Zusammenfassung

---

mit exzessiver NO-Produktion beiträgt. Diese Beobachtungen, zusammen mit Hinweisen aus der Literatur, liefern Evidenz, dass die Reduktion der ROS-Formation durch NOS2-Hemmung die Ausbildung einer pathologischen PH-assoziierten rechtsventrikulären Fibrose verzögert. Ergänzend dazu werden weitere Studien benötigt, um die Rolle von NOS2 in der Progression und dem Übergang von einem kompensatorischen hin zu einem dekomparatorischen rechten Ventrikel zu untersuchen. Außerdem gilt es, das therapeutische Potential einer NOS2-Hemmung durch den Einsatz selektiver, hoch-potenter kleiner Moleküle (z.B. L-NIL) in der Pathogenese und der Therapie der rechtsventrikulären Hypertrophie und Dysfunktion zu studieren.

## 8. Abstract

Pulmonary hypertension is a fatal disorder characterized by inward vascular remodeling of small pulmonary arteries leading to dramatically increased pulmonary vascular resistance. The right ventricle attempts to compensate for this increased resistance by functional and structural adaptation. NO, synthesized by NO synthases (NOS), is well-known to exert vasodilator properties in pulmonary vessels and to modulate cardiac function. Furthermore, the crucial role of NOS2 in the pathogenesis of aberrant pulmonary vascular remodeling was already demonstrated. However, the direct effect of NOS2-inhibition on right ventricular function and structural remodeling was not addressed in these studies. Thus, we sought to investigate whether NOS2 contributes to the development of PH-associated dysfunction and pathological remodeling of the right ventricle.

Sustained right ventricular pressure overload induced NOS2 expression and activity within the right ventricle in cardiac myocytes and fibroblasts. Furthermore, elevated pressure overload-induced ROS-production was robustly diminished by unspecific NOS inhibition - suggesting a role for NOS in oxidative stress. Global NOS2-deficient mice lack counter-regulation of NOS1 or NOS3 and miss the pressure overload-induced enhancement of NO production. These reduced NO-concentrations were accompanied by elevated superoxide occurrence and attenuated peroxynitrite formation. Amelioration of oxidative stress was linked to reduced myocardial right ventricular fibrosis three weeks after disease commencement without functional consequences as both, non-invasive cardiac imaging along with invasive intra-cardiac pressure-volume assessment revealed no alteration in right ventricular performance. In line with these findings, cardiomyocyte hypertrophy did not vary between pressure overload-challenged NOS2<sup>+/+</sup> and NOS2<sup>-/-</sup> mice. *Ex vivo* characterization of right ventricular fibroblasts strengthened the hypothesis that NOS2 contributes to the development of right ventricular fibrosis through collagen secretion in response to excessive NO production. Notably, these results, together with literature data, suggest that reducing ROS-formation by NOS2-inhibition can decelerate the development of PH-associated pathological myocardial fibrotic remodeling. Further studies are needed to elucidate the role of NOS2 in the transition from compensated right ventricular hypertrophy towards decompensation in a time- and spatial-dependent manner. Additionally, the therapeutic potential of NOS2 inhibition by administration of selective small-molecule NOS2 inhibitors in the setting of chronic right ventricular pressure overload needs to be addressed in more detail.

## 9. Literaturverzeichnis

1. Schermuly RT, Ghofrani H a, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:443–55.
2. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:D34–41.
3. Archer SL, Weir EK, Wilkins MR. Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation* 2010;121:2045–66.
4. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier J-F, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1023–30.
5. Gomez-Arroyo J, Sandoval J, Simon M a., Dominguez-Cano E, Voelkel NF, Bogaard HJ. Treatment for Pulmonary Arterial Hypertension–Associated Right Ventricular Dysfunction. *Ann Am Thorac Soc* 2014;11:1101–1115.
6. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J, Naeije R, Newman J, Oudiz RJ, Provencher S, Torbicki A, Voelkel NF, Hassoun PM. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:D22–33.
7. Ghofrani H-A, Galiè N, Grimminger F, Grünig E, Humbert M, Jing Z-C, Keogh AM, Langleben D, Kilama MO, Fritsch A, Neuser D, Rubin LJ. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2013;369:330–40.
8. Spruijt OA, Bogaard H-J, Vonk-Noordegraaf A. Assessment of right ventricular responses to therapy in pulmonary hypertension. *Drug Discov Today* 2014;doi:10.1016/j.drudis.2014.03.008.
9. Naeije R, Manes A. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* 2014;23:476–87.
10. Gurtu V, Michelakis ED. Emerging Therapies and Future Directions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Can J Cardiol* 2015;31:489–501.



11. Ryan JJ, Archer SL. Emerging concepts in the molecular basis of pulmonary arterial hypertension: part I: metabolic plasticity and mitochondrial dynamics in the pulmonary circulation and right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2015;131:1691–702.
12. Harrison A, Hatton N, Ryan JJ. The right ventricle under pressure: evaluating the adaptive and maladaptive changes in the right ventricle in pulmonary arterial hypertension using echocardiography (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ* 2015;5:29–47.
13. Voelkel NF, Bogaard HJ, Gomez-Arroyo J. The need to recognize the pulmonary circulation and the right ventricle as an integrated functional unit: facts and hypotheses (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ* 2015;5:81–9.
14. Guihaire J, Noly PE, Schrepfer S, Mercier O. Advancing knowledge of right ventricular pathophysiology in chronic pressure overload: Insights from experimental studies. *Arch Cardiovasc Dis* 2015;doi:10.1016/j.acvd.2015.05.008.
15. Stenmark KR, Rabinovitch M. Emerging therapies for the treatment of pulmonary hypertension. *Pediatr Crit Care Med* 2010;11:S85–90.
16. Ryan JJ, Huston J, Kutty S, Hatton ND, Bowman L, Tian L, Herr JE, Johri AM, Archer SL. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *Can J Cardiol* 2015;31:391–406.
17. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004;16:349–60.
18. Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, Steendijk P, Hop WC, Schoemaker RG, Duncker DJ, Lamers JM, Helbing W a. Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1580–6.
19. Borgdorff M a. J, Dickinson MG, Berger RMF, Bartelds B. Right ventricular failure due to chronic pressure load: What have we learned in animal models since the NIH working group statement? *Heart Fail Rev* 2015;doi:10.1007/s10741-015-9479-6.

20. Mungrue IN, Husain M. The Role of NOS in Heart Failure : Lessons from Murine. 2002;407–422.
21. Shibata K, Shimokawa H, Yanagihara N, Otsuji Y, Tsutsui M. Nitric oxide synthases and heart failure - lessons from genetically manipulated mice. *J UOEH* 2013;35:147–58.
22. Pak O, Janssen W, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT, Weissmann N. Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. *Drug Discov Today Dis Model* 2010;7:89–97.
23. Gomez-Arroyo J, Saleem SJ, Mizuno S, Syed AA, Bogaard HJ, Abbate A, Taraseviciene-Stewart L, Sung Y, Kraskauskas D, Farkas D, Conrad DH, Nicolls MR, Voelkel NF. A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302:L977–91.
24. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L1013–32.
25. Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, Kojonazarov B, Muecke C, Teske R, Capecchi MR, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Pullamsetti SS. Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 2014;20:1289–300.
26. Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, El-Bizri N, Sawada H, Haghghat R, Chan R, Haghghat L, de Jesus Perez V, Wang L, Reddy S, Zhao M, Bernstein D, Solow-Cordero DE, Beachy PA, Wandless TJ, Ten Dijke P, Rabinovitch M. FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2013;123:3600–13.
27. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811–21.
28. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2012;122:4306–13.

29. Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, Long CS, Kraskauskas D, Smithson L, Ockaili R, McCord JM, Voelkel NF. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* 2009;120:1951–60.
30. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, Bogaard HJ. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302:L363–9.
31. Borgdorff MAJ, Bartelds B, Dickinson MG, Boersma B, Weij M, Zandvoort A, Silljé HHW, Steendijk P, de Vroomen M, Berger RMF. Sildenafil enhances systolic adaptation, but does not prevent diastolic dysfunction, in the pressure-loaded right ventricle. *Eur J Heart Fail* 2012;14:1067–74.
32. Kojonazarov B, Sydykov A, Pullamsetti SS, Luitel H, Dahal BK, Kosanovic D, Tian X, Majewski M, Baumann C, Evans S, Phillips P, Fairman D, Davie N, Wayman C, Kilty I, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Ghofrani HA, Schermuly RT. Effects of multikinase inhibitors on pressure overload-induced right ventricular remodeling. *Int J Cardiol* 2013;167:2630–7.
33. Janssen W, Schymura Y, Novoyatleva T, Kojonazarov B, Boehm M, Wietelmann A, Luitel H, Murmann K, Krompiec DR, Tretyn A, Pullamsetti SS, Weissmann N, Seeger W, Ghofrani HA, Schermuly RT. 5-HT<sub>2B</sub> Receptor Antagonists Inhibit Fibrosis and Protect from RV Heart Failure. *Biomed Res Int* 2015;2015:438403.
34. Borgdorff M a. J, Koop AMC, Bloks VW, Dickinson MG, Steendijk P, Sillje HHW, van Wiechen MPH, Berger RMF, Bartelds B. Clinical symptoms of right ventricular failure in experimental chronic pressure load are associated with progressive diastolic dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2015;79:244–253.
35. Mahle S, Nicoloff DM, Knight L, Moller JH. Pulmonary artery banding: long-term results in 63 patients. *Ann Thorac Surg* 1979;27:216–24.
36. Egemnazarov B, Schmidt A, Crnkovic S, Sydykov A, Nagy BM, Kovacs G, Weissmann N, Olschewski H. Pressure Overload Creates Right Ventricular Diastolic Dysfunction in a Mouse Model : Assessment by Echocardiography. 1–16.
37. Borgdorff M a J, Bartelds B, Dickinson MG, Steendijk P, de Vroomen M, Berger RMF. Distinct loading conditions reveal various patterns of right ventricular adaptation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;305:H354–64.

38. Furchgott RF, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373–376.
39. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9265–9.
40. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524–6.
41. Thomas DD, Heinecke JL, Ridnour LA, Cheng R, Kesarwala AH, Switzer CH, McVicar DW, Roberts DD, Glynn S, Fukuto JM, Wink DA, Miranda KM. Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology. *Free Radic Biol Med* 2015;doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.002.
42. Balligand J-L, Cannon PJ. Nitric Oxide Synthases and Cardiac Muscle : Autocrine and Paracrine Influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1846–1858.
43. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315–424.
44. Budworth J, Meillerais S, Charles I, Powell K. Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:696–701.
45. Ibrahim M, Derbyshire ER, Soldatova A V, Marletta MA, Spiro TG. Soluble guanylate cyclase is activated differently by excess NO and by YC-1: resonance Raman spectroscopic evidence. *Biochemistry* 2010;49:4864–71.
46. Ballou DP, Zhao Y, Brandish PE, Marletta MA. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12097–101.
47. Fernhoff NB, Derbyshire ER, Underbakke ES, Marletta MA. Heme-assisted S-nitrosation desensitizes ferric soluble guanylate cyclase to nitric oxide. *J Biol Chem* 2012;287:43053–62.
48. Underbakke ES, Iavarone AT, Chalmers MJ, Pascal BD, Novick S, Griffin PR, Marletta MA. Nitric oxide-induced conformational changes in soluble guanylate cyclase. *Structure* 2014;22:602–11.

49. Lang M, Kojonazarov B, Tian X, Kalymbetov A, Weissmann N, Grimminger F, Kretschmer A, Stasch J-P, Seeger W, Ghofrani HA, Schermuly RT. The soluble guanylate cyclase stimulator riociguat ameliorates pulmonary hypertension induced by hypoxia and SU5416 in rats. *PLoS One* 2012;7:e43433.
50. Schermuly RT, Stasch J-P, Pullamsetti SS, Middendorff R, Müller D, Schlüter K-D, Dingendorf A, Hackemack S, Kolosionek E, Kaulen C, Dumitrascu R, Weissmann N, Mittendorf J, Klepetko W, Seeger W, Ghofrani HA, Grimminger F. Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2008;32:881–91.
51. Groves JT, Wang CC. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 2000;4:687–95.
52. Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions U Forstermann, El Closs, JS Pollock, M Nakane, P Schwarz, I Gath and H Kleinert Hypertension 1994, 23:1121-1131. 1994;1121–1131.
53. Campbell MG, Smith BC, Potter CS, Carragher B, Marletta MA. Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E3614–23.
54. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593–615.
55. Gorren AC, Mayer B. The versatile and complex enzymology of nitric oxide synthase. *Biochem Biokhimiia* 1998;63:734–43.
56. Villanueva C, Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med* 2010;49:307–16.
57. Daff S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide* 2010;23:1–11.
58. Pant K, Crane BR. Structure of a loose dimer: an intermediate in nitric oxide synthase assembly. *J Mol Biol* 2005;352:932–940.
59. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298 ( Pt 2:249–58).
60. Panda K, Rosenfeld RJ, Ghosh S, Meade AL, Getzoff ED, Stuehr DJ. Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J Biol Chem* 2002;277:31020–30.

61. Li D, Hayden EY, Panda K, Stuehr DJ, Deng H, Rousseau DL, Yeh S-R. Regulation of the monomer-dimer equilibrium in inducible nitric-oxide synthase by nitric oxide. *J Biol Chem* 2006;281:8197–8204.
62. Smith BC, Fernhoff NB, Marletta MA. Mechanism and kinetics of inducible nitric oxide synthase auto-S-nitrosation and inactivation. *Biochemistry* 2012;51:1028–40.
63. Gribovskaja I, Brownlow KC, Dennis SJ, Rosko AJ, Marletta MA, Stevens-Truss R. Calcium-binding sites of calmodulin and electron transfer by inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* 2005;44:7593–601.
64. Hurshman AR, Marletta MA. Reactions catalyzed by the heme domain of inducible nitric oxide synthase: evidence for the involvement of tetrahydrobiopterin in electron transfer. *Biochemistry* 2002;41:3439–56.
65. Moens AL, Takimoto E, Tocchetti CG, Chakir K, Bedja D, Cormaci G, Ketner E a, Majmudar M, Gabrielson K, Halushka MK, Mitchell JB, Biswal S, Channon KM, Wolin MS, Alp NJ, Paolocci N, Champion HC, Kass D a. Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation* 2008;117:2626–36.
66. Moens AL, Ketner EA, Takimoto E, Schmidt TS, O'Neill CA, Wolin MS, Alp NJ, Channon KM, Kass DA. Bi-modal dose-dependent cardiac response to tetrahydrobiopterin in pressure-overload induced hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51:564–9.
67. Stuehr DJ, Wei C-C, Santolini J, Wang Z-Q, Aoyagi M, Getzoff ED. Radical reactions of nitric oxide synthases. *Biochem Soc Symp* 2004;39–49.at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777011>>.
68. Li H, Poulos TL. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem* 2005;99:293–305.
69. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012;24:981–90.
70. Roe ND, Ren J. Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol* 2012;57:168–72.
71. Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard J-C, Lorgis L, Cottin Y, Vergely C. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther* 2013;140:239–57.

72. Heusch P, Aker S, Boengler K, Deindl E, van de Sand A, Klein K, Rassaf T, Konietzka I, Sewell A, Menazza S, Canton M, Heusch G, Di Lisa F, Schulz R. Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H446–53.
73. Kim JH, Bugaj LJ, Oh YJ, Bivalacqua TJ, Ryoo S, Soucy KG, Santhanam L, Webb A, Camara A, Sikka G, Nyhan D, Shoukas AA, Ilies M, Christianson DW, Champion HC, Berkowitz DE. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J Appl Physiol* 2009;107:1249–57.
74. Lundberg JO, Gladwin MT, Weitzberg E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14:623–41.
75. Stuehr DJ. and Clinical Significance Enzymes of the L -Arginine to Nitric Oxide Pathway 1 , 2. 2004;2748–2751.
76. Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H, Stasch J-P, Gnoth MJ, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation* 2006;113:286–95.
77. Tsai EJ, Liu Y, Koitabashi N, Bedja D, Danner T, Jasmin J-F, Lisanti MP, Friebe A, Takimoto E, Kass DA. Pressure-overload-induced subcellular relocalization/oxidation of soluble guanylyl cyclase in the heart modulates enzyme stimulation. *Circ Res* 2012;110:295–303.
78. Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J Pharmacol Sci* 2006;102:147–54.
79. Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand J-L. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 2003;93:388–98.
80. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JAC, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 2002;416:337–9.

81. Idigo WO, Reilly S, Zhang MH, Zhang YH, Jayaram R, Carnicer R, Crabtree MJ, Balligand J-L, Casadei B. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase (NOS) S-glutathionylation by neuronal NOS: evidence of a functional interaction between myocardial constitutive NOS isoforms. *J Biol Chem* 2012;287:43665–73.
82. Tang L, Wang H, Ziolo MT. Targeting NOS as a therapeutic approach for heart failure. *Pharmacol Ther* 2014;142:306–315.
83. Umar S, van der Laarse A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem* 2010;333:191–201.
84. Vejlstrup NG, Bouloumie A, Boesgaard S, Andersen CB, Nielsen-Kudsk JE, Mortensen SA, Kent JD, Harrison DG, Busse R, Aldershvile J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1215–23.
85. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, Mann MJ, Keeling PJ, Trindade PT, Lewis NP, Byrne CD, Rickenbacher PR, Bishopric NH, Cooke JP, McKenna WJ, Fowler MB. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Heart Failure. *Circulation* 1996;93:1087–1094.
86. Friedberg MK, Redington AN. Right versus left ventricular failure: Differences, similarities, and interactions. *Circulation* 2014;129:1033–1044.
87. O'Murchu B, Miller VM, Perrella MA, Burnett JC. Increased production of nitric oxide in coronary arteries during congestive heart failure. *J Clin Invest* 1994;93:165–71.
88. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* 1990;66:1561–75.
89. Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* 2009;135:794–804.
90. Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, Bezstarosti K, Verhoeven AJM, Duncker DJ, Helbing W a, Lamers JMJ. Time dependent changes in cytoplasmic proteins of the right ventricle during prolonged pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:197–209.
91. Zaffran S. Right Ventricular Myocardium Derives From the Anterior Heart Field. *Circ Res* 2004;95:261–268.



92. Winter MM, Bouma BJ, Groenink M, Konings TC, Tijssen JGP, van Veldhuisen DJ, Mulder BJM. Latest insights in therapeutic options for systemic right ventricular failure: a comparison with left ventricular failure. *Heart* 2009;95:960–3.
93. Therrien J, Provost Y, Harrison J, Connelly M, Kaemmerer H, Webb GD. Effect of angiotensin receptor blockade on systemic right ventricular function and size: a small, randomized, placebo-controlled study. *Int J Cardiol* 2008;129:187–92.
94. van der Bom T, Winter MM, Bouma BJ, Groenink M, Vliegen HW, Pieper PG, van Dijk APJ, Sieswerda GT, Roos-Hesselink JW, Zwinderman AH, Mulder BJM. Effect of valsartan on systemic right ventricular function: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot trial. *Circulation* 2013;127:322–30.
95. Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:689–702.
96. Milger K, Felix JF, Voswinckel R, Sommer N, Franco OH, Grimminger F, Reichenberger F, Seeger W, Ghofrani HA, Gall H. Sildenafil versus nitric oxide for acute vasodilator testing in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 2015;5:305–12.
97. Kinsella JP, Cutter GR, Walsh WF, Gerstmann DR, Bose CL, Hart C, Sekar KC, Auten RL, Bhutani VK, Gerdes JS, George TN, Southgate WM, Carriedo H, Couser RJ, Mammel MC, Hall DC, Pappagallo M, Sardesai S, Strain JD, Baier M, Abman SH. Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure. *N Engl J Med* 2006;355:354–64.
98. Evgenov O V, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HHHW, Stasch J-P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:755–68.
99. Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 2002;105:2398–403.
100. Ichinose F, Roberts JD, Zapol WM. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential. *Circulation* 2004;109:3106–11.

101. Evgenov O V, Ichinose F, Evgenov N V, Gnoth MJ, Falkowski GE, Chang Y, Bloch KD, Zapol WM. Soluble guanylate cyclase activator reverses acute pulmonary hypertension and augments the pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in awake lambs. *Circulation* 2004;110:2253–9.
102. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336 ( Pt 1):1–17.
103. Schulman SP, Becker LC, Kass DA, Champion HC, Terrin ML, Forman S, Ernst K V, Kelemen MD, Townsend SN, Capriotti A, Hare JM, Gerstenblith G. L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA* 2006;295:58–64.
104. Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F, Böger RH. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65:51–9.
105. Wilson AM, Harada R, Nair N, Balasubramanian N, Cooke JP. L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation* 2007;116:188–95.
106. Dong J-Y, Qin L-Q, Zhang Z, Zhao Y, Wang J, Arigoni F, Zhang W. Effect of oral L-arginine supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Am Heart J* 2011;162:959–65.
107. Pernow J, Jung C. Arginase as a potential target in treatment of cardiovascular disease - Reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res* 2013;98:334–43.
108. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;33:829–37, 837a–837d.
109. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1620–4.

110. Moens AL, Leyton-Mange JS, Niu X, Yang R, Cingolani O, Arkenbout EK, Champion HC, Bedja D, Gabrielson KL, Chen J, Xia Y, Hale AB, Channon KM, Halushka MK, Barker N, Wuyts FL, Kaminski PM, Wolin MS, Kass DA, Barouch LA. Adverse ventricular remodeling and exacerbated NOS uncoupling from pressure-overload in mice lacking the beta3-adrenoreceptor. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:576–85.
111. Lu Z, Xu X, Hu X, Zhu G, Zhang P, van Deel ED, French JP, Fassett JT, Oury TD, Bache RJ, Chen Y. Extracellular superoxide dismutase deficiency exacerbates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction. *Hypertension* 2008;51:19–25.
112. Niu X, Watts VL, Cingolani OH, Sivakumaran V, Leyton-Mange JS, Ellis CL, Miller KL, Vandegaer K, Bedja D, Gabrielson KL, Paolocci N, Kass DA, Barouch LA. Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:1979–87.
113. Huang Q, Zhou HJ, Zhang H, Huang Y, Hinojosa-Kirschenbaum F, Fan P, Yao L, Belardinelli L, Tellides G, Giordano FJ, Budas GR, Min W. Thioredoxin-2 inhibits mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis stress kinase-1 activity to maintain cardiac function. *Circulation* 2015;131:1082–97.
114. Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tudor RM, Hopken MW, Flores SC, Voelkel NF. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:764–9.
115. Maulik SK, Kumar S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. *Toxicol Mech Methods* 2012;22:359–66.
116. Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, Habibi J, Dellsperger KC. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol* 2010;2:316–24.
117. Chen C-A, Wang T-Y, Varadharaj S, Reyes LA, Hemann C, Talukder MAH, Chen Y-R, Druhan LJ, Zweier JL. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature* 2010;468:1115–8.
118. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel J-L, Hasenfuss G, Shah AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2164–2171.

119. Grieve DJ, Byrne JA, Siva A, Layland J, Johar S, Cave AC, Shah AM. Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:817–26.
120. Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, Berger RD, Rosas GO, Kobeissi ZA, Marban E, Hare JM. Allopurinol Improves Myocardial Efficiency in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 2001;104:2407–2411.
121. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006;58:87–114.
122. Schwarzer M, Osterholt M, Lunkenbein A, Schrepper A, Amorim P, Doenst T. Mitochondrial reactive oxygen species production and respiratory complex activity in rats with pressure overload-induced heart failure. *J Physiol* 2014;592:3767–82.
123. Irvine JC, Ganthavee V, Love JE, Alexander AE, Horowitz JD, Stasch J-P, Kemp-Harper BK, Ritchie RH. The soluble guanylyl cyclase activator bay 58-2667 selectively limits cardiomyocyte hypertrophy. *PLoS One* 2012;7:e44481.
124. Brandes RP, Takac I, Schröder K. No superoxide--no stress?: Nox4, the good NADPH oxidase! *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1255–7.
125. Voelkel NF, Bogaard HJ, Al Hussein A, Farkas L, Gomez-Arroyo J, Natarajan R. Antioxidants for the treatment of patients with severe angioproliferative pulmonary hypertension? *Antioxid Redox Signal* 2013;18:1810–7.
126. Wong C-M, Bansal G, Pavlickova L, Marcocci L, Suzuki YJ. Reactive oxygen species and antioxidants in pulmonary hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:1789–96.
127. Alkaitis MS, Crabtree MJ. Recoupling the cardiac nitric oxide synthases: tetrahydrobiopterin synthesis and recycling. *Curr Heart Fail Rep* 2012;9:200–10.
128. Yoshioka K, Otani H, Shimazu T, Fujita M, Iwasaka T, Shiojima I. Sepiapterin prevents left ventricular hypertrophy and dilatatory remodeling induced by pressure overload in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;309:H1782–91.

129. Cosentino F, Hürlimann D, Delli Gatti C, Chenevard R, Blau N, Alp NJ, Channon KM, Eto M, Lerch P, Enseleit F, Ruschitzka F, Volpe M, Lüscher TF, Noll G. Chronic treatment with tetrahydrobiopterin reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in hypercholesterolaemia. *Heart* 2008;94:487–92.
130. Cunnington C, Van Assche T, Shirodaria C, Kylintireas I, Lindsay AC, Lee JM, Antoniades C, Margaritis M, Lee R, Cerrato R, Crabtree MJ, Francis JM, Sayeed R, Ratnatunga C, Pillai R, Choudhury RP, Neubauer S, Channon KM. Systemic and vascular oxidation limits the efficacy of oral tetrahydrobiopterin treatment in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2012;125:1356–66.
131. Saavedra WF, Paolocci N, St John ME, Skaf MW, Stewart GC, Xie J-S, Harrison RW, Zeichner J, Mudrick D, Marbán E, Kass DA, Hare JM. Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:297–304.
132. Xu X, Hu X, Lu Z, Zhang P, Zhao L, Wessale JL, Bache RJ, Chen Y. Xanthine oxidase inhibition with febuxostat attenuates systolic overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *J Card Fail* 2008;14:746–53.
133. van Empel VPM, Bertrand AT, van Oort RJ, van der Nagel R, Engelen M, van Rijen H V, Doevendans PA, Crijns HJ, Ackerman SL, Sluiter W, De Windt LJ. EUK-8, a superoxide dismutase and catalase mimetic, reduces cardiac oxidative stress and ameliorates pressure overload-induced heart failure in the harlequin mouse mutant. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:824–32.
134. Maltecca F, Casari G. In vivo detection of oxidized proteins: a practical approach to tissue-derived mitochondria. *Methods Mol Biol* 2010;648:257–67.
135. CHANCE B, WILLIAMS GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* 1955;217:409–27.
136. Palacios-Callender M, Quintero M, Hollis VS, Springett RJ, Moncada S. Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7630–5.
137. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 1999;66:17–25.

138. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res* 2007;75:283–90.
139. Gomez-Arroyo J, Mizuno S, Szczepanek K, Van Tassell B, Natarajan R, dos Remedios CG, Drake JI, Farkas L, Kraskauskas D, Wijesinghe DS, Chalfant CE, Bigbee J, Abbate A, Lesnefsky EJ, Bogaard HJ, Voelkel NF. Metabolic gene remodeling and mitochondrial dysfunction in failing right ventricular hypertrophy secondary to pulmonary arterial hypertension. *Circ Heart Fail* 2013;6:136–44.
140. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schreppe A, Amorim PA, Schoepe M, Nguyen TD, Mohr FW, Khalimonchuk O, Weimer BC, Doenst T. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 2010;85:376–84.
141. Kreymborg KG, Uchida S, Gellert P, Schneider A, Boettger T, Voswinckel R, Wietelmann A, Szibor M, Weissmann N, Ghofrani AH, Schermuly R, Schranz D, Seeger W, Braun T. Identification of right heart-enriched genes in a murine model of chronic outflow tract obstruction. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49:598–605.
142. 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. Mitochondrial hyperpolarization in pulmonary vascular remodeling. Mitochondrial uncoupling protein deficiency as disease model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:358–67.
143. Dromparis P, Paulin R, Sutendra G, Qi AC, Bonnet S, Michelakis ED. Uncoupling protein 2 deficiency mimics the effects of hypoxia and endoplasmic reticulum stress on mitochondria and triggers pseudohypoxic pulmonary vascular remodeling and pulmonary hypertension. *Circ Res* 2013;113:126–36.
144. CHANCE B, WILLIAMS GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *J Biol Chem* 1955;217:429–38.
145. Stacpoole PW. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* 1989;38:1124–44.

146. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu X-C, Dyck JRB, Moudgil R, Hopkins TA, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Waite R, Archer SL. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation* 2002;105:244–50.
147. McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JRB, Haromy A, Hashimoto K, Michelakis ED. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res* 2004;95:830–40.
148. Chen X, Chen H, Deng R, Shen J. Pros and cons of current approaches for detecting peroxynitrite and their applications. *Biomed J* 2014;37:120–6.
149. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of Detection of Vascular Reactive Species: Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite. *Circ Res* 2001;89:224–236.
150. Lopez BL, Liu GL, Christopher TA, Ma XL. Peroxynitrite, the product of nitric oxide and superoxide, causes myocardial injury in the isolated perfused rat heart. *Coron Artery Dis* 8:149–53.
151. Kooy NW, Lewis SJ. Elevation in arterial blood pressure following the development of tachyphylaxis to peroxynitrite. *Eur J Pharmacol* 1996;307:R5–7.
152. Kooy NW, Lewis SJ. The peroxynitrite product 3-nitro-L-tyrosine attenuates the hemodynamic responses to angiotensin II in vivo. *Eur J Pharmacol* 1996;315:165–70.
153. Kooy NW, Lewis SJ. Nitrotyrosine attenuates the hemodynamic effects of adrenoceptor agonists in vivo: relevance to the pathophysiology of peroxynitrite. *Eur J Pharmacol* 1996;310:155–61.
154. Benkusky NA, Lewis SJ, Kooy NW. Peroxynitrite-mediated attenuation of alpha- and beta-adrenoceptor agonist-induced vascular responses in vivo. *Eur J Pharmacol* 1999;364:151–8.
155. Benkusky NA, Lewis SJ, Kooy NW. Attenuation of vascular relaxation after development of tachyphylaxis to peroxynitrite in vivo. *Am J Physiol* 1998;275:H501–8.

156. Graves JE, Lewis SJ, Kooy NW. Peroxynitrite-mediated vasorelaxation: evidence against the formation of circulating S-nitrosothiols. *Am J Physiol* 1998;274:H1001–8.
157. Pall ML. The NO/ONOO-cycle as the central cause of heart failure. *Int J Mol Sci* 2013;14:22274–330.
158. Calcerrada P, Peluffo G, Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 2011;17:3905–32.
159. Liles J, Oliver J, Chi L, Phan D, Dhalla A, Belardinelli L. A Small Molecule Inhibitor Of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 ( ask1 ) Reduces Experimental Pulmonary Hypertension And Right-Ventricular ( rv ) Dysfunction. 1:444217.
160. Effects of Apoptosis Signal- Regulating Kinase 1 (ASK1) Inhibition in Experimental Pressure Overload-Induced Right Ventricular Dysfunction (ATS Journals). *Am Thorac Soc Int Conf Meet Abstr at* <[http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2015.191.1\\_MeetingAbstracts.A5541](http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2015.191.1_MeetingAbstracts.A5541)>.
161. Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2001;2:222–8.
162. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997;275:90–4.
163. Soga M, Matsuzawa A, Ichijo H. Oxidative Stress-Induced Diseases via the ASK1 Signaling Pathway. *Int J Cell Biol* 2012;2012:439587.
164. Nagai H, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* 2007;40:1–6.
165. Laubach VE, Shesely EG, Smithies O, Sherman PA. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10688–92.
166. Borgdorff MA, Bartelds B, Dickinson MG, Steendijk P, Berger RMF. A cornerstone of heart failure treatment is not effective in experimental right ventricular failure. *Int J Cardiol* 2013;169:183–9.



167. Bartelds B, Borgdorff M a., Smit-Van Oosten A, Takens J, Boersma B, Nederhoff MG, Elzenga NJ, Van Gilst WH, De Windt LJ, Berger RMF. Differential responses of the right ventricle to abnormal loading conditions in mice: Pressure vs. volume load. *Eur J Heart Fail* 2011;13:1275–1282.
168. Szulcek R, Happé CM, Rol N, Fontijn RD, Dickhoff C, Hartemink KJ, Grünberg K, Tu L, Timens W, Nossent GD, Paul MA, Leyen TA, Horrevoets AJ, de Man FS, Guignabert C, Yu PB, Vonk-Noordegraaf A, van Nieuw Amerongen GP, Bogaard HJ. Delayed Microvascular Shear-adaptation in Pulmonary Arterial Hypertension: Role of PECAM-1 Cleavage. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;doi:10.1164/rccm.201506-1231OC.
169. de Raaf MA, Kroeze Y, Middelman A, de Man FS, de Jong H, Vonk-Noordegraaf A, de Korte C, Voelkel NF, Homberg J, Bogaard HJ. Serotonin transporter is not required for the development of severe pulmonary hypertension in the Sugden hypoxia rat model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;309:L1164–73.
170. Andersen S, Schultz JG, Andersen A, Ringgaard S, Nielsen JM, Holmboe S, Vildbrad MD, de Man FS, Bogaard HJ, Vonk-Noordegraaf A, Nielsen-Kudsk JE. Effects of bisoprolol and losartan treatment in the hypertrophic and failing right heart. *J Card Fail* 2014;20:864–73.
171. Novoyatleva T, Schymura Y, Janssen W, Strobl F, Swiercz JM, Patra C, Posern G, Wietelmann A, Zheng TS, Schermuly RT, Engel FB. Deletion of Fn14 receptor protects from right heart fibrosis and dysfunction. *Basic Res Cardiol* 2013;108:325.
172. Vliegen HW, van der Laarse A, Cornelisse CJ, Eulderink F. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J* 1991;12:488–94.
173. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* 2010;225:631–7.
174. Marro ML, Peiró C, Panayiotou CM, Baliga RS, Meurer S, Schmidt HHHW, Hobbs AJ. Characterization of the Human  $\alpha_1\beta_1$  Soluble Guanylyl Cyclase Promoter: KEY ROLE FOR NF- $\kappa$ B(p50) AND CCAAT-BINDING FACTORS IN REGULATING EXPRESSION OF THE NITRIC OXIDE RECEPTOR. *J Biol Chem* 2008;283:20027–20036.

175. Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, Veit F, Kwapiszewska G, Weisel FC, Milger K, Egemnazarov B, Turowska A, Fuchs B, Nikam S, Roth M, Sydykov A, Medebach T, Klepetko W, Jaksch P, Dumitrascu R, Garn H, Voswinckel R, Kostin S, Seeger W, Schermuly RT, Grimminger F, Ghofrani H a, Weissmann N. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 2011;147:293–305.
176. Hampl V, Bíbová J, Banasová A, Uhlík J, Miková D, Hnilicková O, Lachmanová V, Herget J. Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L11–20.
177. Kojonazarov B, Luitel H, Sydykov A, Dahal BK, Paul-Clark MJ, Bonvini S, Reed A, Schermuly RT, Mitchell JA. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  agonist GW0742 has direct protective effects on right heart hypertrophy. *Pulm Circ* 2013;3:926–35.
178. Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 1992;105:575–80.
179. Shindo T, Ikeda U, Ohkawa F, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. Nitric oxide synthesis in cardiac myocytes and fibroblasts by inflammatory cytokines. *Cardiovasc Res* 1995;29:813–9.
180. Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ Res* 1999;85:829–40.
181. Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM, Billiar TR, Geller DA. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1998;273:15148–56.
182. Spink J, Cohen J, Evans TJ. The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 1995;270:29541–7.
183. Javan H, Szucsik AM, Li L, Schaaf CL, Salama ME, Selzman CH. Cardiomyocyte p65 nuclear factor- $\kappa$ B is necessary for compensatory adaptation to pressure overload. *Circ Heart Fail* 2015;8:109–18.

184. Hingtgen SD, Li Z, Kutschke W, Tian X, Sharma R V, Davisson RL. Superoxide scavenging and Akt inhibition in myocardium ameliorate pressure overload-induced NF- $\kappa$ B activation and cardiac hypertrophy. *Physiol Genomics* 2010;41:127–36.
185. Zelarayan L, Renger A, Noack C, Zafiriou M-P, Gehrke C, van der Nagel R, Dietz R, de Windt L, Bergmann MW. NF- $\kappa$ B activation is required for adaptive cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2009;84:416–24.
186. Hattori Y, Kasai K, Gross SS. NO suppresses while peroxynitrite sustains NF- $\kappa$ B: a paradigm to rationalize cytoprotective and cytotoxic actions attributed to NO. *Cardiovasc Res* 2004;63:31–40.
187. Bar-Shai M, Reznick AZ. Peroxynitrite induces an alternative NF- $\kappa$ B activation pathway in L8 rat myoblasts. *Antioxid Redox Signal* 8:639–52.
188. Jung F, Palmer L a, Zhou N, Johns R a. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res* 2000;86:319–325.
189. Zhang P, Xu X, Hu X, van Deel ED, Zhu G, Chen Y. Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res* 2007;100:1089–98.
190. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:662–80.
191. Berg K, Ericsson M, Lindgren M, Gustafsson H. A high precision method for quantitative measurements of reactive oxygen species in frozen biopsies. *PLoS One* 2014;9:e90964.
192. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 2007;49:717–27.
193. Burkard N, Rokita AG, Kaufmann SG, Hallhuber M, Wu R, Hu K, Hofmann U, Bonz A, Frantz S, Cartwright EJ, Neyses L, Maier LS, Maier SKG, Renné T, Schuh K, Ritter O. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. *Circ Res* 2007;100:e32–44.

194. Loyer X, Gómez AM, Milliez P, Fernandez-Velasco M, Vangheluwe P, Vinet L, Charue D, Vaudin E, Zhang W, Sainte-Marie Y, Robidel E, Marty I, Mayer B, Jaisser F, Mercadier J-J, Richard S, Shah AM, Bénitah J-P, Samuel J-L, Heymes C. Cardiomyocyte overexpression of neuronal nitric oxide synthase delays transition toward heart failure in response to pressure overload by preserving calcium cycling. *Circulation* 2008;117:3187–98.
195. Ruetten H, Dimmeler S, Gehring D, Ihling C, Zeiher AM. Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload. *Cardiovasc Res* 2005;66:444–53.
196. Ichinose F, Bloch KD, Wu JC, Hataishi R, Aretz HT, Picard MH, Scherrer-Crosbie M. Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1070–5.
197. van Deel ED, Octavia Y, de Boer M, Juni RP, Tempel D, van Haperen R, de Crom R, Moens AL, Merkus D, Duncker DJ. Normal and high eNOS levels are detrimental in both mild and severe cardiac pressure-overload. *J Mol Cell Cardiol* 2015;88:145–54.
198. Hunter RA, Storm WL, Coneski PN, Schoenfisch MH. Inaccuracies of nitric oxide measurement methods in biological media. *Anal Chem* 2013;85:1957–63.
199. Iyer LM, Anantharaman V, Aravind L. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics* 2003;4:5.
200. Karow DS, Pan D, Davis JH, Behrends S, Mathies RA, Marletta MA. Characterization of functional heme domains from soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 2005;44:16266–74.
201. Masuyama H, Tsuruda T, Sekita Y, Hatakeyama K, Imamura T, Kato J, Asada Y, Stasch J-P, Kitamura K. Pressure-independent effects of pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase on fibrosis in pressure-overloaded rat heart. *Hypertens Res* 2009;32:597–603.

202. Gheorghide M, Marti CN, Sabbah HN, Roessig L, Greene SJ, Böhm M, Burnett JC, Campia U, Cleland JGF, Collins SP, Fonarow GC, Levy PD, Metra M, Pitt B, Ponikowski P, Sato N, Voors AA, Stasch J-P, Butler J. Soluble guanylate cyclase: a potential therapeutic target for heart failure. *Heart Fail Rev* 2013;18:123–34.
203. Dikalov SI, Li W, Mehranpour P, Wang SS, Zafari AM. Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. *Biochem Pharmacol* 2007;73:972–80.
204. Romanyukha L, Bentley T, Mitchell C, Romanyukha A, Bunger R. Electron paramagnetic resonance (EPR) recording at “standard” 20 mW underestimates reactive oxygen species (ROS) in fresh rat blood using CPH and CMH as spin traps. *FASEB J* 2006;20:LB11–d–12.
205. Pitman K. Superoxide and Nitric Oxide in Mechanisms for the Sustained Elimination of Hyper Radiosensitivity : An ESR Spin Trapping Study. 2013;at <<https://www.duo.uio.no/handle/10852/37171>>.
206. Veit F, Pak O, Egemnazarov B, Roth M, Kosanovic D, Seimetz M, Sommer N, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Brandes RP, Schermuly RT, Weissmann N. Function of NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial smooth muscle cells after monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:2213–31.
207. Kapur NK, Paruchuri V, Aronovitz MJ, Qiao X, Mackey EE, Daly GH, Ughreja K, Levine J, Blanton R, Hill NS, Karas RH. Biventricular Remodeling in Murine Models of Right Ventricular Pressure Overload. *PLoS One* 2013;8.:
208. Feng Q, Lu X, Jones DL, Shen J, Arnold JMO. Increased Inducible Nitric Oxide Synthase Expression Contributes to Myocardial Dysfunction and Higher Mortality After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* 2001;104:700–704.
209. Jones SP, Greer JJM, Ware PD, Yang J, Walsh K, Lefer DJ. Deficiency of iNOS does not attenuate severe congestive heart failure in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H365–70.
210. Liu Y-H, Carretero OA, Cingolani OH, Liao T-D, Sun Y, Xu J, Li LY, Pagano PJ, Yang JJ, Yang X-P. Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H2616–23.

211. Heger J, Gödecke A, Flögel U, Merx MW, Molojavyi A, Kühn-Velten WN, Schrader J. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction. *Circ Res* 2002;90:93–99.
212. Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, Schulz R, Butany J, Stewart DJ, Husain M. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation , heart block , and sudden death. 2002;109:735–743.
213. Reinartz M, Molojavyi A, Moellendorf S, Hohlfeld T, Heger J, Gödecke A.  $\beta$ -Adrenergic signaling and response to pressure overload in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of inducible NO synthase. *Nitric Oxide* 2011;25:11–21.
214. Hataishi R, Rodrigues AC, Morgan JG, Ichinose F, Derumeaux G, Bloch KD, Picard MH, Scherrer-Crosbie M. Nitric oxide synthase 2 and pressure-overload-induced left ventricular remodelling in mice. *Exp Physiol* 2006;91:633–9.
215. Tian B, Liu J, Bitterman PB, Bache RJ. Mechanisms of cytokine induced NO-mediated cardiac fibroblast apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1958–67.
216. Kim NN, Villegas S, Summerour SR, Villarreal FJ. Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:457–66.
217. Miller FJ, Filali M, Huss GJ, Stanic B, Chamseddine A, Barna TJ, Lamb FS. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circ Res* 2007;101:663–71.
218. Choi B-M, Pae H-O, Jang S II, Kim Y-M, Chung H-T. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol* 2002;35:116–26.
219. Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1421–41.
220. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:9813–7.

221. Kazakov A, Hall R, Jagoda P, Bachelier K, Müller-Best P, Semenov A, Lammert F, Böhm M, Laufs U. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase induces and enhances myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res* 2013;100:211–21.
222. Chen J-H, Lin H-H, Chiang T-A, Hsu J-D, Ho H-H, Lee Y-C, Wang C-J. Gaseous nitrogen oxide promotes human lung cancer cell line A549 migration, invasion, and metastasis via iNOS-mediated MMP-2 production. *Toxicol Sci* 2008;106:364–75.
223. Gupta SK, Vlahakis NE. Integrin alpha9beta1 mediates enhanced cell migration through nitric oxide synthase activity regulated by Src tyrosine kinase. *J Cell Sci* 2009;122:2043–54.
224. Torrisi JS, Hespe GE, Cuzzone DA, Savetsky IL, Nitti MD, Gardenier JC, Nores GDG, Jowhar D, Kataru RP, Mehrara BJ. Inhibition of Inflammation and iNOS Improves Lymphatic Function in Obesity. *Sci Rep* 2016;6:19817.
225. Huang H, Koelle P, Fendler M, Schröttle A, Czihal M, Hoffmann U, Conrad M, Kuhlencordt PJ. Induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by oxLDL inhibits macrophage derived foam cell migration. *Atherosclerosis* 2014;235:213–22.
226. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007;13:952–61.
227. Goumans M-J, van Zonneveld AJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis? *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:293–8.
228. Takeda N, Manabe I. Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling. *Int J Inflamm* 2011;2011:535241.
229. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett* 1999;448:206–10.
230. Lijnen P, Petrov V, van Pelt J, Fagard R. Inhibition of superoxide dismutase induces collagen production in cardiac fibroblasts. *Am J Hypertens* 2008;21:1129–36.

231. Akool E-S, Kleinert H, Hamada FMA, Abdelwahab MH, Förstermann U, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* 2003;23:4901–16.
232. Zaragoza C, Balbín M, López-Otín C, Lamas S. Nitric oxide regulates matrix metalloprotease-13 expression and activity in endothelium. *Kidney Int* 2002;61:804–8.
233. Eberhardt W, Beeg T, Beck KF, Walpen S, Gauer S, Böhles H, Pfeilschifter J. Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int* 2000;57:59–69.
234. Eder C. Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology* 2009;214:543–53.
235. Satoh T, Otsuka A, Contassot E, French LE. The inflammasome and IL-1 $\beta$ : implications for the treatment of inflammatory diseases. *Immunotherapy* 2015;7:243–54.
236. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519–50.



## 10. Publikationen und Konferenzbeiträge

### PUBLIKATIONEN

Janssen W, Schymura Y, Novoyatleva T, Kojonazarov B, **Boehm M**, Wietelmann A, Luitel H, Murmann K, Krompiec DR, Tretyn A, Pullamsetti SS, Weissmann N, Seeger W, Ghofrani HA, Schermuly RT. *5-HT<sub>2B</sub> Receptor Antagonists Inhibit Fibrosis and Protect from RV Heart Failure*. **Biomed Res Int** **2015**;2015:438403.

Osterloh M, **Boehm M**, Kalbe B, Osterloh S, Hatt H. *Identification and functional characterization of TRPA1 in human myoblasts*. **Pflugers Arch** **2015**;doi:10.1007/s00424-015-1729-x.

Shi L, Kojonazarov B, Elgheznawy A, Popp R, Dahal BK, **Boehm M**, Pullamsetti SS, Ghofrani H-A, Gödecke A, Jungmann A, Katus HA, Müller OJ, Schermuly RT, Fisslthaler B, Seeger W, Fleming I. *miR-223-IGF-IR signaling in hypoxia- and load-induced right ventricular failure: a novel therapeutic approach*. **Cardiovasc Res** **2016**;doi:10.1093/cvr/cvw065.

### KONFERENZVORTRÄGE

**Boehm M** et al. (2016) *“Preventing excessive endogenous nitric oxide production attenuates pulmonary hypertension-associated right ventricular fibrotic remodeling”* **14. MBML Annual Conference, Rauschholzhausen, D, 2016**

**Boehm M** et al. (2016) *“Effects of Pharmacological Aldosterone Antagonism by Eplerenone on Pressure Overload-Induced Right Ventricular Dysfunction”* **ATS Annual Conference, San Francisco, USA, 2016**

**Boehm M** et al. (2015) *“Effects of inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) ablation on pressure overload-induced Right Ventricular dysfunction and remodeling”* **13. MBML Annual Conference, Rauschholzhausen, D, 2015**

### KONFERENZPOSTER

**Boehm M** et al. (2016) *“Genetic ablation of inducible nitric oxide synthase (NOS2) attenuates pulmonary hypertension-associated right ventricular fibrotic remodeling”* **Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS) Annual Retreat, Bad Nauheim, D, 2016**

**Boehm M** et al. (2016) *“Preventing excessive endogenous nitric oxide production attenuates pulmonary hypertension-associated right ventricular fibrotic remodeling”* **PH Global Science Forum 2016, Berlin, D, 2016**

**Boehm M** et al. (2015) *“Effects Of Apoptosis Signal- Regulating Kinase 1 (ASK1) Inhibition on Experimental Pressure Overload-Induced Right Ventricular Dysfunction”* **ERS Annual Conference, Amsterdam, NL, 2015**

**Boehm M** et al. (2015) "*Effects Of Apoptosis Signal- Regulating Kinase 1 (ASK1) Inhibition on Experimental Pressure Overload-Induced Right Ventricular Dysfunction*" **ATS Annual Conference, Denver, USA, 2015**

**Boehm M** et al. (2015) "*Effects of Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2) ablation on experimental pressure overload-induced right ventricular dysfunction*"

**4. Forschungswerkstatt PH, Berlin, D, 2015**

**Boehm M** et al. (2014) "*Role of nitric oxide synthases (NOS) in right ventricular insufficiency*" **12. MBML Annual Conference, Rauschholzhausen, D, 2014**

## 11. Preise und Auszeichnungen

- LOEWE** Stipendium im Forschungsförderungsprogramm LOEWE  
(*Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-  
ökonomischer Exzellenz*)
- Auszeichnung** Im Rahmen des ersten Examens des Graduiertenkollegs  
*Molecular Biology and Medicine of the Lung* honoriert mit einem  
Reisestipendium
- Auszeichnung** Im Rahmen des zweiten Examens des Graduiertenkollegs  
*Molecular Biology and Medicine of the Lung* honoriert mit einem  
Reisestipendium
- Auszeichnung** Im Rahmen des dritten Examens des Graduiertenkollegs  
*Molecular Biology and Medicine of the Lung* honoriert mit einem  
Reisestipendium
- Poster Preis** Im Rahmen der 4. Forschungswerkstatt PH 2015
- CYCS** Mitglied des PVRI Komitees für Nachwuchswissenschaftler und  
Ärzte

## **12. Erklärung**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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 Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.

Mario Böhm, Gießen 2016

### 13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die auf unterschiedlichster Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich bedanke mich bei...

... Prof. Ralph Schermuly für die Vergabe des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die stetige Unterstützung, zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

... Prof. Tina Trenczek für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

... allen Mitgliedern der AG Schermuly im BFS und ECCPS für die angenehme gemeinsame Zeit.

... Bakyt für die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, den freundschaftlichen Umgang sowie Unterstützung, wann immer nötig.

... Tanya und Flo, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen wäre.

... Tine für all die Hilfsbereitschaft, Geduld und Unterstützung.

... Svenja und Astrid für die Begleitung während der gesamten Zeit.

... Kirsten, Wiebke, Janina, Kerstin und Julia mit denen alles begann.

Der größte Dank, für den es keine Worte gibt, gilt Tanja, die mich bedingungslos unterstützt, meine Launen ertragen und mir stets Vertrauen sowie Motivation gegeben hat.