Aus der Abteilung
Medizinische Klinik und Poliklinik II/V, Innere Medizin
am Fachbereich Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Regulation von NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen in einem Zigarettenrauch-induzierten COPD-Mausmodell

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

(Fachbereich Biologie und Chemie)

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Michael Seimetz

aus Merzig

Gießen 2010

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molecular Biology and Medicine of the Lung“ (MBML) am Institut für Innere Medizin – Medizinische Klinik II/V des Universitätsklinikums Giessen und Marburg (UGLC, University of Giessen Lung Center) in der Zeit von Juli 2006 bis Mai 2010 unter der Leitung von Prof. Dr. Norbert Weißmann angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Volkmar Wolters
Institut für Tierökologie, FB 08
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Clauss
Institut für Tierphysiologie, FB 08
Justus-Liebig-Universität Gießen
Wartweg 95, 35392 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann
Lungenzentrum der Universität Gießen
(University of Giessen Lung Center, UGLC)
Medizinische Klinik II/V
Klinikstr. 36, 35392 Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2010

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, Mai 2010

_____

Michael Seimetz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis IV

1 Einleitung 1
1.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) 1
1.1.1 Definition 1
1.1.2 Epidemiologie 3
1.1.3 Risikofaktoren 4
1.1.3.1 Tabakrauch 4
1.1.3.2 Genetische Faktoren 4
1.1.3.3 Weitere Faktoren 6
1.1.4 Pathogenese 6
1.1.4.1 Proteasen-Antiproteasen-Dysbalance 7
1.1.4.2 Oxidativer Stress 8
1.1.4.3 Pulmonale Entzündung 11
1.1.4.3.1 Makrophagen 11
1.1.4.3.2 Neutrophile 13
1.1.4.3.3 T-Lymphozyten 14
1.1.5 Pharmakotherapie und Prävention von COPD 15
1.1.6 NADPH-Oxidasen als Hauptquellen für ROS-Bildung 18
1.1.6.1 NOX2-gekoppelte NADPH-Oxidasen 20
1.1.6.2 NOX1-gebundene NADPH-Oxidasen 23
1.1.6.3 NOX4-gebundene NADPH-Oxidasen 24
1.2 Zielsetzung dieser Arbeit 26

2 Material und Methoden 27
2.1 Material 27
2.1.1 Geräte 27
2.1.2 Chemikalien 28
2.1.3 Verbrauchsmaterialien 28
2.1.4 Enzyme und Größenstandards 29
2.1.5 Kits und Assays 29
2.1.6 Verwendete Primer 30
2.1.7 Verwendete Antikörper 31
2.1.8 Verwendete Plasmide 33
2.2 Methoden 33
2.2.1 Tiere 33
2.2.2 Rauchexposition 33
2.2.3 Maus-/Gewebepräparation 34
2.2.4 Alveolarmorphometrie 34
2.2.5 Vaskuläre Morphometrie 35
2.2.6 Morphometrie des vaskulären Lumens 36
2.2.7 Verhältnis Anzahl der Alveolen zu Anzahl der Gefäße 36

2.2.8 *In vivo* Hämodynamik 37
2.2.9 Herz-Ratio-Messungen 37
2.2.10 Molekularbiologische Methoden 37
2.2.10.1 Laser-Mikrodissektion 37
2.2.10.2 RNA-Isolation, Präamplifikation und cDNA-Synthese 38
2.2.10.3 Quantitative Real-Time PCR 39
2.2.10.4 Agarose-Gelelektrophorese 40
2.2.10.5 Microarray-Analyse von mikrodissektierten Alveolarsepten 41
2.2.10.6 Nicht-isotopische *in situ* Hybridisierung (NISH) kombiniert mit Immunfluoreszenz auf Maus-Lungenschnitten 43
2.2.10.7 Immunfluoreszenz zur Lokalisation von Proteinen 45
2.2.10.8 Immunhistochemie 45
2.2.10.9 Untersuchung der Proteinexpression 46
2.2.10.9.1 Proteinextraktion aus Gewebe 46
2.2.10.9.2 Proteinextraktion aus Zellen 46
2.2.10.9.3 Bestimmung der Proteinkonzentration 47
2.2.10.9.4 SDS-PAGE 47
2.2.10.9.5 Western Blot 48
2.2.10.10 Zellkultur-Experimente 49
2.2.10.10.1 CMT64/61-Zellen 49
2.2.11.10.2 Isolierung und Kultivierung von präkapillären, vaskulären glatten Muskelzellen 50
2.2.10.10.3 Transfektionen von CMTs mit Plasmiden 52
2.2.11 Patienten-Merkmale 53
2.2.12 Statistische Analyse 54

3 Ergebnisse 55
3.1 Regulation der NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen während der Entwicklung der COPD in Wildtyp-Mäusen 55
3.2 Regulation der NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen bei COPD-56Patienten GOLD-IV 56
3.3 Screening von NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) 57
3.4 Microarray-Analyse aus RNA von mikrodissektierten alveolären Septen 58
3.4.1 Expression der NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen 59
3.5 Alveoläre und vaskuläre Charakterisierung von WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen 60
3.5.1 Nachweis der Emphysementwicklung 60
3.5.2 Entwicklung von pulmonaler Hypertonie 61
3.5.2.1 Hämodynamik und Herzratio 61
3.5.3 Vaskuläre Veränderungen in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen 62
3.5.3.1 Muskularisierungsgrad und vaskuläres Lumen 62
3.5.3.2 Verhältnis Alveolen zu Gefäßen 64
3.5.4 Lungenfunktionstests (*Compliance*, Tidalvolumen, *Resistance*) 65
3.6 Lokalisation von gp91^{phox} in WT und COPD-Patienten und Vergleich der Expressionsintensitäten vor und nach Rauchexposition 66
3.7 Screening von NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen in Lungen-homogenat von gp91$^{phox-/-}$-Mäusen und Überprüfung von Konterregulation 67
3.8 Nähere Untersuchung von NOXA1 und NOXO1 69

3.8.1 Proteinexpression in Lungenhomogenat von WT und gp91$^{phox-/-}$ 69
3.8.2 Proteinexpression von NOXA1 und NOXO1 in COPD-Patienten 70
3.8.3 Lokalisation von NOXA1 und NOXO1 71
3.8.3.1 in der Lunge von WT und gp91$^{phox-/-}$ 71
3.8.3.2 in VSMCs vom WT 73
3.8.4 NOXA1- und NOXO1-Expression in mikrodissektierten Gefäßen 74
3.9 Nähere Untersuchung von iNOS und eNOS 75
3.9.1 Lokalisation von iNOS und eNOS in der Lunge auf mRNA- und Proteinebene 75
3.9.2 Expression von iNOS und eNOS auf mRNA- und Proteinebene im Mausmodell 77
und in COPD (GOLD-IV)-Patienten 77
3.10 Genauere Betrachtung des gp91$^{phox-/-}$-Phänotyps auf Basis molekularer 78
Untersuchungen 78
3.10.1 Genexpressionsanalyse von Homogenat des rechten Ventrikels 79
3.10.2 Co-Lokalisation von iNOS und NOXA1/NOXO1/gp91^{phox} 80
3.10.3 Untersuchung des MAPK-Signalwegs in WT und gp91$^{phox-/-}$ 82
3.10.4 Expression von Nitrotyrosin in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen 84
3.10.5 Proliferation in WT und gp91$^{phox-/-}$ reflektiert durch Expression von PCNA 85
3.10.6 MMP12-Vorkommen in WT und gp91$^{phox-/-}$ 86

4 Diskussion 87
4.1 Chronische Tabakrauch-Exposition und Deletion von gp91^{phox} führen zu 88
strukturellen und funktionalen Veränderungen in der Mauslunge
4.1.1 Beteiligung von MMP-12 bei der Emphysementwicklung in WT und gp91^{phox}-KO ... 91
4.2 Andauernde Rauchexposition führt zu pulmonaler Hypertonie und Rechtsherzhypertrophie in Wildtyp und gp91^{phox}-Knockout, nicht jedoch in gp91^{phox}-Kontrollmäusen 92
4.3 Vaskuläre Veränderungen aufgrund von Rauchexposition und/oder 94
Deletion von gp91^{phox}
4.4 Heraufregulationen von NOXA1 und vor allem von NOXO1 scheinen auf Seite der NADPH-Oxidasen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der COPD zu spielen. ... 96
4.5 Heraufregulationen von iNOS, NOXA1 und NOXO1 und deren Zusammenspiel durch Co-Lokalisation führen zu erhöhter Nitrolysierung von Proteinen durch Nitrotyrosin. 99
4.6 Rauchexposition und Deletion von gp91^{phox} bedingen Veränderungen 101
des MAPK-Signalwegs

5 Ausblick 105
6 Zusammenfassung 107
7 Summary 109
8 Literaturverzeichnis 111
9 Curriculum vitae 153
10 Publikationen 155
10.1 Originalarbeiten 155
10.2 Vorträge und Posterbeiträge 155
11 Danksagung 158

Abkürzungsverzeichnis

AATD	α1-Antitrypsin-Defizienz
Abb.	Abbildung
AM	Alveolarmakrophagen
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	Chemokin (C-C Motiv) Ligand
CCR	Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor
cDNA	*complementary* DNA
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CXCL	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand
CXCR	Chemokin (C-X-C Motiv) Rezeptor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
ERK1/2	*Extracellular Signal-Regulated Kinases* 1 und 2
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fetales Kälberserum (*Fetal Calf Serum*)
FEV1	Einsekundenkapazität (engl.: *Forced Expiratory Volume in 1 second*)
GDP	Guanindiphosphat
GTP	Guanintriphosphat
GOLD	*Global Iniative for Chronic Obstructive Lung Disease*
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MLI	*Mean linear Intersept*
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	*messenger*-RNA
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RIPA	*Radioimmunoprecipitation assay buffer*
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*)
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Druck
SAP	systemisch-arterieller Druck
SDS	Natriumdodecylsulfat (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
SLPI	sekretorischer Leukozytenprotease-Inhibitor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP	*Tissue inhibitor of matrixmetallproteinase*
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht (*weight*) pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

1.1.1 Definition

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*; COPD) ist laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) ein Krankheitszustand, der durch eine Einschränkung des Atemflusses charakterisiert und nicht völlig reversibel ist. Diese Limitation des Atemflusses verläuft in den meisten Fällen progressiv und ist assoziiert mit einer inadäquaten und entzündlichen Immunantwort der Lungen auf schädigende Partikel oder Gase[1;2]. Die Inflammation besteht dabei chronisch und betrifft sowohl die großen als auch die kleinen Atemwege, wobei morphologische Veränderungen in den zentralen (chronische Bronchitis) und peripheren Atemwegen (*Small Airway Disease*) und im Lungenparenchym stattfinden können[3]. Die wichtigsten Symptome der COPD sind **A**uswurf, **H**usten und **A**temnot – oft als „AHA"-Symptome bezeichnet (www.COPD-aktuell.de).

Im Zuge der Erkrankung kommt es zur massiven Schleimproduktion in den Atemwegen, damit einhergehend chronischer Husten und zunehmende Atemnot bei körperlicher Belastung. Bei der COPD handelt es sich um ein komplexes Symptomgebilde, wobei pathophysiologisch verschiedene Zustände auftreten können: chronische Bronchitis und Bronchiolitis mit Fibrose, das pulmonale Emphysem mit Vergrößerung des Luftraumes und Destruktion des Lungenparenchyms, der Verlust von Lungenelastizität und die Obstruktion bzw. der Verschluss kleiner Atemwege[4]. So kann es sein, dass COPD-Patienten unter einer Kombination dieser Erscheinungen mit und ohne systemischer Manifestation der Erkrankung leiden[5]. Diese unterschiedlichen Erscheinungsbilder basieren auf große Variationen innerhalb der menschlichen Population[6].

Chronische Bronchitis ist gemäß WHO definiert als vermehrte Sekretproduktion der Bronchien mit produktivem Husten über mindestens drei Monate eines Jahres in zwei aufeinander folgenden Jahren. Diese erhöhte Schleimproduktion ist bedingt durch eine Hypertrophie der Schleimdrüsen. Die mit der chronischen Bronchitis assoziierte Entzündung ist im Epithel der zentralen Atemwege lokalisiert und korreliert mit weitgehender Zerstörung des Flimmerepithels sowie verminderter mukoziliärer *Clearance*[7]. Obwohl frühere Studien darauf hinwiesen, dass die

erhöhte Schleimsekretion keinen nennenswerten Einfluss auf physiologische Defekte und dem Fortschreiten der Atemwegsobstruktion hat[8;9], demonstrierten neuere Studien, dass die Schleimbildung durchaus ein Risikofaktor für die Verschlechterung der Lungenfunktion sein kann[10;11], wobei sich der Einfluss in erhöhtem Risiko zu Exazerbationen, einhergehend mit dem Verlust an forciertem Einsekundenvolumen (*forced expiratory volume per second*, FEV1), äußert[12]. So könnte es sein, dass chronische Schleim-Hypersekretion den inflammatorischen Prozess rund um die submucosalen Drüsen reflektiert[13]. Diese Annahme wurde durch den Nachweis von erhöhten Mengen an Neutrophilen und Mastzellen um diese Drüsen unterstützt[13;14]. Bei schwerer COPD ist chronische Schleim-Hypersekretion mit erhöhter Mortalität verbunden, was auch ein gesteigertes Risiko von terminalen Infektionen widerspiegelt[15-17].

Hingegen ist die chronisch obstruktive Bronchiolitis hauptverantwortlich für die Limitation des Atemflusses. Die damit verbundene Entzündung betrifft die kleinen, membranösen Bronchiolen (<2 mm im Durchmesser) der peripheren Atemwege und wird angelsächsisch mit dem Begriff *Small Airway Disease* beschrieben. Die Einschränkung des Atemflusses basiert auf drei Mechanismen: den Verlust von elastischen Fasern in den Alveolen, luminale Okklusion durch Mukusproduktion der Becher-Zellen und die Verdickung der Alveolarwand. Letztere ist auf die verstärkte Einwanderung von Entzündungszellen, Hyperplasie der glatten Muskulatur und zunehmende Fibrotisierung zurückzuführen[18]. Es wurde schon früh erkannt, dass es zu einer Verengung der kleinen Luftwege bei COPD-Patienten kommt[19-22]. Die Luftwege sind dabei verdickt, begleitet von der Bildung lymphoidaler Follikel und der Abnahme von Kollagen in den äußeren Wänden der Luftwege, was dazu führt, dass sich die Luftwege weniger öffnen lassen[23]. Das Lumen wird durch Überproduktion von Schleim reduziert, was mit steigender Schwere der Erkrankung zunimmt.

Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium spielt neben den genannten Vorgängen in der Bronchusperipherie das pulmonale Emphysem eine pathogenetische Rolle bei der Atemwegsobstruktion. Es handelt sich morphologisch um eine irreversible Ausweitung der Atemwege distal der terminalen Bronchiolen, deren zugrunde liegender Mechanismus ein Elastizitätsverlust durch Zerstörung des Lungenparenchyms ist. Verbunden mit dem Emphysem kommt es zur Erhöhung der Anzahl an alveolären Makrophagen, Neutrophilen und zytotoxischen T-Zellen und zur Ausschüttung von diversen inflammatorischen Mediatoren, wie Lipiden, Chemokinen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren. Diese Entzündungsreaktion wird dabei durch

vermehrten oxidativen Stress verstärkt. Darüber hinaus kommt es zu erhöhter Elastolyse, manifestiert durch gesteigerte Aktivität von elastolytischen Enzymen, wie Serin-Proteasen, Kathepsinen und Matrix-Metalloproteinasen[4].

Eine mögliche Ursache des Emphysems ist eine Dysbalance zwischen proteolytischer und proteasehemmender enzymatischer Aktivität. Hauptverantwortlich für die Entwicklung eines Emphysems ist in den meisten Fällen der inhalative Tabakkonsum, wobei Raucher oft mehrere pathologische Merkmale der COPD ausweisen[1]. Eine Vielzahl von Studien haben signifikante Korrelationen zwischen dem Grad des makroskopischen Emphysems und verschiedenen Tests zur Messung der Lungenfunktion gezeigt[24;25].

Gemäß der *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) wird COPD in vier Schweregrade eingeteilt (GOLD Stufe I-IV). Das entscheidende Kriterium zur Einteilung ist die spirometrisch ermittelte Ausprägung der Lungenfunktionsstörung. Das Hauptaugenmerk wird pragmatisch vor allem auf das FEV1 gelegt. Allerdings sollten auch klinische Zeichen wie Husten, Dyspnoe und Auswurf optionale Berücksichtigung finden, da die individuellen Auswirkungen der Erkrankung nicht nur vom Ausmaß der Atemflusslimitation, sondern auch vom Schweregrad der Symptome, wie Atemnot oder Einschränkung der körperlichen Belastung abhängen.

1.1.2 Epidemiologie

COPD ist weltweit die häufigste chronische Erkrankung des Respirationstraktes und Hauptursache für hohe Morbidität und Mortalität. Sowohl in Europa als auch in den USA gilt COPD als vierthäufigste Todesursache und wird nach gegenwärtigen Einschätzungen der WHO im Jahre 2020 weltweit sogar auf dem dritten Platz rangieren. Laut der *European Lung Foundation* ist COPD unter den führenden Todesursachen die einzige, deren Inzidenz weltweit weiterhin zunimmt[2]. Trotz der weltweiten Wichtigkeit gehört COPD zu den am wenigsten finanziell unterstützten Forschungsgebiete, wenn man es in Relation zu den globalen Kosten, die diese Erkrankung verursacht, setzt[26]. Soziökonomisch stellt COPD hohe finanzielle Anforderungen. So beläuft sich der durch COPD bedingte Produktivitätsausfall in Europa auf jährlich 28,5 Milliarden Euro. In den USA wurden 2007 die resultierenden finanziellen Folgen auf eine Summe von 42,6 Milliarden US-Dollar geschätzt[27].

Rund 14% der über 40-Jährigen und sogar rund 27% der über 70-Jährigen leiden an chronisch obstruktiver Lungenerkrankung. Während bei den über 60-Jährigen Männer überproportional häufiger betroffen sind, gleichen sich die Prävalenzen in jüngeren Generationen (zwischen 30-50 Jahre) bei Frauen und Männern an, was vermutlich auf ein verändertes Rauchverhalten junger Frauen zurückzuführen ist[28].

1.1.3 Risikofaktoren

1.1.3.1 Tabakrauch

Zigaretten- bzw. Tabakrauch besteht aus einem komplexen Gemisch aus mehr als 4700 chemischen Substanzen. Darüber hinaus beinhaltet es hohe Konzentrationen an freien Radikalen und anderen Oxidantien (>1015 Partikel/Zug). Kohlenstoffmonoxid (NO) ist das vorherrschende Oxidant mit Konzentrationen zwischen 500-1000 ppm[29]. In der Teerphase befinden sich stabile Radikale, wie das Semichinon-Radikal, das mit Sauerstoff zu Superoxid, Hydroxyl-Radikal oder Wasserstoffperoxid reagieren kann[30].

In Industriestaaten ist das Zigarettenrauchen in mehr als 95% der Fälle die Hauptursache für COPD. Dabei ist die Mortalität in 73% der Fälle direkt auf das Tabakrauchen zurückzuführen, in Ländern mit mittlerem und niedrigem Durchschnittseinkommen in ca. 40% der Erkrankungen[31]. Allerdings entwickeln nur ca. 20% der Raucher einen raschen Abfall des FEV1, was letztlich zu schweren (GOLD-I) und sehr schweren Formen (GOLD-IV) von COPD führt. Hingegen findet man bei jedem Raucher pulmonale Entzündungszeichen und bei jenen, die fortgeschrittene Level der Erkrankung erreichen, scheint diese Entzündungsreaktion verstärkt zu sein[32]. Pfeifen- und Zigarrenrauchen führen ebenfalls zu erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten[33]. Auch Passivrauchen kann durch die Inhalation von Partikeln und Gasen zur Entstehung einer COPD beitragen[34].

1.1.3.2 Genetische Faktoren

Obwohl Zigarettenrauchen der Hauptrisikofaktor für COPD darstellt, entwickeln lediglich etwa 15% der Raucher eine klinisch signifikante Erkrankung[35], wobei klare Prävalenzunterschiede verschiedener ethnischer Abstammungen bestehen, da ca. 15% der weißen Raucher, aber lediglich 5% der asiatischen Raucher unter COPD leiden. Dies führt zu dem Schluss, dass es

andere Einflüsse geben muss, die zur Erkrankung führen. Vorangegangene Studien schätzen, dass Rauchen zu 15% zur Veränderung der Lungenfunktion[36], während genetische Faktoren zu 40% beitragen[37]. Dies wird durch Familien-basierte Studien unterstützt[38;39], wobei verstärkt Luftstromobstruktion naher Verwandter von COPD-Patienten aufgezeigt wurde[40]. Weiterhin zeigten Beobachtungen von Rauchern, die Unterschiede in der Abnahme der Lungenfunktion aufwiesen, dass es scheinbar eine Interaktion zwischen genetischen und Umwelteinflüssen gibt[8]. Weitere Hinweise einer genetischen Prädisposition liefern Familienstudien von Patienten mit *early-onset*-COPD[41]. Patienten mit α1-Antitrypsin-Mangel (homozygoter ZZ-Phänotyp) sind prädestiniert zur Ausbildung eines frühen panlobulären Emphysems, dessen Risiko durch Rauchen noch verstärkt wird[1;42]. Durch ein α1-Antitrypsin-Defizit unterliegt das Lungengewebe einem verstärkten proteolytischen Abbau durch neutrophile Elastasen. Allerdings weisen weniger als ein Prozent der COPD-Patienten einen α1-Antitrypsin-Mangel auf. Genpolymorphismen eines weiteren Proteaseinhibitors, dem α1-Antichymotrypsin, werden ebenfalls mit der Entstehung von COPD in Verbindung gebracht[43]. Andere Untersuchungen belegten, dass Polymorphismen von Genen der Matrix-Metalloproteinasen MMP1 und MMP9 an der Abnahme der Lungenfunktion beteiligt sind[44]. Ebenfalls im Fokus der Untersuchungen sind TIMP-2 *(Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase 2*) Genpolymorphismen, die Auswirkungen auf die Pathogenese der COPD haben sollen[45]. Im gesunden Organismus inhibieren TIMP-1-4 die Matrix-Metalloproteinasen[46], jedoch ist diese protektve Eigenschaft in Makrophagen von COPD-Patienten gestört, wodurch es zu erhöhter Elastolyse des Lungengewebes kommt[47;48]. Eine Studie belegt, dass das Erkrankungsrisiko für COPD in einer taiwanesischen Population durch einen Polymorphismus in der Promotorregion des TNF-α-Gens, welcher mit einer erhöhten TNF-α Produktion assoziiert ist, zehnfach erhöht ist[49]. Allerdings konnte diese These durch eine Untersuchung in einem britischen Kollektiv nicht bestätigt werden. Die mikrosomale Epoxidhydrolase ist ein Enzym, das in der Metabolisierung von schädigenden Epoxiden in der Lunge, welche in hohem Maße im Zigarettenrauch enthalten sind, eine wichtige Rolle spielt. Genetische Defekte dieser enzymatischen Detoxifikation könnten Raucher für die Entwicklung von Atemflussobstruktion und Emphysem prädisponieren[50].

Eine Genotyp-Umwelt-Interaktion ist definiert durch einen nicht-additiven Beitrag von Gen und Umwelt zum klinischen Phänotyp[51], soll heißen, dass zwei interagierende Einflüsse zusammen ein anderes Risiko für die Erkrankung darstellen, als die Einflüsse unabhängig voneinander einzeln gesehen. In einer komplexen Erkrankung wie COPD gibt es viele Gene, die zum

Phänotyp beitragen, die sowohl additive als auch synergistische Effekte haben können. Dieses Phänomen wird als epistatische Interaktion bezeichnet. So gibt es verschiedene statistische Methoden, die die Präsenz von Epistase aufzeigen[52;53].

1.1.3.3 Weitere Faktoren

Neben den genannten Risikofaktoren spielen auch andere inhalative Noxen bzw. Substanzen eine Rolle. Berufsbedingte Exposition gegenüber Dämpfen, Stäuben oder Chemikalien stellen ein nicht zu unterschätztes Risiko für die Ausbildung einer COPD dar[54]. In Entwicklungsländern überschreitet eine, im Vergleich zu Industriestaaten, erhöhte Innenraumbelastung häufig eine kritische Schwelle, oberhalb derer das Risiko für eine COPD-Erkrankung wächst. So verursachen vor allem das Kochen und Heizen mit Öl, Holz, Kohle oder anderer Biomasse in schlecht belüfteten Räumen erhöhtes Auftreten von COPD, wobei insbesondere Frauen betroffen sind[55].
Virale und bakterielle Infektionen könnten zur Pathogenese und Progression von COPD sowie zur Emphysembildung beitragen und sind hauptverantwortlich für akute Exazerbationen der Erkrankung[56;57]. Eine latente Virusinfektion könnte für eine übersteigerte inflammatorischen Immunantwort verantwortlich sein[58]. So ist die adenovirale E1A-Sequenz bei COPD-Patienten vermehrt detektierbar, korrelierend mit gesteigerter inflammatorischer Reaktion[59]. Der stimulierende Effekt von E1A auf die Inflammation wurde in humanen Epithelzellen gezeigt[58;60]. Auch eine erhöhte Zahl an kindlichen respiratorischen Infektionen ist mit einer verminderten Lungenfunktion im Erwachsenenalter assoziiert[61].

1.1.4 Pathogenese

In der Pathogenese der COPD unterscheidet man drei Haupt-Themen, (1) die Protease-Antiprotease-Theorie, die besagt, dass es ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen, die Elastin und andere Komponenten der extrazellulären Matrix spalten, und Antiproteasen, die diese Proteasen inhibieren und so schützend wirken[20;21]. Der Ursprung dieser Theorie war die Beobachtung bei Patienten mit α1-Antitrypsin-Defizienz (AATD), dass sie frühzeitig Emphyseme entwickelten[22], was eine Rolle der Zielenzyme der fehlenden Antiprotease (neutrophile Elastase, Proteinase-3) in der Entwicklung des Emphysems impliziert[62]. Die genannten Proteasen verursachten verschiedene Merkmale der COPD in Tiermodellen[23]. Darauf

folgende Arbeiten schlagen eine Involvierung anderer Proteasen, wie MMPs[21], Cathepsin B und Kollagenasen[63] als wahrscheinlicher als Teil der Protease/Antiprotease-Kaskade vor.
(2) Die Oxidantien/Antioxidantien-Theorie beschreibt die Disparität zwischen schädlichen Oxidantien und protektiven Antioxidantien, was zu oxidativem Stress führt. Dieser Stress beeinflusst die Wirkung von Antiproteasen und die Expression proinflammatorischer Mediatoren[64].
Die Theorien (1) und (2) führen zum dritten wichtigen Aspekt bei COPD, die Inflammation[65].

1.1.4.1 Proteasen-Antiproteasen-Dysbalance

Die Protease/Antiprotease-Hypothese erklärt die Ursache der Emphysementstehung in einem Übergewicht proteolytischer Aktivität gegenüber antiproteolytischen Schutzmechanismen. Aus Entzündungszellen sezernierte Proteasen werden nicht vollständig von entsprechend protektiven Antiproteasen antagonisiert, was in einer erhöhten Proteolyse von Lungenbindegewebe (v.a. Elastinabbau) und Emphysembildung mündet. Dazu gehören u.a. die neutrophile Elastase[66;67], einer Serinprotease, die durch α1-Antitrypsin (α1-AT) im Lungenparenchym inhibiert wird und die im Tierversuch bei intratrachealer Gabe Emphysem induziert[68], andere Serinproteasen, wie Kathepsin G und Proteinase-3, die die Schleimproduktion induzieren[69;70] und Cystein-Proteasen[71;72]. Genetisch bedingter α1-AT-Mangel ist nur bei einem geringen Prozentsatz der COPD-Erkrankten nachgewiesen. Man geht davon aus, dass auch Rauchen zu einer funktionellen Defizienz von α1-AT mittels Oxidation durch der im Zigarettenrauch enthaltenen Oxidantien führen kann[73]. Auch die Aktivität des sekretorischen Leukozytenprotease-Inhibitors (SLPI), einer potenten Antiprotease der neutrophilen Elastase[74], scheint vermindert zu sein[75]. Neuere Untersuchungen fokussieren sich auf die Bedeutung von Makrophagen und den von ihnen ausgeschütteten Proteasen in der Emphysementstehung. Makrophagen sekretieren verschiedene Kathepsine, wie auch die elastinolytischen Matrixmetalloproteasen MMP1, MMP2, MMP9 und MMP12[4]. Es verbreitet sich zunehmend die Meinung, dass MMPs eine wichtige Rolle bei COPD spielen[76]. Es wurde gezeigt, dass vor allem die MMP-1 und MMP-9–Expression in BAL und in Makrophagen bei COPD erhöht sind[77-79]. Weiterhin wurde eine verstärkte Aktivität von MMP-9 im Lungenparenchym von COPD-Patienten nachgewiesen. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass MMP12 Knockout-Mäuse keine Emphysembildung nach Rauchexposition aufwiesen[80]. Die Emphysembildung durch IL-13- bzw. IFN-γ-Überexpression ist in diesen Mäusen reduziert[81;82].

Die inflammatorische Reaktion ist herabgesetzt und der Monozyten-Influx erniedrigt. Eine Erklärung dafür wäre, dass MMPs chemotaktische Peptide generieren, die für die Rekrutierung der Makrophagen zum Parenchym und den Atemwegen verantwortlich sind[4]. Die matrixabbauende Aktivität von MMP wird durch endogene Inhibitoren, den *tissue inhibitors of matrixmetalloproteinase* (TIMP) antagonisiert[46]. Ein Mangel an TIMP3 bewirkt ein progredientes destruktives Emphysem, was die Bedeutung der MMP für die Entwicklung einer COPD unterstreicht[83]. TIMPs sind in Makrophagen von COPD-Patienten inhibiert, wodurch es zu erhöhter Elastolyse kommt[47;48].

1.1.4.2 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht, wenn reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) im Überschuss zu antioxidativen Abwehrmechanismen gebildet werden, was u.a. zur Schädigung von Lipiden, Proteinen und DNA führen kann. Es existieren, mit steigender Tendenz, Beweise dafür, dass oxidativer Stress ein wichtiges Merkmal bei COPD darstellt[84-86].

Man geht ähnlich der Protease/Antiprotease-Dysbalance von einem verschobenen Oxidantien/Antioxidantien-Gleichgewicht aus. Beide sind jedoch eng miteinander verknüpft, da einerseits oxidativer Stress Antiproteasen inaktiviert und andererseits pro-inflammatorische Abbauprodukte der Proteasen neue Oxidantien generieren können[87].

Die Quellen freier Radikale und Oxidantien sind sowohl exogener, v.a. Tabakrauch und Luftverschmutzung, als auch endogener Art. Strukturelle Zellen und Entzündungszellen, die in Luftwegen von COPD-Patienten durch Zytokine aktiviert sind, wie Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen und Epithelzellen, produzieren und sezernieren ROS[85], vor allem Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot -}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). $O_2^{\cdot -}$ werden durch die Reduzierung von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) generiert und durch Superoxid-Dismutasen zu H_2O_2 konvertiert. Dieses wird dann mit Hilfe von Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff dismutiert. H_2O_2 kann in Anwesenheit von freiem Eisen unter Bildung des hoch-reaktiven Hydroxyl-Radikals ($^{\cdot}OH$) reagieren (Fenton-Reaktion). $O_2^{\cdot -}$ kann aber auch mit Stickstoffmonoxid (NO) zur Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^-$) führen, das ebenfalls $^{\cdot}OH$ generieren kann[88]. $ONOO^-$ reagiert mit Tyrosinresten von Proteinen unter Bildung von Nitrotyrosin-Derivaten[89]. NO wird in Anwesenheit von NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet. Es existieren zwei konstitutiv aktive Formen (*neuronal* NOS = nNOS = NOS1;

endothelial NOS = eNOS = NOS3) und eine induzierbare (*inducible* NOS = iNOS = NOS2). Die induzierbare Variante kann durch pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF-α, INF-γ und IL-β reguliert werden und ist in der Lage, große Mengen an NO zu produzieren [89]. Erhöhtes NO im Lungenparenchym und kleinen Atemwegen von COPD-Patienten könnte mit erhöhter Expression von iNOS in den Epithelzellen und Makrophagen assoziiert sein[90;91].

Oxidativer Stress führt u.a. zur Oxidation von Arachidonsäure und zur Bildung von Prostanoid-Mediatoren, genannt Isoprostane, die Einfluss auf funktionale Effekte[92], wie Bronchokonstriktion und Plasma-Exudation[93-95], haben. Granulozytäre Peroxidasen, wie Myeloperoxidase in Neutrophilen, spielen eine wichtige Rolle bei oxidativem Stress. H_2O_2, hervorgegangen aus $O_2^{\cdot-}$, wird in Anwesenheit von Chlor-Ionen durch Myeloperoxidasen zu hypochloriger Säure metabolisiert, die stark oxidativ wirkt. Myeloperoxidasen sind auch in der Lage, wie Peroxynitrit, Tyrosin-Reste zu nitrieren[96-98].

ROS gelten als hochreaktiv und können Phospholipide von Zellmembranen kettenreaktionsartig durch Lipidperoxidation oxidieren. Die Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren beeinträchtigt Membranfunktionen, inaktiviert membrangebundene Rezeptoren und Enzyme und erhöht die Gefäßpermeabilität, Prozesse, die mit der Pathogenese zahlreicher Formen von Lungenschädigungen assoziiert werden[85]. Oxidativer Stress kann darüber hinaus den pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor-κB (NF-κB)[99;100] aktivieren, der seinerseits mehrere inflammatorische Gene reguliert, darunter CXCL1, CXCL8, MMP9 und *Transforming Growth Factor* β (TGF-β), was in einer Verstärkung der Immunantwort resultiert[101]. Diese tragen zusammen zur neutrophilen Entzündung, Emphysembildung und Fibrose der kleinen Atemwege bei[102]. Ein anderer Transkriptionsfaktor, der inflammatorische Gene aktiviert, ist das Aktivator-Protein 1 (AP-1), ein Heterodimer aus Fos- und Jun-Proteinen[103]. Darüber hinaus kann oxidativer Stress in der Aktivierung der Histon-acetyltransferase resultieren, die die partielle Entfaltung der Chromatinstruktur bewirkt. Infolge dessen kommt es zur Steigerung der transkriptionellen Tätigkeit inflammatorischer Gene[104;105]. Corticosteroide sind bei COPD therapeutisch erheblich ineffizienter als bei Asthma und verhindern nicht die Progression dieser Erkrankung[106-109]. Im Gegensatz zu Asthma zeigen COPD-Patienten keinen signifikanten anti-inflammatorischen Effekt nach Applikation von Corticosteroiden[77;110]. Oxidativer Stress beeinflusst die Bindung von Glucocorticoid-Rezeptoren an DNA und die Translokation dieser Rezeptoren vom Zytoplasma zum Nucleus[111;112]. Corticosteroide schalten entzündliche Gene durch Rekrutierung von Histondeacetylase 2

(HDAC2) zu den aktivierten Transkriptions-*sites* und durch Deacetylierung der hyperacetylierten Histone der transkripierenden Gene aus[113;114]. Bei Rauchern und COPD-Patienten kommt es zur deutlichen Reduktion der HDAC2-Aktivität und –Expression in alveolären Makrophagen[115;116] und sogar noch stärkerer Reduktion in peripherem Lungengewebe[117]. Die Abnahme der HDAC2-Aktivität korreliert mit verminderter Suppression inflammatorischer Zytokine, wodurch vermehrt Entzündung auftritt[48;113;115;117;118], und gesenkte Reaktion auf Corticosteroide[4;119].

Oxidantien aktivieren auch MAP(*mitogen-activated protein*)-Kinase Signalwege. H_2O_2 ist ein potenter Aktivator der extrazellulär-regulierten Kinasen und der p38-MAP-Kinasen *Pathways*, die die Expression vieler entzündlicher Gene, das Überleben bestimmter Zellen und die Verbreitung von Makrophagen regulieren[120]. Tatsächlich sind viele Aspekte der Makrophagen-Funktion via Oxidantien durch Aktivierung mehrerer Kinase-Signalwege reguliert[121].

Hinweise auf erhöhten oxidativen Stress in den Lungen von COPD-Erkrankten sind zahlreich[85;122]. Zigarettenrauch selbst beinhaltet eine hohe Konzentration an ROS[29]. Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass eine reduzierte nahrungsgekoppelte Aufnahme von Vitamin C eine entscheidende Rolle bei der COPD-Entwicklung und Verschlechterung der Lungenfunktion spielen kann[123;124]. Es wurden mehrere Marker für oxidativen Stress im Atem von COPD-Patienten nachgewiesen[125-127]. Im exhalierten Atemkondensat finden sich erhöhte Konzentrationen von Wasserstoffperoxid[128;129] und 8-Isoprostan, das sowohl bei ehemaligen Rauchern[130] als auch während akuter Exazerbation gefunden wurde[131]. 8-Isoprostan ist ebenfalls im Urin, besonders während Exazerbationen, erhöht[132]. Systemische Marker für oxidativen Stress, gemessen durch Lipidperoxidationsprodukte, wie z.B. 4-Hydroxy-2-Nonenal, konnten dargestellt werden[133;134].

Oxidativer Stress kann auch die Funktion von Anti-Proteasen, wie α1-AT und SLPI beeinflussen, was einen beschleunigten Abbau von Elastin im Lungenparenchym zur Folge hat[135].

Schließlich ist oxidativer Stress in der Lage, Apoptose in Endothel- und Epithelzellen zu induzieren. Apoptose von Typ1-Pneumozyten könnte für die Entwicklung von Emphysemen mitverantwortlich sein, ausgelöst durch zytotoxische T-Lymphozyten oder durch Inhibierung des VEGF-Rezeptors (*vascular-endothelial growth factor receptor*)[136;137]. ROS könnten Apoptose durch Aktivierung des NF-κB-Signalwegs, durch direkte DNA-Schädigung via Aktivierung der Poly-Adenosindiphosphat-Ribose und durch Generierung von 4-Hydroxy-2-Nonenal induzieren[4]. Die Apoptose-*signaling-regulating*-Kinase-1 wird durch Thioredoxin in inaktiver Konformation gehalten. Eine Oxidation durch ROS löst jedoch die apoptotischen Signalwege aus[138].

1.1.4.3 Pulmonale Entzündung

Die Inhalation von Tabakrauch oder anderen reizenden Stoffen verursacht eine entzündliche Reaktion des Lungengewebes, eine normale Immunantwort, die allerdings bei COPD Patienten inadäquat verstärkt ausfällt. Charakteristische pathologische Veränderungen bei einer COPD betreffen vor allem die proximalen und peripheren Atemwege sowie das Lungenparenchym. An der chronischen Entzündung sind sowohl Zelltypen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems beteiligt. Neutrophile Granulozyten, Makrophagen sowie $CD8^+$-Lymphozyten beherrschen die lokale Immunreaktion[4].

1.1.4.3.1 Makrophagen

Makrophagen scheinen eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie und den meisten Charakteristika der COPD zu spielen (**Abb. 1**)[139;140].

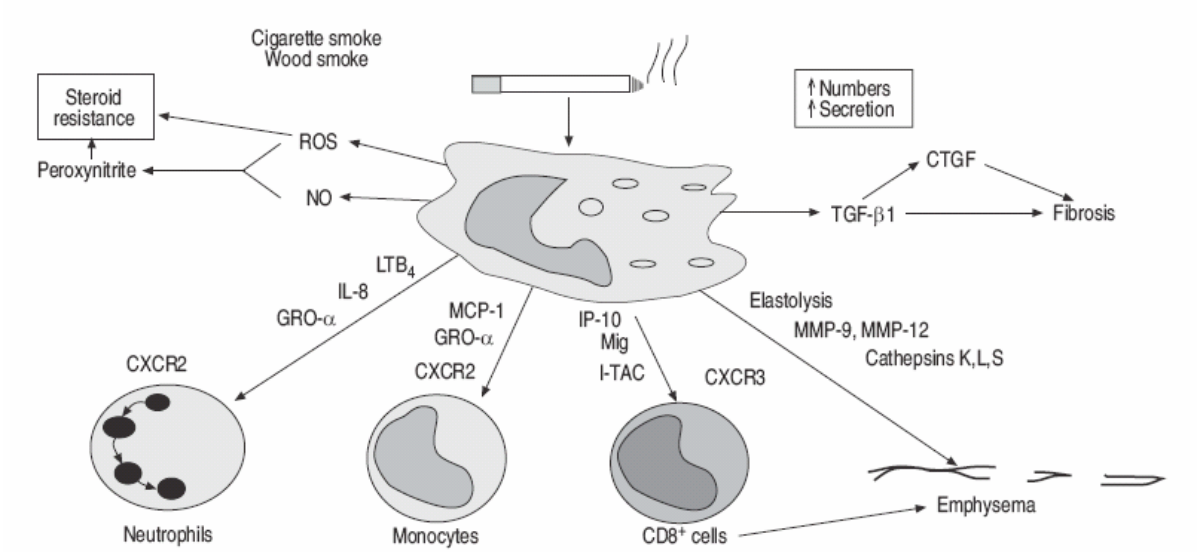


Abbildung 1: **Makrophagen** werden durch Zigarettenrauch aktiviert und sekretieren dadurch diverse inflammatorische Proteine, die die Inflammation bei COPD orchestrieren. Neutrophile, Monozyten und $CD8^+$-Lymphocyten werden durch die genannten Mediatoren angelockt. Die Ausschüttung von elastolytischen Enzymen, wie MMPs und Kathepsinen, verursachen Elastolyse und die Freilassung von TGF-β und CTGF. Die Makrophagen generieren auch ROS und NO, die in Kombination Peroxynitrit bilden, das zur Steroid-Resistenz beitragen könnte; aus Barnes *et al.*[4].

In COPD-Patienten kann es zu einer 5-10fachen Steigerung der Anzahl dieser Zellen in den Luftwegen, dem Lungenparenchym, der BAL-Flüssigkeit und dem Sputum kommen. Eine gründliche morphometrische Analyse der Makrophagen-Anzahl im Parenchym von Patienten mit Emphysem zeigte eine 25fache Erhöhung im Gewebe und im alveolären Raum im Vergleich zu

normalen Rauchern ohne Emphysem[59]. Weiterhin sind Makrophagen am Ort der Alveolarwand-Destruktion bei Patienten mit COPD lokalisiert[141;142]. Die Anzahl der Makrophagen korreliert mit der Schwere der COPD[143]. Makrophagen sind in der Lage, nach Aktivierung durch Zigaretten-Rauch, inflammatorische Mediatoren auszuschütten, wie etwa *tumor negrosis factor* (TNF)-α, IL-8, andere CXC-Chemokine, *monocyte chemotactic peptide* (MCP)-1, LTB_4 und ROS, die den Link Entzündung-COPD herstellen. Alveolar-Makrophagen (AM) sekretieren auch elastolytische Enzyme (MMP-2, -9, -12, Kathespsin K, L, und S und neutrophile Elastase), die von Neutrophilen aufgenommen werden[47;144]. AM von Patienten mit COPD sezernieren mehr inflammatorische Proteine und haben mehr elastolytische Aktivität als jene von normalen Rauchern, was mit weiterer Rauchexposition zunimmt[47;48;145]. Diese Makrophagen zeigen das unterschiedliche Verhalten auch nach drei Tagen in Kultur, was dafür spricht, das sie sich deutlich von Makrophagen von normalen Rauchern oder Nicht-Rauchern unterscheiden[47]. Das ausgeprägteste elastolytische Enzym, das von AM ausgeschüttet wird, ist MMP-9. Die meisten entzündlichen Proteine, die in COPD-Makrophagen hochreguliert sind, werden durch den Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert, der bei COPD-Patienten aktiviert ist, besonders während Exazerbationen[99;100]. Die erhöhte Menge an Makrophagen bei Rauchern und COPD-Patienten könnte durch vermehrte Einwanderung von Monozyten aus dem Blutkreislauf, vermittelt durch Monozyten-selektive Chemokine, wie etwa MCP-1, erklärt werden, das in Sputum und BAL von COPD-Patienten erhöht ist[146-148]. GRO-κ (*growth-related oncoprotein*-α), ein CXC-Chemokin, hat eine größere chemotaktische Wirkung auf Monozyten von COPD-Patienten als jene von normalen Rauchern bzw. Nicht-Rauchern[149]. Weiterhin kann die erhöhte Zahl an Makrophagen bei COPD durch erhöhte Proliferation und verlängertes Überleben in den Lungen erklärt werden. Dies wurde durch die Messung des *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) postuliert[150], wobei gezeigt wurde, dass die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-X_L und p21 im Zytoplasma von Makrophagen von Rauchern erhöht waren.

Makrophagen sind in der Lage, durch Phagozytose Bakterien aufzunehmen und diese so aus dem Organismus zu entfernen. Somit spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr. Das phagozytische Potential von Makrophagen von COPD-Patienten wurde zwar nicht umfassend untersucht, jedoch scheint es plausibel, dass das vermehrte Aufkommen von Bakterien im respiratorischen Trakt durch negativ veränderte Phagozytose-Eigenschaften der jeweiligen Makrophagen zu erklären ist. Makrophagen erkennen apoptotische Zellen durch die Expression von Phosphatidylserin (PS) an der Zelloberfläche, das mit spezifischen Rezeptoren der

Makrophagen interagiert[151]. Die Ingestion von apoptotischen Granulozyten induziert die Sekretion von TGF-β1[152]. Neutrophile Elastase spaltet den PS-Rezeptor, was die Aufnahme von apoptotischen Neutrophilen negativ beeinflusst, was zur Folge hat, dass sich diese Zellen vermehrt in den Luftwegen ansammeln[153].

1.1.4.3.2 Neutrophile

In vivo Studien, die Neutrophile mit der Pathogenese von COPD in Verbindung bringen, sind zahlreich. Sie sind Teil der angeborenen Immunabwehr und Quelle reaktiver Sauerstoffspezies, inflammatorischer Zytokine sowie Enzyme, wie der neutrophilen Elastase oder Myeloperoxidase[154]. In COPD-Patienten wurde eine erhöhte Anzahl an aktivierten Neutrophilen in Auswurf und BAL-Flüssigkeit nachgewiesen[155;156], jedoch nur einen relativ geringen Anstieg in den Luftwegen oder dem Lungenparenchym[141]. Neutrophile sekretieren sowohl Serin-Proteasen, wie etwa Neutrophilen-Elastase (NE), Kathepsin G und Proteinase-3, als auch die Matrixmetallo-Proteinasen (MMP)-8 und -9, die wahrscheinlich zur Destruktion der Alveolen beitragen. Diese Serin-Proteasen induzieren den Abbau extrazellulärer Matrix des Lungengewebes und reduzieren die ziliäre Schlagfrequenz und vermindern somit die mukoziliäre *Clearance*[154]. Die ausgeschütteten Mediatoren induzieren eine Mukus-Hypersekretion sowohl über einen akut sekretagogen Effekt, als auch über eine Steigerung der bronchialen Schleimproduktion[157]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Gabe von gereinigter neutrophiler Elastase ein Emphysem verursacht, während hingegen eine Defizienz der endogenen Serinprotease einen Schutz vor Emphysembildung bei Zigarettenrauchexposition bietet[158;158;159]. Nach Neutrophilen-Influx in die Luftwege und ins Parenchym haften sie sich an Endothelzellen von COPD-Patienten, worauf hin E-Selectin hochreguliert wird[160]. Adhärente Neutrophile wandern dann, geleitet von chemotaktischen Faktoren, wie Interleukin (IL)-8 und Leukotrien B_4 (LTB_4), in den respiratorischen Trakt. Das Überleben der Neutrophilen könnte dabei durch Zytokine, wie etwa den *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) und dem *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), gewährleistet werden.

In Studien konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an zirkulierenden Neutrophilen und dem Abfall des FEV1 besteht[161]. Die Menge an Neutrophilen in Bronchial-Biopsien und Auswurf korrelierte mit dem Schweregrad der COPD[143;155] und der Abnahme der Lungenfunktion[162]. Rauchen hat einen direkten stimulierenden Effekt auf die

Granulozyten-Produktion und deren Ausschüttung aus dem Rückenmark, was wahrscheinlich durch GM-CSF und G-CSF aus den Makrophagen vermittelt wird[163]. Rauchen kann ebenfalls eine Retention von Neutrophilen in der Lunge bedingen[164]. Es gibt keinen Zweifel, dass die eingewanderten Neutrophilen aktiviert werden, da man erhöhte Konzentrationen an Proteinen neutrophiler Granulozyten, wie Myeloperoxidase und humanem neutrophilären Lipocalin, im Überstand des Sputums nachgewiesen hat[165-167]. Neutrophile haben das Potential, Gewebeschäden durch die Freisetzung von Serin-Proteasen und Oxidantien zu induzieren. Es gibt mehrere chemotaktische Signale, die eine Neutrophilen-Rekrutierung bei COPD verursachen können, wie z.B. LTB_4, IL-8 und CXC-Chemokine, wie GRO-α und ENA-78 (*epithelial neutrophil activating protein of 78 kDa*), die nachweislich bei COPD erhöht sind[146;168]. Diese Mediatoren können in den Luftwegen von Alveolarmakrophagen und Epithelzellen, aber auch von den Neutrophilen (IL-8) selbst stammen[169].

1.1.4.3.3 T-Lymphozyten

In COPD-Patienten kommt es zu einem Anstieg an T-Lymphozyten im Lungenparenchym, den peripheren und zentralen Atemwegen, wobei mehr $CD8^+$- als $CD4^+$-Zellen gebildet werden[59;136;141;170;171]. So besteht eine Korrelation zwischen der Anzahl der T-Zellen, der Destruktion der Alveolen und der Schwere der Atemwegs-Obstruktion. Obwohl es auch zu einem Anstieg an $CD4^+$-T-Zellen kommt, ist die Ratio von $CD4^+$- zu $CD8^+$-Zellen bei COPD-Patienten revertiert. Dieses Verhalten ist hauptsächlich bei COPD-Patienten zu finden und nicht bei Rauchern ohne Emphysem[136]. Die zytotoxische T-Zellen (Tc1)- und T-Helfer-Zellen (Th1)-vermittelte Entzündung ist vermutlich selbst perpetuierend, da IFN-γ die Freisetzung von CXCR3 Liganden stimuliert, welche wiederum weitere Tc1- und Th1-Zellen in das Entzündungsgeschehen der Lunge anlocken[172]. Es ist nicht eindeutig bekannt, ob es sich bei den zytotoxischen Zellen um den Tc1-(Interferon-γ-produzierend) oder Tc2-(IL-4-produzierend) Subtyp handelt[173], jedoch wurde belegt, dass die Mehrheit der T-Zellen bei COPD dem Subtyp Tc1 angehören[172]. Natürliche Killerzellen (NK, $CD56^+$) sind die erste Immunantwort auf virale Infektionen. Zirkulierende NKs sind bei COPD reduziert vorkommend und in ihrer phagozytären Eigenschaft eingeschränkt[174]. Ähnliches wurde bei normalen Rauchern beschrieben[175]. Es gibt einen Anstieg an γ/δ-T-Zellen in den Alveolen von Rauchern, ungeachtet dessen, ob sie unter Luftweg-Obstruktion leiden oder nicht[136]. Die Rolle der $CD4^+$-T-Zellen in der Pathophysiologie

der COPD ist noch ungeklärt[59]. $CD8^+$-Zellen haben die Kapazität, durch Freisetzung von Perforinen, Granzym-B und TNF-α Zytolyse und Apoptose von alveolären Epithelzellen zu verursachen[176]. Es existiert eine Verbindung zwischen $CD8^+$-Zellen und der Apoptose von Alveolarzellen bei Emphysem[136]. In einem Mausmodell des Zigarettenrauch-induzierten Emphysems wurde eine Akkumulation von T-Zellen nachgewiesen, die direkt proportional zum Schweregrad des Emphysems war[177].

1.1.5 Pharmakotherapie und Prävention von COPD

Obwohl es schon einige Fortschritte im Verständnis und in der Behandlung von Asthma gibt, wurde die COPD in der Vergangenheit relativ vernachlässigt. Bis dato gibt es keinen Ansatz, der die Progression dieser Erkrankung gravierend verhindert oder gar heilend wirkt[178]. Jedoch vollzog sich in den letzten Jahren ein Wandel, da die Prävalenz fortschreitet und sich die dadurch entstandenen Gesundheitskosten explosionsartig vermehrten, so dass nun verstärktes Interesse an den zellulären und molekularen Mechanismen besteht[1], mit dem Ziel, neue Therapieansätze zu finden[62]. Die derzeitige therapeutische Behandlung von COPD beschränkt sich bisher lediglich auf eine Minderung der Symptome. Die einzig effektive Methode liegt in der Vermeidung von Risikofaktoren, wie dem Tabakrauchen. Diese präventive Maßnahme kann das Fortschreiten der Erkrankung verhindern und zu einer symptomatischen Besserung führen.

Zur medikamentösen Nikotinentwöhnung eignen sich diverse Formen der Nikotinersatztherapie (Kaugummis, Pflaster, Sublingualtabletten). Auch eine Reihe von anderen Arzneistoffen anderer Stoffgruppen erhöhen die Erfolgsquote, beispielsweise das Antidepressivum Bupropion und der partielle α4β2-Nikotinrezeptor-Agonist Vareniclin.

Als medikamentöse Standardtherapie zur Behandlung der COPD werden Bronchodilatoren wie β2-Sympathomimetika, Anticholinergika und Theophyllin eingesetzt, welche zu einer Reduktion der Atemnot am Tage und in der Nacht, zu einer Besserung der Lungenfunktion, einer Steigerung der Lebensqualität und einer Reduktion von Exazerbationen führen[179]. Kurzwirksame β2-Sympathomimetika, wie Salbutamol oder Fenoterol, zeichnen sich durch einen schnellen Wirkungseintritt aus und eignen sich daher als inhalatives Bedarfstherapeutikum bei akuter Atemnot. Die langwirksamen β2-Agonisten werden im Gegensatz dazu aufgrund ihrer lang anhaltenden Wirkdauer zweimal täglich als Dauertherapie eingesetzt. Sie zeichnen sich durch ihre Effektivität, vor allem bei stabiler COPD, aus und verbessern nächtliche Symptome, sowie

körperliche Belastbarkeit[180]. Anticholinergika (z.B. Ipratropiumbromid, Tiotropiumbromid) wirken durch Vagusblockade bronchodilatativ, vermindern die Schleimsekretion und verringern das Dyspnoe-Empfinden. Des Weiteren verbessern sie die körperliche Leistungsfähigkeit und reduzieren Exazerbationen bei Patienten mit COPD[181]. Das Methylxanthin Theophyllin weist eine schwächere bronchiendilatierende Wirkung auf und gilt daher, auch aufgrund seiner engen therapeutischen Breite, als Mittel der zweiten oder dritten Wahl. Interessanterweise konnte eine Studie kürzlich belegen, dass geringe Dosen von Theophyllin die Aktivität der HDAC2 steigern können. Theophyllin könnte somit die Steroidresistenz von COPD neutralisieren und in Kombination mit Glucocorticoiden deren suppressive, anti-inflammatorische Effekte potenzieren[116]. Trotz des erfolgreichen Einsatzes der inhalativen Glucocorticoide in der Therapie von Asthma ist die Rolle von Glucocorticoiden im Management von stabiler COPD auf spezifische Indikationen beschränkt. Die Unfähigkeit von Glucocorticoiden, den Abfall des FEV1 im Langzeitverlauf zu modifizieren[106], könnte dadurch erklärt werden, dass Glucocorticoide ihre Wirkung unter anderem durch Rekrutierung der HDAC2 zu aktivierten Transkriptionskomplexen vermitteln, wodurch aktivierte pro-inflammatorische Gene ausgeschaltet werden. Der durch das Rauchen bedingte oxidative und nitrosative Stress beeinträchtigt durch die Bildung von Peroxynitrit die HDAC2 nachhaltig in ihrer Funktion und verhindert somit den suppressiven Effekt der Glucocorticoide[119]. Dadurch ist auch der Einsatz von Antioxidantien als Induktoren der HDAC2 denkbar. Dementsprechend wird auch die Entwicklung von neuen HDAC2-Aktivatoren angestrebt. Inhalativ applizierte Corticosteroide werden bei schweren und sehr schweren Formen von COPD (FEV1 <50%) angewendet, da sie in der Lage sind, Häufigkeit und Stärke von akuten Exazerbationen zu reduzieren und damit die Lebensqualität zu verbessern[182]. Darüber hinaus kommen bei akuten Verschlechterungen kurzfristig auch systemische Steroide und Antibiotika zum Einsatz.

In Anbetracht der fehlenden Möglichkeit einer effektiven pharmakologischen Therapie für COPD sind die Suche nach neuen Zielstrukturen und die Entwicklung neuer anti-inflammatorisch wirkender Substanzen von dringlicher Bedeutung. Trotz zunehmenden Verständnisses von pathophysiologischen Mechanismen von COPD wurde bisher nur ein geringer Teil an neuen Erkenntnissen in die Entwicklung effektiver Pharmakotherapie umgesetzt.

Angriffspunkte für neue Therapien finden sich auf molekularer Ebene der Entzündungsmediatoren, die durch Inhibition oder Rezeptorantagonismus in ihrer Entzündungsvermittlung gehemmt werden. Die Inhibition des potent pro-inflammatorischen

Zytokins TNF-α mittels rekombinanter Antikörper, wie Infliximab oder Adalimumab, zeigte, im Gegensatz zum erfolgreichen Einsatz bei rheumatoider Arthritis oder Asthma bronchiale, keinen therapeutischen Benefit bei COPD[183]. Die therapeutische Blockade der Zytokine IL-1β, IL-6 und IL-17 sowie CXCR1/2-, CXCR3-, und CCR5-Chemokin-Rezeptor-Antagonisten befinden sich derzeit noch in prä-klinischer Erprobung.

Eine im Tierversuch wie auch bei Probanden bereits erfolgreich getestete Substanzklasse bilden die Phosphodiesterase-Inhibitoren, insbesondere der Phosphodiesterase 4 (PDE4)-Inhibitor Roflumilast. Die Hemmung der PDE4 verursacht eine Anreicherung an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch die Synthese von Entzündungsmediatoren und chemotaktischen Substanzen reduziert wird[178]. Aufgrund des ungünstigen Nebenwirkungspotentials durch unselektive PDE-Blockade ist allerdings eine weitergehende Substratspezifizierung unerlässlich.

NF-κB als Transkriptionsfaktor inflammatorischer Gene stellt ein weiteres potentielles *Target* für die anti-entzündliche Therapie dar. Niedermolekulare Inhibitoren von IKK2 (*inhibitor of NF-κB kinase* 2) wurden bereits in Tiermodellen von COPD untersucht, allerdings mit kontroverser Ergebnislage[184].

Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) gehören zu einer Enzymfamilie, die an der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt und während chronischer Entzündung von erheblicher Bedeutung sind. In Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten liegt $p38^{MAPK}$ in aktivierter Form vor, so dass auf eine Bedeutung dieses Signalweges bei COPD geschlossen werden kann[185]. Verschiedene kleinmolekulare nicht-peptidische Inhibitoren der $p38^{MAPK}$, wie SB203580, SB239063 und RWJ67657 wurden in den letzten Jahren entwickelt und werden in klinischen Studien untersucht.

Die Antagonisierung von Proteasen verfolgt das Ziel, die proteolytische Schädigung des Lungengewebes zu stoppen. Dies geschieht einerseits durch den Ersatz endogener Antiproteasen wie α1-AT oder SLPI. Ein anderer Ansatz liegt in der Entwicklung von Inhibitoren aktiver Proteasen, vor allem der neutrophilen Elastase und Matrixmetalloproteinase. Allerdings zeigen klinische Studien bislang nicht den gewünschten Erfolg.

1.1.6 NADPH-Oxidasen als Hauptquellen für ROS-Bildung

Innerhalb der Säugetier-Zellen gibt es mehrere Enzymsysteme, die in der Lage sind, Elektronen auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Superoxid zu transferieren, wie etwa NADH-Dehydrogenase und Cytochrom-bc1-Komplex der mitochondrialen Elektronen-Transportkette[186-188], Stickstoffoxid-Synthasen (NOS)[189-191], Cyclooxygenasen[192], Lipoxygenasen[193], Cytochrom P_{450}-Reduktase[194] und Xanthin-Oxidase[195;196]. Jedoch ist die ROS-Bildung bei diesen Enzymen meist eine Nebenreaktion zu den eigentlichen katalytischen Funktionen. Tatsächlich sind NADPH-Oxidasen die einzigen Enzyme, deren primäre Aufgabe die Generierung von ROS darstellt[197].

Die NADPH-Oxidase wurde zum ersten Mal in phagozytären Zellen[198] als verantwortliches Enzym für den respiratorischen *burst*[199], der essenziell für anti-mikrobielle Funktion ist, identifiziert[200-205]. Jedoch wurde durch die Beobachtung von Griendling *et al.*[206] offensichtlich, dass auch nicht-phagozytäre Zellen, wie glatte Muskelzellen, Endothelzellen und adventitielle Fibroblasten, NADPH-Oxidase-Aktivität aufweisen.

NADPH-Oxidasen stellen eine Familie von Enzym-Komplexen dar, die sich primär durch die membrangebundene katalytische Untereinheit, die den Elektronentransfer von NADPH auf molekularen Sauerstoff ermöglicht, unterscheiden. Bis dato wurden sieben Mitglieder der NADPH-Oxidasen-Familie in Säugetieren identifiziert. Dabei handelt es sich um NADPH-Oxidase (NOX) 1-5 und DUOX(*dual oxidase*)1 und -2 [207;208], wobei vier dieser Isoformen in der Blutgefäßwand exprimiert sind (**Abb. 2**).

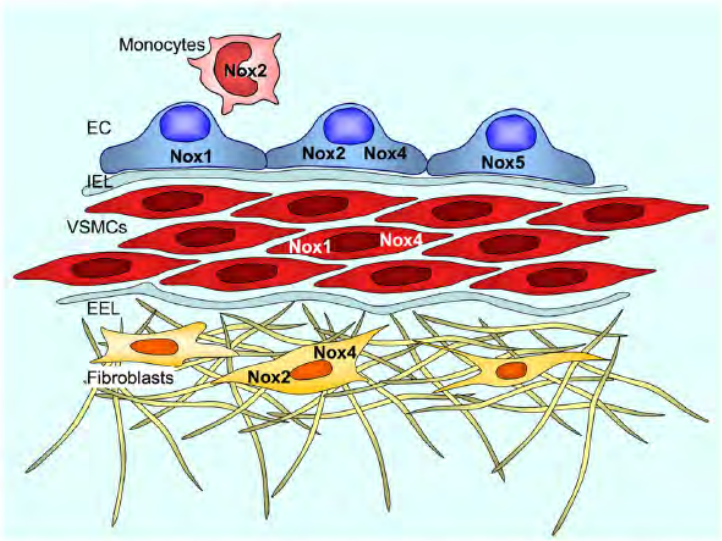


Abbildung 2: Schematische Darstellung der zellulären NADPH-Oxidasen-Verteilung in der Gefäßwand. Während der Atherogenese migrieren Monozyten-abgeleitete Makrophagen in den subendothelialen Raum und stellen eine zusätzliche Quelle für NOX2-abhängige NADPH-Oxidase-Aktivität dar. Abkürzungen: EC (Endothelzellen), VSMCs (vaskuläre glatte Muskelzellen), IEL (*lamina elastica interna*), EEL (*lamina elastica externa*); aus Selemidis *et al.*[197].

Die NADPH-Oxidase-Isoformen unterscheiden sich vor allem in 1) der katalytischen Untereinheit, 2) den zytosolischen Bindeproteinen, 3) der subzellulären Lokalisation, 4) der Gewebeverteilung, 5) der Kinetik der ROS-Bildung (*burst*-ähnlich oder kontinuierlich) und der 6) Natur der reaktiven Sauerstoffspezies, die gebildet werden ($O_2^{\cdot -}$ bzw. H_2O_2)[209]. NADPH-Oxidase-Komplexe, die NOX1 und -2 enthalten, benötigen die Assoziation des kleinen Integral-Membran-Proteins $p22^{phox}$ (phox = phagozytäre Oxidase)[210;211], das wahrscheinlich das NOX-Protein innerhalb der Zellularmembran stabilisiert. Darüber hinaus brauchen sie ein Organisator- ($p47^{phox}$ oder NOXO1) und ein Aktivator-Protein ($p67^{phox}$ oder NOXA1) und schließlich eine kleine GTPase, Rac1 bzw. Rac2. Im Gegensatz dazu benötigt NOX4 für volle Aktivität nur die Verbindung zu $p22^{phox}$, während NOX5 unabhängig von regulatorischen Proteinen zu sein scheint[197]. NOX5 scheint in Nagetieren nicht exprimiert zu sein[212], so dass in dieser Arbeit NOX5 im Mausmodell nicht untersucht wurde.

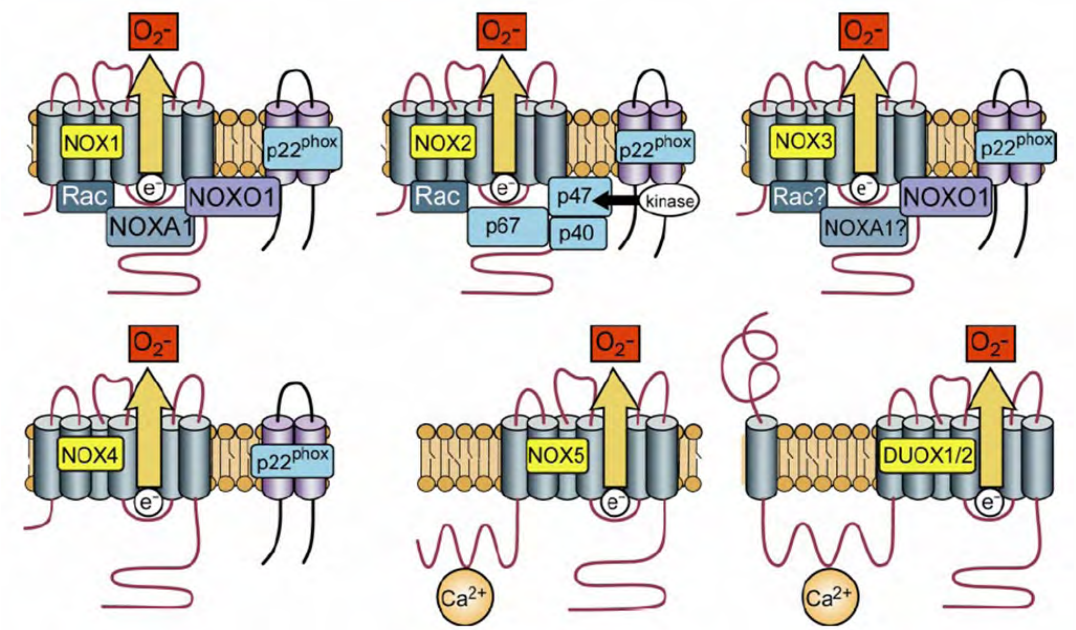


Abbildung 3: Schematische Darstellung der NADPH-Oxidase-Aktivierung. Trotz ähnlicher Struktur und Funktion unterscheiden sich die Enzyme in ihren Aktivierungsmechanismen. a) NOX1 benötigt $p22^{phox}$, NOXO1 (oder $p47^{phox}$ in einigen Fällen), NOXA1 und die kleine GTPase Rac. b) NOX2 benötigt $p22^{phox}$, $p47^{phox}$ (Phosphorylierung notwendig), $p67^{phox}$ und Rac, $p40^{phox}$ bindet ebenfalls und trägt wahrscheinlich zur Aktivierung bei; c) NOX3 benötigt $p22^{phox}$ und NOXO1, NOXA1 (Spezies-abhängig) und Rac (noch nicht völlig geklärt); d) NOX4 in Verbindung mit $p22^{phox}$ meist konstitutiv aktiv, Aktivierung beschrieben, möglicherweise in Verbindung mit Rac; e) und f) NOX5, DUOX1/2 aktiviert durch Ca^{2+}, scheinbar unabhängig von anderen Untereinheiten; aus Bedard und Krause[213].

1.1.6.1 NOX2-gekoppelte NADPH-Oxidasen

Sie wurden als erste enzymatische Quelle für Superoxid identifiziert, wobei sie hauptsächlich in phagozytären Zellen wie Neutrophilen und Makrophagen exprimiert sind. Kürzlich wurden sie auch in vaskulären Endothelzellen[214-223], adventitiellen Fibroblasten[224-226] und sogar in medialen glatten Muskelzellen von Mikrogefäßen[227], nachgewiesen. Die Expression von NOX2 und diversen regulatorischen Partnern scheint in der Anwesenheit von kardiovaskulären Risikofaktoren hochreguliert zu sein. Verbunden mit dem Potential hohe Niveaus an ROS zu produzieren, stellen die NOX2-gekoppelten NADPH-Oxidasen einen möglichen Angriffspunkt für therapeutische Ansätze kardiovaskulärer Erkrankungen dar.

Topographische Informationen über NOX2 und dessen molekulare Interaktionen mit regulatorischen Untereinheiten wurden durch diverse Techniken aufgeklärt[228-233]. Diese Studien beschreiben NOX2 als ein 570 Aminosäuren (AS) großes Protein mit sechs transmembranen Domänen. Obwohl ein Protein dieser Länge ein Molekulargewicht von etwa 65 kDa aufweisen

sollte, erscheint auf Western Blots oft ein „Schmier“ zwischen 65 und 91 kDa[234], was durch Glykolysierungen an drei Asparagin-Resten erklärt werden könnte (Asn^{132}, Asn^{149}, Asn^{240})[235-238].

NOX2, auch $gp91^{phox}$ genannt, besteht aus einem N-terminalen Segment, sechs transmembranen α-Helixes und einem zytoplasmatischen C-terminalen Ende, der die NADPH- und FAD-Erkennungsstellen enthält[239-241]. Die Elektronen werden erst von NADPH auf FAD und dann auf eine von zwei nicht-identischen Häm-Hälften innerhalb des Transmembran-Segments des NOX-Proteins übertragen[242-244], wobei sie durch vier Histidin-Reste stabilisiert werden[245]. Die erste Häm-Gruppe ist in Richtung des zytoplasmatischen Endes des Moleküls positioniert, wohingegen die zweite Häm-Gruppe nach Außen (extrazellulär) gerichtet ist. Vermutlich ist es das äußere Häm, das die Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Superoxid extrazellulär oder innerhalb des Phagosoms erleichtert. Die genaue Rolle des C-terminalen Häms ist immer noch nicht eindeutig geklärt, jedoch geht man davon aus, dass es an der Stabilisierung der $p22^{phox}$-NOX2-Interaktion beteiligt ist – einer Interaktion, die kritisch für die Stabilität und Ausbildung des NOX2-Protein in der Membran ist[246-248]. NOX2 bildet mit $p22^{phox}$ den so genannten heterodimeren Flavozytochrom-b_{558}-Komplex[249-252].

$P22^{phox}$ ist der membrangebundene Bindungspartner von NOX1, NOX2, NOX3 (hauptsächlich im Innenohr exprimiert) und NOX4[241;253]. Es besteht aus 195 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 21 kDa. Epitop-*Mapping* und Hydrophobizitätsanalysen der Aminosäure-Struktur indizieren, dass $p22^{phox}$ sehr wahrscheinlich einen zytoplasmatischen N-Terminus (Reste 1-90), zwei transmembrane α-Helixes (Reste 91-106 und 112-127), die durch eine kurze extrazellulären Schleife (Reste 107-111) miteinander verbunden sind[254;255], und einen C-Terminus, der ins Zytoplasma ragt (Reste 128-195), besitzt. Der N-terminale Teil beinhaltet zwei Regionen (Reste 6-11 und 65-90), die essentiell für die Maturation von NOX2 zum vollständig glycolysierten Protein und dessen Expression auf der Membran sind. Das auffallendste Charakteristikum des C-Terminus ist eine Prolin-reiche Region (PRR), die ein Konsensus-Motiv um Pro^{156} aufweist. Neben der NOX2-stabilisierenden Eigenschaft ermöglicht $p22^{phox}$ die Bindung von $p47^{phox}$ mit dem Membran-gebundenen Cytochrom[256-259]. So wird postuliert, dass speziell die Tandem-SH3-Dömanen von $p47^{phox}$ die PRR von $p22^{phox}$ umschließen. Darüber hinaus wird die Interaktion von $p47^{phox}$ und $p22^{phox}$ durch den Kontakt der SH3-Domänen mit einer α-Helix, die an die PRR angrenzt, ermöglicht[260].

Die p47^{phox}-Untereinheit (etwa 47 kDa; 390 AS) besteht aus zwei SH3-Domänen, wobei es sich um konservierte Regionen für Protein-Protein-Interaktionen handelt, einer autoinhibitorischen Region (AIR) am C-terminalen Ende, einer Phox-Homologie (PX)-Domäne[261;262] und ein PRR am N-Terminus. Röntgen-kristallographische Analysen haben gezeigt, dass p47^{phox} unter Ruhebedingungen nicht in der Lage ist, p22^{phox} zu binden, da die AIR verhindert, dass die SH3-Domänen mit den PRR von p22^{phox} interagieren können[263]. Jedoch in der Präsenz eines geeigneten Stimulus, wie etwa PMA, werden die Serinreste von p47^{phox} phosphoryliert[264-266], was die Autoinhibition rückgängig macht[259;267;268] und dazu führt, dass die SH3- und PX-Dömanen an p22^{phox} [257;258;269;270] und der Plasmamembran binden können. Weiterhin ist eine multiple Bindung von p47^{phox} an NOX2 essentiell für die Formation der Oxidase[230]. Darüber hinaus ist p47^{phox} entscheidend für die Aktivierung der Oxidase durch Bildung eines ternären Komplexes mit den Untereinheiten p67^{phox} und p40^{phox} im Zytosol, wodurch diese Untereinheiten zur Membran geleitet werden.

P67^{phox} ist ein 59,8 kDa Protein, das aus 526 AS zusammengesetzt ist. Es enthält am N-Terminus vier Tetratricopeptid-Repeats (TPR), eine Aktivator-Domäne (AD), eine „Phox und Bem1“(PB1)-Domäne[213] und zwei SH3-Domänen, die zentral bzw. C-terminal lokalisiert sind. NMR-Analysen indizieren, dass die zweite SH3-Domäne an die PRR-Region von p47^{phox} bindet[271-274]. Es scheint, dass die spezifische Aktivator-Domäne von p67^{phox} an NOX2 bindet, was zu einer Konformationsänderung von NOX2 und zur Induktion des Elektronenflusses durch den Komplex führt[275;276], wodurch p67^{phox} als „Aktivator-Untereinheit“ bezeichnet wird.

Die dritte zytosolische Unterheit des ternären Komplexes ist p40^{phox}, das ebenfalls eine positiv-regulierende Wirkung auf NOX2 haben soll[277]. Das Protein besteht aus 339 AS mit einem Molekulargewicht von 39 kDa und besitzt eine N-terminale PX-, eine SH3- und eine PB1-Domäne. Die Bindung zu p67^{phox} wird über die PB1-Domänen beider Untereinheiten bewerkstelligt[278-280]. Die Verbindung zu Plasmamembran-Phosphoinositiden geschieht über die PX-Domäne[281-283]. Es ist immer noch unklar, ob die SH3-Domäne von p40^{phox} direkt mit der PRR-Domäne von p47^{phox} interagiert[284;285] oder ob die Verbindung dieser Untereinheiten indirekt über p67^{phox} von statten geht[197].

Die ersten Hinweise, dass GTPasen die NADPH-Oxidasen beeinflussen könnten, wurden durch Studien gezeigt, die demonstrierten, dass Guanin-Nukleotide die Oxidase-Akivität stimulierten[286-289]. Diese Nukleotide wurden später als Rac1 und -2 identifiziert, die essentiell für die Oxidase-Funktion sind[290;291]. Rac gehört zur Rho-Familie kleiner GTPasen, deren Aktivität

durch Guanin-Nukleotide geregelt wird, mit denen sie assoziiert sind[292]. So ist Rac inaktiv, wenn GDP, und aktiv, wenn GTP gebunden ist[293;294]. Rac wird zur Plasmamembran unabhängig vom zytosolischen ternären Komplex ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$), wo GDP durch GTP ersetzt wird, wodurch Rac an das TPR-Motiv von $p67^{phox}$ binden kann[295-298]. Obwohl der Einfluss von Rac auf die NADPH-Oxidase-Aktivität derzeit immer noch diskutiert wird, ist denkbar, dass die Bindung zu $p67^{phox}$ eine Konformationsänderung innerhalb dieser Untereinheit bewirkt, was die Assoziation zu NOX2 ermöglicht und letztendlich zur Superoxid-Produktion führt[299]. Tatsächlich können hohe Konzentrationen an Rac und $p67^{phox}$ in Abwesenheit von $p47^{phox}$ den Elektronenfluss durch das Cytochrom bewirken[300;301].

1.1.6.2 NOX1-gebundene NADPH-Oxidasen

NOX1 war das erste identifizierte Homolog zu $gp91^{phox}$ und wurde zu Beginn Mox1 (*mitogen oxidase* 1) genannt[302]. Später wurde das Protein mit 564 AS und einem Molekulargewicht von 65 kDa in NOX1 umbenannt[241]. Es weist eine 56%ige Homologie zu $gp91^{phox}$ auf und besitzt ähnliche Strukturen wie NOX2, jedoch unterscheidet sich die Verteilung in den Geweben[302;303]. NOX1 ist im Darmepithelium[304;305], Magen[302], Plazenta[306], Uterus[302], vaskuläre glatte Muskelzellen[241] und in Phagozyten exprimiert, wo es eine Rolle in der Zell-Abwehr spielen könnte[307;308]. Die strukturellen Ähnlichkeiten zu NOX2 äußern sich im C-terminalen Schwanz, der die NADPH-Bindungsstellen, FAD-Hälften und zwei Häm-Regionen, sowie sechs mutmaßliche Transmembranregionen beinhaltet. Wie NOX2 wird auch NOX1 durch die Assoziation zu $p22^{phox}$ stabilisiert[210;309] und durch modulatorische Untereinheiten effizient reguliert. Tatsächlich ist das Heterodimer aus NOX1 und $p22^{phox}$ relativ inaktiv. Jedoch in Anwesenheit von NOXO1 (Nox *organizer* 1) und NOXA1 (Nox *activator* 1) (Homologe zu $p47^{phox}$ bzw. $p67^{phox}$) kommt es zur Superoxid-Produktion[263;304;308;310]. Interessanterweise sind $p47^{phox}$ und $p67^{phox}$ ebenfalls in der Lage, NOX1-exprimierende Systeme zu stimulieren[263;310], jedoch ist die Effizienz im Vergleich zu NOXO1 und NOXA1 merklich reduziert.

Das NOXO1-Protein weist eine 27%ige Übereinstimmung mit $p47^{phox}$ auf. Es besitzt eine N-terminale PX-Domäne, zwei SH3-Tandem-Domänen und eine C-terminale PRR, die als Bindungsstelle für SH3-Domänen fungiert[263;278]. Ein struktureller Hauptunterschied zu $p47^{phox}$ besteht in dem Fehlen von AIR, wodurch das geringere Molekulargewicht von etwa 41 kDa zu erklären ist[267]. Dieses charakteristische Merkmal erlaubt den SH3-Domänen von NOXO1, mit

$p22^{phox}$ auch ohne Stimulation zu interagieren[263]. Ähnlich wie bei $p47^{phox}$ ermöglicht die PX-Domäne die Bindung an Membran-Phospholipiden. Neueste Untersuchungen führten zur Identifikation von vier alternativen Splice-Varianten von NOXO1[311;312], die Unterschiede in der PX-Domäne zeigen, wodurch die subzelluläre Lokalisation von NOX1 und der damit verbundenen ROS-Produktion beeinflusst wird[209].

Ähnlich wie $p67^{phox}$ enthält NOXA1 (Molekulargewicht: ca. 51 kDa) vier TPR, die Rac binden und eine Aktivierungsdomäne für die Bindung an NOX1, was essentiell für die volle NOX1-Aktivität ist[312-314]. Darüber hinaus besitzt NOXA1 eine PB1-Domäne, wobei konservierte Lysin-Reste fehlen, was eine Interaktion mit $p40^{phox}$ ausschließt, welches ohnehin für die NOX1-Aktivität irrelevant zu sein scheint[263]. Anders als $p67^{phox}$ enthält NOXA1 lediglich eine C-terminale SH3-Domäne, die an NOXO1 bindet[263]. Diese strukturellen Diskrepanzen von NOXO1 zu $p47^{phox}$ bzw. von NOXA1 zu $p67^{phox}$ könnten die funktionellen Unterschiede zwischen NOX1- und NOX2-abhängigen Oxidasen erklären. Die NOX1-Oxidase ist wahrscheinlich konstitutiv aktiv, wobei NOX2 eine Phosphorylierungs-abhängige Aktivierung benötigt. Tatsächlich konnte Superoxid-Produktion detektiert werden, wenn das NOX1-$p22^{phox}$-Dimer mit NOXO1 und NOXA1 co-exprimiert wurde. Dieser Effekt konnte durch PMA-Stimulation verstärkt werden[263].

1.1.6.3 NOX4-gebundene NADPH-Oxidasen

NOX4 wurde zuerst in der Niere nachgewiesen und Renox genannt[315;316]. Das Protein besteht aus 578 AS und zeigt eine 39%ige Homologie zu NOX2. Die Expression erstreckt sich neben dem Nierencortex von Endothelzellen[211;220;317;318], über glatten Muskelzellen[221;319-321], Herz[241;322] und Pankreas[241] bis hin zu Osteoclasten[323]. NOX4 besitzt dasselbe Elektronentransport-System wie NOX1 und -2. Darüber hinaus sind vier Splice-Varianten bekannt, denen wichtige Teile dieses Systems fehlen[324]. NOX4 bildet ebenfalls ein Heterodimer mit $p22^{phox}$, was notwendig für die Aktivität und Stabilität ist[210;325]. Jedoch ist die PRR-Region von $p22^{phox}$ für die NOX4-Oxidase-Aktivität redundant[309]. Weiterhin scheint die NOX4-Oxidase unabhängig von den Organisator- bzw. Aktivator-Proteinen zu sein[210;309;325]. Es scheint sich um ein konstitutiv aktives ROS-produzierendes System zu handeln, dessen ROS-Bildung lediglich durch dessen Expressionslevel[320] oder durch posttranslationale Modifikationen der Proteine geregelt wird.

Zweifellos stellt auch die Beeinflussung von NADPH-Oxidasen eine interessante Möglichkeit für therapeutische Interventionen dar, da sie unter pathologischen Bedingungen aktiver zu sein scheinen und u.a. die Notwendigkeit der Aktivierung der membrangebundenen NOX1 und -2 durch zytosolische Untereinheiten besteht, wobei eine Inhibierung die basale ROS-Produktion wahrscheinlich nicht beeinflussen würde[326]. Es ist sehr gut möglich, dass einige positive Effekte von Statinen auf der Inhibierung von NADPH-Oxidasen beruhen[327]. Spezifische Inhibitoren, die z. B. die Assoziation von $p47^{phox}$ zu NOX2 unterbinden, könnten nachfolgende Reaktionen in der Signalkaskade beeinflussen. Die Behandlung mit dem zellpermeablen NOX2-Inhibitor (gp91ds), der die Unterbindung dieser Interaktion zum Ziel hat, führte zur signifikanten Abnahme der neointimalen Hyperplasie in der *A. carotis* von Ratten[328]. In ähnlicher Weise blockierte gp91ds die adventitielle Fibroblasten-Proliferation *in vitro*[329]. Jedoch zeigte die Inhibierung des adventitiellen $p67^{phox}$ keinen nennenswerten Effekt[329]. Weiterhin demonstrierte Ni *et al.*[330], dass die Inhibierung des Transkriptionsfaktors Ets-1 in humanen primären glatten Muskelzellen die ROS-Produktion und die Induktion der $p47^{phox}$-Expression als Antwort auf Angiotensin II reduzierte. Es konnte gezeigt werden, dass Ets-1 nicht nur ein potentieller therapeutischer Angriffspunkt für vaskuläre Entzündung, sondern auch spezifisch für Proteine sein könnte, die mit NADPH-Oxidasen assoziiert sind. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Studien veröffentlicht, die eine Verbindung zwischen den NOX-Enzymen und einigen kardio-vaskulären Erkrankungen demonstrierten. Jedoch sind die molekularen Mechanismen der NADPH-Oxidasen komplex und deren Rolle bei der Entstehung und Entwicklung diverser kardio-pulmonaler Erkrankungen wie COPD noch nicht völlig geklärt, wodurch weitere Untersuchungen unabdingbar sind.

1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob die Expression von NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen in der Lunge durch Zigarettenrauch beeinflusst wird und ob sie eine Rolle in der Entstehung von COPD spielen könnten.

Zur Induktion der Erkrankung wurde ein etabliertes Rauchexpositionsmodell verwendet, wobei C57BL/6J -Mäuse bis zu acht Monate Zigarettenrauch ausgesetzt wurden. Mäuse stellten ein geeignetes Tiermodell für COPD dar, da schon vermehrt gezeigt wurde, dass sie suszeptibel für Zigarettenrauch-induziertes Emphysem bei COPD sind[331-335]. Darüber hinaus waren diverse Gendeletions-Mutanten für NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen mit C57BL/6J -Hintergrund verfügbar. Das verwendete Modell stellte ein Emphysem- und weniger ein obstruktives Modell dar, da in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass sich bei Mäusen der Atemwegswiderstand auf den Stimulus Rauch senkt und nicht erhöht[334].

Im Zuge dieser Arbeit wurden folgende Aspekte näher untersucht:

1. die Gen-Expression der NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen (iNOS, eNOS) im Verlauf der Entwicklung der COPD im Lungenhomogenat von Mäusen und in Lungengewebe von COPD-Patienten
2. die Protein-Expressionen im murinen und humanen Lungenhomogenat und deren Lokalisation in der Lunge
3. Gen-Expressions-Analysen in mikrodissektierten Gefäßen und Septen, glatten Muskelzellen und rechtem Ventrikel
4. Microarray-Experimente mit RNA von mikrodissektierten Septen 3 und 8 Monate Rauch-exponierter Mäuse
5. phänotypische Untersuchung von Wildtyp- und $gp91^{phox}$-defizienten Mäusen via Alveolar-/Vaskularmorphometrie und Lungenfunktionstests
6. Vergleich von Wildtyp- und $gp91^{phox}$-Knockout-Mäusen bezüglich der NADPH-Oxidasen- und NO-Synthasen-Expressionen
7. Nähere molekulare Charakterisierung der Phänotypen der genannten Mausstämme mit Fokus auf den MAPK-Signalweg, Nitrotyrosin-, PCNA- und MMP12-Expression, jeweils von Kontrollen und Rauch-exponierten Individuen

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bio Imaging System Chemi Genius	VWR (Syngene), Darmstadt
Elektrophoresekammern	Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Entwicklermaschine Curix	AGFA, Mechelen, Belgien
Fluoreszenzmikroskop (Leica CTR MIC)	Leica, Nussloch
Homogenisator Precellys 24	Peqlab, Erlangen
Laser-Mikrodissektions-System LMD6000	Leica, Wetzlar
Leica DMLA Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroplattenlesegerät ELx808	Bio-Tek, Bad Friedrichhall
Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad, München
Mx3000P® QPCR System	Agilent (Stratagene), Waldbronn
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore, Schwalbach
Spannungsgerät für Elektrophorese	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer „ND-1000“	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Thermocycler T-personal	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Vertikal-/Horizontalschüttler	Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Vortexer MS1 Minishaker	IKA GmbH, Staufen
Zellinkubator HERAcell 150	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen

Rauchmaschine

3R4F *Research* Zigaretten	University of Kentucky, Kentucky Tobacco Research and Development Centre, Lexington, KY, USA
Computer Programm zur Luft-/Rauchkontrolle	TSE Systems, Bad Homburg
Millipore Filter	Millipore, Schwalbach

Pumpe zum Rauchabtransport aus der Kammer	TSE Systems, Bad Homburg
Rauchexpositionssystem	TSE Systems, Bad Homburg
Vacuum-Pumpen	Jun-Air, Ahrensburg

Software für Morphometrie

Computer Q 550 IW Leica Microsystems	Leica, Nussloch
Makros für Alveolar-/Vaskularmorphometrie	Leica, Nussloch
Software Q Win V3 Leica Microsystems	Leica, Nussloch

2.1.2 Chemikalien

Die meisten verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim) und Roth (Karlsruhe) bezogen und werden nicht im Einzelnen aufgeführt.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

96-well Mikroplatten	Abgene bzw. Thermo Fisher Scientific
AGFA Cronex 5 Medical X-Ray Film	AGFA, Mortsel, Belgien
Amersham Hyperfilm ECL GE	Healthcare, München
Beatmungsgas (50% O_2, 50% N_2)	Air Liquid, Siegen
Blottingpapier Whatman	Schleicher & Schuell, Dassel
DAB Substrate Kit	Vector/ Linaris, Wertheim
Heparin Liquemin N 25000®	Roche Basel, Schweiz
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ ml Ketamin®	Pharmacia, Erlangen
Lidocainhydrochlorid 2% Xylocain®	Astra Zeneca, Wedel
Membran-Slides	Microdissect GmbH, Herborn
Methylgrün, Kernfärbung	Vector/ Linaris, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
PVDF-Membran BioTrace	Pall Life Sciences, Dreieich
Real-time PCR-Reaktionsgefäße	Thermo-Fisher, Abgene, Hamburg
Resorcin Fuchsin	Chroma, Münster
Vector VIP Substrate Kit	Vector/ Linaris, Wertheim

Zellkultur

DPBS (1x ohne Ca^{2+}, ohne Mg^{2+})	Invitrogen, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
L-Glutamin (200mM, 100x)	PAN-Biotech, Aidenbach
Medium 199	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	PAN-Biotech, Aidenbach
PP-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Trypsin/EDTA (10x)	PAN-Biotech, Aidenbach
Waymouth´s Medium MB 752/1	Promocell, Heidelberg
Zellkulturflaschen, -schalen, -platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber Greiner	bio-one, Frickenhausen

2.1.4 Enzyme und Größenstandards

DNA**:**

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
HotTaq DNA Polymerase	Peqlab, Erlangen

Protein:

Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker	Bio-Rad, München

2.1.5 Kits und Assays

DC Protein Assay	Bio-Rad, München
iScript-cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
RNeasy Mini u. Micro Kit	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
iTaq-Sybr Green-Mix	Bio-Rad, München

2.1.6 Verwendete Primer

Die Primer wurden mit dem kostenlosen Internet-Programm „Primer 3“ (http://frodo.wi.mit.edu/primer3) entwickelt und dann als 100 µM Lösung von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) bezogen. Alle Primer wurden so konstruiert, dass ihre Schmelztemperaturen zwischen 61 und 63 °C lagen, so dass alle mit denselben PCR-Programmen verwendet werden konnten.

Die in **Tab. 1** aufgeführten Primer für die Real-Time PCR sind ausnahmslos Intron-überspannend:

Tabelle 1: Primer für die Real-time PCR

Gen	Primersequenz	Produktgröße [bp]
Maus-spezifisch		
PBGD	F: 5´-GGGAACCAGCTCTCTGAGGA-3´	**121**
	R: 5´-GAATTCCTGCAGCTCATCCA-3´	
$p22^{phox}$	F: 5´-AGATCGAGTGGGCCATGTG-3´	**187**
	R: 5´-ATGGTGGACCCCTTTTTCCT-3´	
$p40^{phox}$	F: 5´-TTTGAGCAGCTTCCAGACGA-3´	**213**
	R: 5´-GGTGAAAGGGCTGTTCTTGC-3´	
$p47^{phox}$	F: 5´-TTGGGTCCCTGCATCCTATC-3´	**182**
	R: 5´-ACCAGCCATCCAGGAGCTTA-3´	
$p67^{phox}$	F: 5´-CAGACCCAAAACCCCAGAAA-3	**223**
	R: 5´-AGGGTGAATCCGAAGCTCAA-3´	
NOX1	F: 5´-CCCCTGAGTCTTGGAAGTGG-3´	**158**
	R: 5´-GCTAAAGCCTCGCTTCCTCA-3´	
$gp91^{phox}$	F: 5´-TCGCTGGAAACCCTCCTATG-3´	**215**
	R: 5´-GGATACCTTGGGGCACTTGA-3´	
NOX4	F: 5´-CCGGACAGTCCTGGCTTATC-3´	**159**
	R: 5´-TTGAGGGCATTCACCAAGTG-3´	
NOXA1	F: 5´-AGCTGCAGAGGTTCCAGGAG-3´	**227**
	R: 5´-GATGTCTTGAGCCCCCTCTG-3´	
NOXO1	F: 5´-TTCCTGATGCTCCATTGCTG-3´	**226**
	R: 5´-GGTTGGGATAAGGGCTCCTC-3´	
DUOX1	F: 5´-AGGCCTGCCTTCTTACACCA-3´	**202**
	R: 5´-GAAAAGGGGTCCAGGGTCTC-3´	
DUOX2	F: 5´-CTTCACGCTGACCTCTGCAC-3´	**206**
	R: 5´-CCCCTCCTACCAGCACTGAC-3´	
Rac1	F: 5´-GACAGATTGCGTCCCCTCTC-3´	**121**
	R: 5´-AGTGGTGTCGCACTTCAGGA-3´	
Rac2	F: 5´-CAGGCCATCAAGTGTGTGGT-3´	**149**
	R: 5´-ACCGGCTTACTGTCCACCAT-3´	
iNOS	F: 5´-TGATGTGCTGCCTCTGGTCT-3´	**229**
	R: 5´-AATCTCGGTGCCCATGTACC-3´	

eNOS	F: 5´-ACACAAGGCTGGAGGAGCTG-3´ R: 5´-TGGCATCTTCTCCCACACAG-3´	**147**

Human-spezifisch		
PBGD	F: 5´-GCAGGAGTTCAGTGCCATCA-3´ R: 5´-CACACCCACCAGATCCAAGA-3´	**172**
p22^{phox}	F: 5´-TACTATGTTCGGGCCGTCCT-3´ R: 5´-CTTGATGGTGCCTCCGATCT-3´	**189**
p40^{phox}	F: 5´-CCTCCTCAGTCGGATCAACA-3´ R: 5´-AGTAGCAACGCAGCCAGTTG-3´	**137**
p47^{phox}	F: 5´-GACCCTGAGCCCAACTATGC-3´ R: 5´-ACGGGAAGTAGCCTGTGACG-3´	**169**
p67^{phox}	F: 5´-TGCCTGACTCTGTGGTGTGA-3´ R: 5´-TCCACTTGGCTGCCTTTCTT-3´	**128**
NOX1	F: 5´-TGTTTGTGGATGCCTTCCTG-3´ R: 5´-AAGGACAGCAGATTGCGACA-3´	**160**
gp91^{phox}	F: 5´-GCCAGATGCAGGAAAGGAAC-3´ R: 5´-TCATGGTGCACAGCAAAGTG-3´	**100**
NOX4	F: 5´-GGTTAAACACCTCTGCCTGTTC -3´ R: 5´-CTTGGAACCTTCTGTGATCCTC -3´	**234**
NOXA1	F: 5´-ATCATGGACTCCCCAAGAGC-3´ R: 5´-TGTTTGCCAACTTGCTCCAC-3´	**128**
NOXO1	F: 5´-TGCAGATCAAGAGGCTCCAA-3´ R: 5´-GAGAACGCGGTCAGATCTCC-3´	**161**
DUOX1	F: 5´-GGCTGACCCACCACCTCTAC-3´ R: 5´-ACCACGCTGATCTCCACCTT-3´	**169**
DUOX2	F: 5´-GGCCACGCAGTCAATGTCTA-3´ R: 5´-CTGGGACGGTCTGGAAGAAC-3´	**136**
Rac1	F: 5´-CCCTTGTGAGTCCTGCATCA-3´ R: 5´-ATGGCTAGACCCTGCGGATA-3´	**187**
Rac2	F: 5´-AAGCTGGCTCCCATCACCTA-3´ R: 5´-ACGGTTTTCAGGCCTCTCTG-3´	**107**
iNOS	F: 5´-ATGAGGAGCAGGTCGAGGAC-3´ R: 5´-CTGACATCTCCAGGCTGCTG-3´	**138**
eNOS	F: 5´-GAGTCTGCTCCACGTGGCTA-3´ R: 5´-GCCCTTTGCTCTCAATGTCA-3´	**189**

2.1.7 Verwendete Antikörper

In **Tabelle 2** sind alle verwendeten Antikörper (AK) aufgeführt. Für Western Blot-Analysen wurden alle in der Regel in 6% (w/v) Milch/TBST verdünnt. Antikörper zur Untersuchung von phosphorylierten Proteinen wurden in 5% (w/v) BSA verdünnt.

Tabelle 2: Im Western Blot verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen

Primäre Antikörper						
Antikörper	**Spezies**	**Firma**	**Bestell-Nr.**	**WB**	**IF**	**IHC**
α-eNOS	rabbit	BD Biosciences, Heidelberg	610298	1:1000	1:50	-
α-iNOS	rabbit	Abcam, Cambridge, UK	ab3523	1:2000	1:50	-
α-Nitrotyrosin	rabbit	Abcam, Cambridge, UK	ab7048	1:1000	-	1:250
α-β-Aktin	mouse	Sigma-Aldrich, Steinheim	A5316	1:30000	-	-
α-NOXO1	rabbit	Lifespan, Seattle, USA	LS-B485	-	1:3000	-
α-NOXO1	rabbit	generiert*	27	-	1:200	-
α-NOXA1	rabbit	generiert*	199	-	1:300	-
α-NOXA1	rabbit	generiert*	200	1:300	-	-
α-SMA	rabbit	Sigma-Aldrich, Steinheim	A5228	-	1:500	1:1000
α-$gp91^{phox}$	rabbit	Millipore (Upstate), Schwalbach	07-024	-	1:75	-
α-ERK1/2	rabbit	Cell signalling	9102	1:1000	-	-
α-p-ERK1/2	rabbit	Cell signalling	9101	1:1000	-	-
α-$p38^{MAPK}$	rabbit	Cell signalling	9212	1:1000	-	-
α-p-$p38^{MAPK}$	rabbit	Cell signalling	9211	1:1000	-	-
α-JNK	rabbit	Cell signalling	9252	1:1000	-	-
α-p-JNK	rabbit	Cell signalling	9251	1:1000	-	-
α-Cyclin D1	rabbit	Cell signalling	2978	1:1000	-	-
α-PCNA	rabbit	Abcam, Cambridge, UK	ab2426	-	-	1:200
α-vWF	rabbit	Dako, Hamburg	A0082	-	-	1:1000

* zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R.P. Brandes, Frankfurt

Sekundäre Antikörper (Peroxidase-gekoppelt)						
Antikörper	**Spezies**	**Firma**	**Bestell-Nr.**	**WB**	**IF**	**IHC**
α-rabbit	goat	Promega, Mannheim	W401B	1:5000	-	-
α-mouse	rabbit	Promega, Mannheim	W402B	1:5000	-	-

Sekundäre Antikörper (Fluoreszenz-gekoppelt)						
Antikörper	**Spezies**	**Firma**	**Bestell-Nr.**	**WB**	**IF**	**IHC**
α-rabbit_AF488	goat	Invitrogen, Karlsruhe	A-11008	-	1:500	-
α-rabbit_AF555	goat	Invitrogen, Karlsruhe	A-21428	-	1:500	-

2.1.8 Verwendete Plasmide

Plasmide, die die Überexpression von NOXA1 (*GenBank* Annahmezahl: AF539798) und NOXO1 (*GenBank* Annahmezahl: AF539797) ermöglichten, wurden von Prof. Dr. R.P. Brandes in Frankfurt im Rahmen des ECCPS zur Verfügung gestellt. Diese Plasmide stammen ursprünglich von Dr. B. Banfi (Iowa University, IA, USA). Die genannten Plasmide wurden zuvor schon validiert, manifestiert durch den Einsatz in Publikationen[336].

Für die Transfektionen wurden folgende Plasmide verwendet, die nach Erhalt in *E. coli* transformiert, amplifiziert und danach aus den Zellen mit Hilfe eines Minipräparations-Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Nach Validierung der Plasmide durch Kontroll-Restriktionen (Daten nicht gezeigt) wurden diese erneut, aber dieses Mal in größerem Maßstab, in *E. coli* vermehrt und durch Maxipräparation (Maxiprep Kit, Qiagen, Hilden) isoliert, um mehrere µg Plasmid/µl zu erhalten.

(1) pcDNA3.1/V5-His-TOPO/LacZ (Invitrogen, Karlsruhe): Kontrollplasmid
(2) pcDNA3.1_NOXA1: NOXA1 überexprimierend
(3) pcDNA3.1_NOXO1: NOXO1 überexprimierend

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

Für die Versuche wurden adulte männliche C57BL/6J Wildtyp (WT)- und $gp91^{phox-/-}$ (B6.12956-$Cybb^{tm1Din}$/J)-Mäuse von Charles River (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld) mit einem Anfangsgewicht von 20-22 g verwendet. Die Tiere wurden jeweils in zwei Gruppen mit identischer Anzahl aufgeteilt, wobei eine Gruppe fortwährend in Umgebungsluft mit 21% Sauerstoff gehalten und die andere Rauch-exponiert wurde. Die Tiere wurden bis zum Versuchstag mit Futter und Wasser versorgt.
Alle Experimente wurden durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

2.2.2 Rauchexposition

Wildtyp- und $gp91^{phox-/-}$-Mäuse wurden für 6 Stunden pro Tag, 5 Tage pro Woche dem Rauch von 3R4F-*Research*-Zigaretten (University of Kentucky, Kentucky Tobacco Research and

Development Centre, Lexington, KY, USA) für bis zu 8 Monaten ausgesetzt. Dabei wurde eine konstante Partikelkonzentration in der Rauchkammer von 140 mg/m^3 eingehalten. Um die Komponente des Alterungseffekts auszuschließen, wurden in der Kontrollgruppe Mäuse verwendet, die nicht Rauch-exponiert, sondern in Umgebungsluft gehalten wurden.

2.2.3 Maus-/Gewebepräparation

Nach 2 Wochen, 3 bzw. 8 Monaten Rauch-Exposition wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von Anästhetikum (50 µg/g Ketamin, 10 µg/g Xylazin) betäubt. Danach wurde der Thorax geöffnet und die Lunge je nach Zweck folgendermaßen behandelt.

Für molekularbiologische Untersuchungen wurde die Lunge über die Pulmonalarterie mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl, Braun, Melsungen) gespült und entweder direkt in flüssigen Stickstoff gefroren oder über die Luftröhre mit 500-600 µl Tissue Tek® (Sakura Finetek, Staufen, Deutschland) gefüllt und anschließend in flüssigen Stickstoff gefroren.

Für alveoläre Morphometrie wurden die Lungen über die Trachea mit Formaldehyd (3,5-3,7%, Fischar, Saarbrücken) mit einem Druck von 22 cm H_2O fixiert, für vaskuläre Morphometrie mit Zamboni (2%iges (v/v) Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer mit 15% (v/v) Pikrinsäure; pH 7,3-7,4) bei gleichem Druck. Zuvor erfolgte ebenfalls ein Freispülen der Lungen über die Pulmonalarterie mit NaCl. Nach der Fixierung über Nacht wurden die Lungen mit Hilfe eines automatischen Vakuum-Gewebeprozessors (Leica TP1050, Bensheim) in 0,1 M PBS gewaschen und danach durch steigende Alkoholkonzentrationen dehydriert. Schließlich wurden sie in Paraffin eingebettet.

2.2.4 Alveolarmorphometrie

Zu diesem Zweck wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte der in Paraffin eingebetteten Lungen angefertigt. Diese wurden dann nach Entparaffinierung (durch 1 h Erwärmen bei 60°C und anschließender Xylol-Behandlung) und Rehydrierung (durch absteigende Alkoholreihe) mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt, dehydriert in Xylol und mit harzigem Medium (Pertex®) eingedeckt. Schließlich wurden sie unter dem Lichtmikroskop (Leica DMLA) untersucht. Die morphometrischen Messungen wurden mit Hilfe eines Computers und dem Analyse-Programm Leica QWin durchgeführt. Zunächst wurde der gesamte Schnitt bei 5facher Vergrößerung

eingescannt und in Mosaike unterteilt. Für die Analyse wurden 50-100 dieser Felder bei 10facher Vergrößerung untersucht. Die Auswertung basierte auf unterschiedliche Farbintensitäten, die von der Software erkannt wurden. Die Unterscheidung des Lungengewebes von den Lufträumen erfolgte durch eine stärkere Farbintensität des Gewebes. Mit Hilfe des Programms wurden der Luftanteil blau und der Gewebeanteil grau eingefärbt. Im Anschluss wurden nicht-parenchymatöse Bereiche wie Bronchien und Gefäße in jedem Analysefeld umrandet und so von der Analyse ausgeschlossen. Bei der Vermessung der respiratorischen Fläche wurden Parameter wie der *mean linear intercept*, d.h. der mittlere Abstand zwischen zwei Alveolarsepten, die mittlere Septendicke (*septal wall thickness*) und der Gesamtluftanteil (*alveolar air space*) im Lungengewebe untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte in Microsoft® Excel.

2.2.5 Vaskuläre Morphometrie

Der Muskularisierungsgrad in kleinen pulmonalen Arterien wurde an 3 µm dicken Paraffinschnitten gemessen. Dazu wurden die Lungen-Schnitte mit für glatte Muskelzellen (α-Aktin; *mouse monoclonal smooth muscle alpha actin*, Clone 1A4, Sigma-Aldrich, Steinheim) und Endothel-Zellen spezifischen (von Willebrand-Faktor (vWF); *rabbit polyclonal von Willebrand Factor*, Dako) Markern versehen. Die verwendeten Primär-Antikörper wurden jeweils 1:900 in 10% (w/v) BSA verdünnt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Färbungen wurden die Lungen-Schnitte nach Entparaffinierung, Rehydrierung, Blockierung der endogenen Peroxidasen in 3% H_2O_2 in Methanol, Demaskierung der Epitope proteolytisch mit Trypsin (DigestAll) und Blockierung unspezifischer Bindungen mit 10% (w/v) BSA mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-basierten System (Vectastain Elite ABC Kits und Vector VIP/DAB Substratkits, Vector/Linaris, Wertheim) behandelt, wobei zwischendurch die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte. Dieses System diente der Detektion und Visualisierung der gebundenen Antikörper. Zur Unterscheidung wurden unterschiedliche Chromogene benutzt: für α-Aktin Vector VIP (violett), zur Darstellung des vWF 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (braun). Für die Gegenfärbung der Kerne wurde Methylgrün verwendet.

Die Analyse erfolgte mit einem eigens für diesen Zweck programmiertes Makro von Leica (*Muscularization Macro*). Das Programm erkannte automatisch α-Aktin und kategorisierte die Gefäße in voll-muskularisiert (>70 % der Gefäßfläche), teil-muskularisiert (5-70 % der Gefäßfläche) und nicht-muskularisiert (<5 % der Gefäßfläche). Es wurden für jede Lunge (linker

Lungenlappen) 100 Arterien (85 Gefäße mit einem Durchmesser von 20-70 µm, 10 mit 70-150 µm und 5 mit >150 µm) ausgezählt.

2.2.6 Morphometrie des vaskulären Lumens

Das Lumen (*lumen area*) der pulmonalen Arterien wurde an 3 µm dicken Paraffin-Schnitten durchgeführt. Diese wurden nach Elastica Kernechtrot (Elastica Van Gieson) eingefärbt. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte zur Darstellung der elastischen Fasern über Nacht in Resorcin Fuchsin gefärbt. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Kernechtrot Aluminiumsulfat. Die Schnitte wurden nach Dehydrierung und Immersion in Xylol mit harzigem Medium (Pertex®) eingedeckt. Die genannten Farbstoffe ermöglichten die Unterscheidung verschiedener Bindegewebe und Zellbestandteile. So färbten sie die elastischen Fasern violett-schwarz, den Zellkern dunkelbraun, die Kollagenfasern rot und die Muskelfasern und das Zytoplasma gelb.

Die morphometrischen Untersuchungen wurden mit eigens für diesen Zweck programmiertes Makro von Leica (*Wall thickness Macro*) durchgeführt. Von jedem Schnitt wurden 80 (20-70 µm Durchmesser), 10 (70-150 µm Durchmesser) und 5 Gefäße (>150 µm Durchmesser) gemessen. Das Programm erkennt automatisch den äußeren (*tunica externa*) und inneren Durchmesser (*tunica intima*) des Gefäßes und berechnet die Lumenfläche. Die vaskulären Lumina wurden durch Mitteln der einzelnen Lumenflächen innerhalb der verschiedenen Gefäßgrößen berechnet.

2.2.7 Verhältnis Anzahl der Alveolen zu Anzahl der Gefäße

Um das Verhältnis der Alveolen zu den Gefäßen zu ermitteln, wurden die Lungenschnitte, die für die vaskuläre Morphometrie gefärbt und verwendet wurden, benutzt. Dazu wurden die Schnitte erneut gescannt und unter 10facher Vergrößerung in 64 Mosaike, d.h. kleinere Einzelbilder, unterteilt. In jedem einzelnen Mosaik wurde die Anzahl der Alveolen und Gefäße manuell ausgezählt. Die einzelnen Ergebnisse wurden summiert, gemittelt und das Verhältnis Alveolen zu Gefäße bestimmt.

2.2.8 *In vivo* Hämodynamik

Die Mäuse wurden mit einem Gemisch aus Ketamin (6 mg/100 g) und Xylazin (1 mg/100 g) intraperitoneal anästhetisiert und mit Heparin (1000 U/kg) anticoaguliert. Die Lungen wurden via Trachea mit Raumluft bei einem Tidalvolumen von 0,2 ml und 120 Atemzügen/min ventiliert. Die physiologische Körpertemperatur wurde während des gesamten Experiments aufrechterhalten.

Der systemische arterielle Druck wurde durch Katheterisierung der *A. carotis* ermittelt. Zur Messung des rechts-ventrikulären systolischen Drucks (RVSP) wurde ein PE-10 Schlauch über die rechte *vena jugularis* in den rechten Ventrikel eingeführt.

2.2.9 Herz-Ratio-Messungen

Zur Untersuchung einer möglichen Rechtsherzhypertrophie infolge von Rauchexposition wurde das Verhältnis von rechtem Ventrikel (RV) zum linken Ventrikel plus Septum (LV+Septum) ermittelt. Dazu wurden die Herzen von Kontroll- und rauchexponierten Mäusen isoliert und RV und LV+Septum separiert. Diese wurden dann für zwei Wochen bei Raumtemperatur getrocknet und die Trockengewichte bestimmt, so dass in der Folge die Herz-Ratios kalkuliert werden konnten.

2.2.10 Molekularbiologische Methoden

2.2.10.1 Laser-Mikrodissektion

Um RNA aus kleinsten Lungenkompartimenten wie Gefäßen, Septen und/oder Bronchien zu gewinnen, wurde Mikrodissektion an Tissue-Tek®-eingebetteten Lungen durchgeführt (Sakura Finetek, Staufen). Dazu wurden mit Hilfe eines Kryostaten (Leica) 10 µm dicke Kryo-Schnitte angefertigt und auf Membran-Slides (Katalog-Nr.: 11505158, Microdissect GmbH, Herborn) transferiert, die zuvor mit RNase Zap (Sigma-Aldrich, Steinheim) gereinigt wurden. Dann wurden die Schnitte folgendermaßen gefärbt. Einer Färbung mit Hämalaun (Waldeck, Münster) (bei Mausgewebe) für 45 s folgte jeweils 2mal ein Eintauchen in destilliertes Wasser, 70%, 96% und 100% Ethanol. Human-Lungen wurden anstelle von Hämalaun für 10 s mit Hämatoxylin, H_2O und 20 s mit Eosin (1:5 verdünnt) gefärbt, gefolgt von der oben genannten Alkoholreihe.

Danach wurde der Luft-getrocknete Membran-Slide samt Schnitt zur Mikrodissektion verwendet, wobei intrapulmonale Arterien mit einem Durchmesser von 50-150 µm bzw. Septen und/oder Bronchien mit dem Laser-Mikrodissektions-System (LMD 6000, Leica, Wetzlar) isoliert und in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß gesammelt wurden. Das gesammelte Material wurde dann in 300 µl RNA-Lyse-Puffer (RLT-Puffer, Qiagen, Hilden) aufgenommen, durch Vortexen vermischt, kurz zentrifugiert und in flüssigen Stickstoff bis zur Verwendung gelagert.

2.2.10.2 RNA-Isolation, Präamplifikation und cDNA-Synthese

Die Isolation von Gesamt-RNA aus mikrodissektiertem Material oder homogenisiertem Maus- und Human-Lungengewebe wurde mit Hilfe von RNeasy Micro- bzw. Mini-Kits (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt, wobei in der Regel eine zusätzliche DNase-Behandlung (DNase Set, Qiagen, Hilden) enthalten war. Für die Homogenisierung der Lungengewebe wurde ein Homogenisator (Precellys 24, Peqlab, Erlangen) verwendet. Dazu wurden gefrorene Gewebestücke in 2 ml Schraubverschluss-Gefäße überführt (Mikro-Schraubröhre, Sarstedt, Nümbrecht), die 600 µl RLT-Lyse-Puffer (Qiagen, Hilden) und 1,4 mm Keramikkügelchen (Peqlab, Erlangen) enthielten. Es folgte eine Homogenisierung für 30 s im Homogenisator und eine anschließende Zentrifugation für 10 min bei 10000 rpm mit einer Microzentrifuge 200 (Hettich, Tuttlingen), um Zelltrümmer von den löslichen Gesamt-RNAs zu trennen. Danach wurde der Überstand zur RNA-Isolation nach Protokoll verwendet. RNA, hervorgegangen aus Mikrodissektion, wurde mit einem modifizierten Quick Amp Labelling Kit (Agilent, Böblingen) präamplifiziert, wobei anstelle von Cy3/Cy5-gelabelten ungelabelte CTPs verwendet wurden.

Die RNA-Konzentrationen wurden mittels NanoDrop (ND-1000, Kisker-Biotech, Steinfurt) ermittelt. Für die Herstellung von cDNA wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt, die mit Hilfe des iScript cDNA Synthesis Kits (Bio-Rad, München) durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Diese Reaktion lief unter folgenden Bedingungen ab: 1 Zyklus bei 25°C für 5 min; 1 Zyklus bei 42°C für 30 min; 1 Zyklus bei 85°C für 5 min.

Diese cDNA wurde in diversen (Real-Time) PCR-Reaktionen eingesetzt.

2.2.10.3 Quantitative Real-Time PCR

Diese Methode wurde verwendet, um Genexpressionsanalysen durchzuführen, wobei in der Regel Kontroll-Tiere mit Rauch-exponierten Tieren verglichen wurden.

Das Prinzip der Real-Time PCR beruht auf Messungen der Fluoreszenz, die während des PCR-Laufes proportional mit dem PCR-Produkt zunimmt. Die Fluoreszenz entsteht dabei durch Interkalation des verwendeten Farbstoffs SYBR®Green I in doppelsträngige DNA, die quantitativ mit jedem Zyklus zunimmt. Während dieser proportionalen Zunahme doppelsträngiger DNA-Moleküle lagert sich immer mehr SYBR®Green I an die DNA an und steigert so die Fluoreszenz.

Um die Spezifität der Reaktion und die Gegenwart von Primer-Dimeren oder Verunreinigungen zu überprüfen, wird am Ende des PCR-Laufes eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei dieser wird die Temperatur von 55°C bis 95°C in kleinen Schritten kontinuierlich erhöht, so dass doppelsträngige DNA zum Einzelstrang aufschmilzt und der SYBR®Green I-Farbstoff wieder freigesetzt wird. Da spezifische PCR-Produkte eine größere Fragmentlänge aufweisen als unspezifische Primer-Dimere oder andere unspezifische Produkte, können diese anhand der Schmelztemperatur voneinander unterschieden werden.

Die Durchführung der Real-Time PCR erfolgte mit dem Mx3000P® QPCR System der Firma Stratagene. Für die Reaktionen wurde der iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers benutzt. Dazu wurden 25 µl-Ansätze verwendet, die 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix, je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (je 10 pmol/µl), 9,5 µl steriles Wasser und 2 µl (1:5-verdünnte) cDNA als *Template* beinhaltete. Als Negativ-Kontrolle (um Kontaminationen auszuschließen) wurde bei jedem Lauf eine *Non-template*-Kontrolle für jeden Mastermix durchgeführt. Im Folgenden sind die Bedingungen eines Reaktionsansatzes aufgeführt:

Programm:

Abschnitt:	Temperatur:	Dauer:	Zyklen:
Denaturierung/Enzymaktivierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	10 sec	40x
Primer-Anlagerung (*Annealing*)	59°C	10 sec	
Elongation	72°C	10 sec	
Denaturierung	95°C	1 min	
Schmelzkurve	55°C-95°C		
Abkühlen	25°C	∞	

Die Ct-Werte wurden zum Referenz-Gen Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) normalisiert, das im verwendeten COPD-Modell durch die Rauchexposition nicht reguliert wurde. Die Analysen und Darstellung der Ergebnisse erfolgten durch die ΔCt-Methode, wobei Ct(PBGD) - Ct(untersuchtes Gen) (= ΔCt).

2.2.10.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der (Real-Time) PCR-Produkte wurden diese im Anschluss an die PCR in einem Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt. Das meist 1,6%ige Gel wurde aus Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 1 x TAE-Puffer (Tris-Acetat 40 mM; EDTA 1 mM; pH 7,6) hergestellt. Nach Kochen der Agarose in der Mikrowelle wurde diese auf etwa 50-60°C abgekühlt und dann mit 2,5 µl Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt. Als das Gel erstarrt war, wurden 2,5 µl eines DNA-Standards (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; Fermentas, St. Leon-Rot) und 5-15 µl des PCR-Produkts auf das Gel geladen. Nachdem sich die PCR-Produkte bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt hatten, wurde das Bandenmuster des Gels unter UV-Licht bei 320 nm im Bio Imaging System (ChemiGenius, Synoptics, Cambridge, UK) visualisiert und fotografiert.

2.2.10.5 Microarray-Analyse von mikrodissektierten Alveolarsepten

Um die Veränderung der Genexpression in der Entwicklung der COPD Genom-umgreifend zu untersuchen, wurden Alveolarsepten wie unter 2.2.10.1 beschrieben aus 3 und 8 Monate Rauch-exponierten Mäusen (je n = 12) isoliert und die gewonnene Gesamt-RNA mit Hilfe des Quick Amp Labelling Kits (Agilent, Böblingen) präamplifiziert und Cy3- bzw. Cy5-markiert. Ein sogenannter *Dye-Swop* wurde zur Überprüfung der Spezifität und Unabhängigkeit der Ergebnisse von der jeweiligen Fluoreszenzmarkierung durchgeführt. Dabei wurden die Kontrollen in einem Experiment Cy3- und die Proben der Rauch-exponierten Mäuse Cy5-markiert, in einem weiteren Versuch wurde die Markierung in umgekehrter Weise appliziert. Die Microarrays wurden entsprechend des Hersteller-Protokolls durchgeführt (Agilent, Böblingen). **Abbildung 4** zeigt schematisch die Durchführung. Gleiche Expressionslevel der verglichenen Proben resultierten in gelben Spots durch äquivalente Überlappung von Rot (Cy3) und Grün (Cy5). War ein Gen in Relation gesehen höher exprimiert, erschien der entsprechende Spot auf dem Array Rot bzw. Grün. Es wurden jeweils Kontroll-Mäuse selben Alters verwendet. Verglichen wurde jeweils die Genexpression von Kontrolle zu Rauch-exponiert und die 3 und 8 Monate Rauch-exponierten Mäuse untereinander.

Die Auswertung der Microarrays erfolgte freundlicherweise durch Dr. Jochen Wilhelm. Dabei wurde für die Auswertung aller Gene eine Liste von Kandidaten bis zu einer *false-discovery rate* von 10% (FDR 0,1) erstellt. Die p-Werte wurden nach k*SUMME(-ln(k)^i/i!) mit k=PRODUKT(p[i]) in Anlehnung an das Verfahren von R. A. Fisher berechnet[337]. In dieser Arbeit wird lediglich auf die NADPH-Oxidasen, deren zytosolischen Untereinheiten und NO-Synthasen eingegangen, wobei auch Gene dieser Gruppen dargestellt werden, die den genannten Kriterien (vgl. FDR) nicht entsprachen.

Darüber hinaus wurden Pathway-Analysen durchgeführt. Als Quelle für die den Pathways zugeordneten Gene diente die Pathway-Datenbank "KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*" (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html; [338;339]). Es wurden zwei unterschiedliche Analyse-Methoden verwendet: 1) Pathway-Express[340;341] unter Verwendung der *Over Representation Analysis* und „Fisher's Exakter Test“ (http://de.wikipedia.org/wiki/ Exakter_Test_nach_Fisher), wobei neben der Regulation einzelner Gene auch die (bisher bekannte) biologische Bedeutung eines Gens im Pathway gewichtet wird und 2) GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*), wobei keinerlei Vorauswahl von Genen stattfindet und die Verteilung der Teststatistiken einer Gruppe von Genen in der Verteilung aller Gene betrachtet wird. Die

Verteilung aller Gene entspricht dabei etwa einer t-Verteilung, also ähnlich einer Normalverteilung. Zur Berechnung wurde die Funktion "geneSetTest" aus dem "limma"-Paket (http://bioinf.wehi.edu.au/limma/) genutzt[342;343].

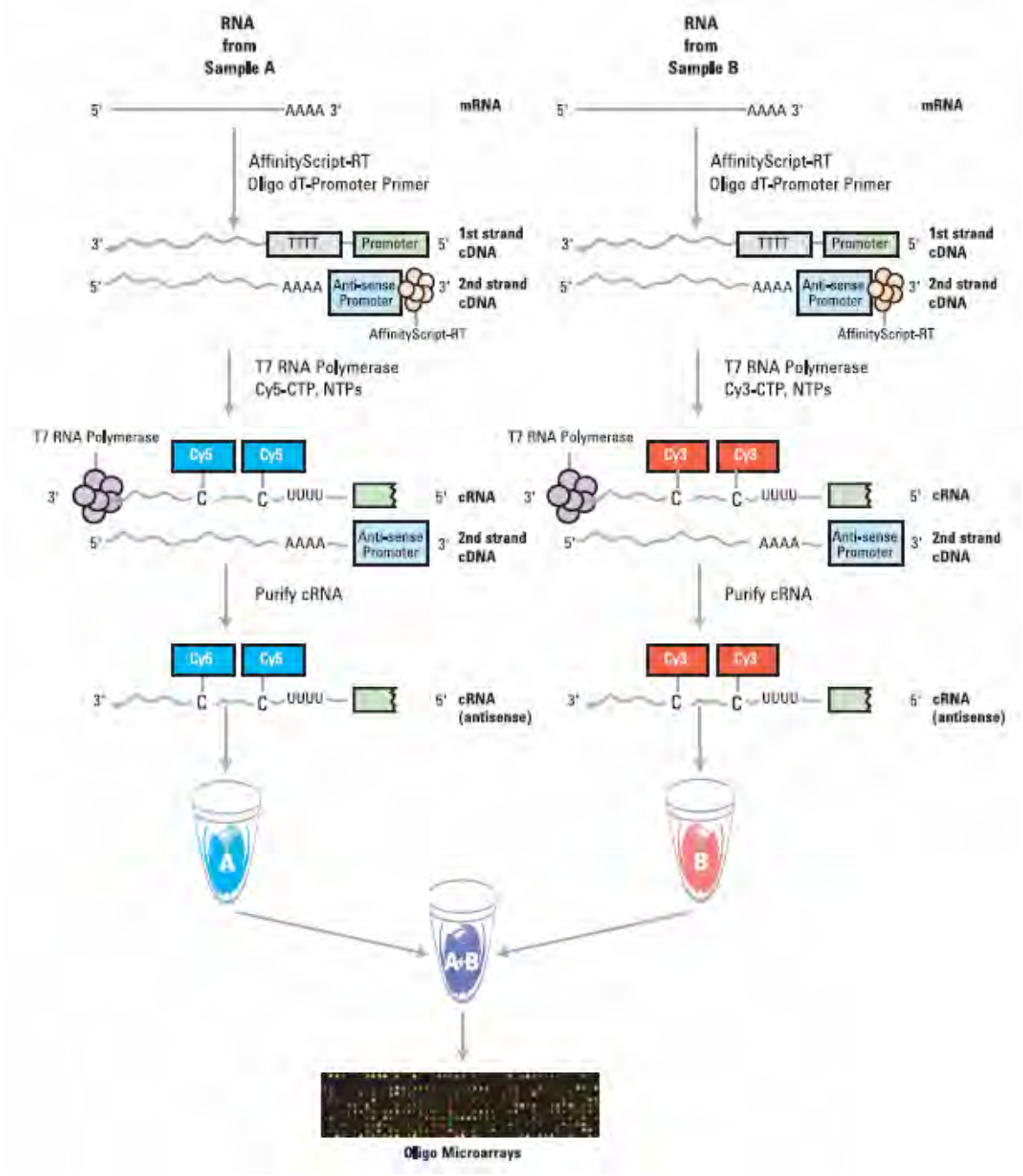


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Microarray-Experiments. Aus RNA von Kontroll- und Rauch-exponierten Tieren wird zunächst cDNA hergestellt. Diese wird in cRNA umgeschrieben und mit einem der beiden Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Dann erfolgt die Hybridisierung auf dem RNA-Array-Chip. Quelle: http://www.agilent.com.

2.2.10.6 Nicht-isotopische *in situ* Hybridisierung (NISH) kombiniert mit Immunfluoreszenz auf Maus-Lungenschnitten

Diese Methode wurde zur Lokalisation von mRNA-Expressionen in der Lunge auf Kryo-Schnitten durchgeführt. Dazu wurden einzelsträngige Digoxigenin (DIG)-markierte Ribosonden durch *in vitro* Transkription hergestellt. Zur Generierung der Sonden wurden ausgesuchte Genabschnitte aus cDNA von Lungenhomogenat durch *nested* PCR amplifiziert, wobei folgende Primer verwendet wurden:

Tabelle 3: Primer zur Herstellung von Sonden für *in situ* Hybridisierung

Gen	Primername	Primersequenz	Produktgröße
iNOS	NISH_iNOS_F	5´-GCCCCTGGAAGTTTCTCTTC-3´	992 bp
	NISH_iNOS_R	5´-ACCACTCGTACTTGGGATGC-3´	
	NISH_iNOS_T3(F)	5´-AATTAACCCTCACTAAAGGTTCCAGAATCCCTGGACAAG-3´	515 bp
	NISH_iNOS_T7(R)	5´-TAATACGACTCACTATAGGTGCTGAAACATTTCCTGTGC-3´	
eNOS	NISH_eNOS_F	5´-AAGTGGGCAGCATCACCTAC-3´	939 bp
	NISH_eNOS_R	5´-GTCCAGATCCATGCACACAG-3´	
	NISH_eNOS_T3(F)	5´-AATTAACCCTCACTAAAGGCTTCAGGAAGTGGAGGCTGA-3´	473 bp
	NISH_eNOS_T7(R)	5´-TAATACGACTCACTATAGGAGTAACAGGGGCAGCACATC-3´	

Nach Vorbereitung und Aufreinigung der *Templates*, die sowohl T3- als auch T7-RNA-Polymerase-Promoter-Sequenzen enthielten, wurden die Sonden durch Zugabe von 2 µl Digoxigenin-11-Uridin-triphosphat (Roche, Mannheim), 4 µl 5x Transkriptions-Puffer (Promega, Mannheim), 1 µl RNasin (Peqlab, Erlangen) und 2 µl T3- oder T7-Phage Polymerase (Promega, Mannheim) in einem Gesamtansatz von 20 µl erzeugt. Der Reaktionsmix wurde dann bei 37°C für 2 Stunden inkubiert und die RNA-Sonden darauf folgend mit einem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Die nicht-isotopische *in situ* Hybridisierung wurde auf 8 µm dünnen Kryo-Schnitten von in TissueTek®-eingebetteten Mauslungen durchgeführt. Die Schnitte wurden für 15 min bei 68°C erhitzt, um endogene Peroxidase-Aktivität zu deaktivieren, gefolgt von einer Inkubation für 30 min bei 70°C in 2x SSC-Puffer, 1 min in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser, 10 min bei RT mit Proteinase K (5 µg/ml), 30 s in 0.2% (w/v) Glycin (gelöst in 1x PBS) (zur Inaktivierung der Proteinase K), 30 s in 1x PBS, 20 min in frisch angesetztem, gekühltem 4%

(w/v) Paraformaldehyd, 5 min in 1x PBS, 10 min in 0,1 M acetyliertes Triethanolamin (0,5 ml Säure-Anhydrid/200 ml Triethanolamin) auf einem Schüttler, 3 min in PBS und schließlich wurden die Slides durch eine ansteigende Ethanolreihe (70% (v/v), 80% (v/v) und 90% (v/v), je 2 min) dehydriert. Danach wurden die Schnitte mit Hilfe von 2x Prähybridisierungs-Lösung (1 M NaCl, 0,02 M Tris (pH 7,5), 2x Denhardt's-Lösung, 2 mM EDTA, 10 mg/ml Heringssperma, 0,2 mg/ml Hefe-tRNA) für 2-3 Stunden bei 55°C in einer humiden Kammer prähybridisiert, gefolgt von der eigentlichen Hybridisierung mit der denaturierten *Antisense* iNOS- bzw. eNOS-Sonde in Hybridisierungs-Puffer (1 M NaCl, 0,02 M Tris (pH 7,5), 2x Denhardt's-Lösung, 2 mM EDTA, 2 g Dextran-Sulfat, 0,2 mg/ml Hefe-tRNA) bei 55°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte unter folgenden Bedingungen gewaschen: jeweils auf einem Schüttler 2x SSC für 1 h bei RT, 0,1x SSC bei 60°C und schließlich in vorgewärmten 0,1x SSC auf 60°C für 1h bei RT. Daraufhin wurden die Schnitte mit Blocking-Puffer (2% Blocking reagent (Roche, Mannheim), 0,1% (w/v) BSA, 0,1 M Tris (pH 7.5), 5 M NaCl) für 30 min bei RT behandelt, gefolgt von einer Inkubation mit einen 1:40-verdünnten Peroxidase-gelabelten α-DIG-Antikörper (Roche, Mannheim) für 2 Stunden bei RT. Danach wurden die Schnitte in TBT-Puffer (50 mM, 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl and 0,1% Triton X-100) 3x für 15 min gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem 1:60-verdünnten (mit Amplifikations-Puffer) Fluoreszenz-Substrat Alexa Fluor 488-Tyramid (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) für 2 h bei RT. Nachdem die Schnitte für 3x 20 min in PBT-Puffer (PBS + 0,1% (v/v) Tween 20) gewaschen wurden, wurde ein 1:500-verdünnter (mit PBS) monoklonaler Cy3-gelabelter α-*smooth muscle actin* Maus-Antikörper (Sigma-Aldrich, Steinheim) für 1 h bei RT appliziert. Schließlich wurden die Schnitte nach 3x 3min Waschen in PBS einer Kernfärbung mit Hoechst-33258 (1:10000 in PBS; Invitrogen, Karlsruhe) für 10 min bei RT unterzogen, erneut 3x 3 min gewaschen und mit einem Tropfen DAKO *fluorescent mounting medium* (Dako, Hamburg) konserviert, was das Fluoreszenz-Signal verstärkte und länger haltbar machte. Die Objektträger wurden mit Deckgläschen (24 x 50 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig) abgedeckt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt, bis die Färbungen ausgewertet wurden, was stets innerhalb von 24 Stunden nach Inkubation der Sonde bzw. der Antikörper geschah.

.

2.2.10.7 Immunfluoreszenz zur Lokalisation von Proteinen

Diese Methode wurde verwendet, um Proteine innerhalb der Lunge zu lokalisieren und deren Expression visuell abzuschätzen, wobei Kontrollen zu Rauch-exponierten Tieren verglichen wurden. Fluoreszenzsignale geben Anhaltspunkte über die Expression, werden jedoch nicht als quantitativ erachtet, so dass lediglich Tendenzen zu ermitteln ist.

Kryoschnitte (10 µm) von Tissue Tek®-eingebetteten Lungen wurden mit einem 1:1-Gemisch aus Aceton und Methanol für 10 Minuten fixiert und mit 10 % (w/v) BSA (gelöst in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, gefolgt von 3x Waschen mit PBS + 0,1 % (w/v) BSA und Inkubation mit einem primären Antikörper (verdünnt mit 3 % (w/v) BSA) bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde wieder 3x mit PBS + 0,1 % (w/v) BSA gewaschen und dann mit einem sekundären Alexa Fluor® 555- bzw. 488-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:500, Invitrogen, Karlsruhe) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschschritt (3x) folgte nach Bedarf eine 30-minütige Färbung der glatten Muskelzellen mit einem monoklonalen Cy3-gelabelten α-*smooth muscle actin* Maus-Antikörper (Sigma-Aldrich, Steinheim). Ansonsten erfolgte direkt die Kernfärbung mit Hoechst-33258 (1:10000, Invitrogen, Karlsruhe) für 5-10 min. Schließlich wurden die Schnitte mit einem Tropfen DAKO *fluorescent mounting medium* (Dako, Hamburg) konserviert, was das Fluoreszenz-Signal verstärkte und länger haltbar machte. Die Objektträger wurden mit Deckgläschen (24 x 50 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig) abgedeckt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt, bis die Färbungen ausgewertet wurden. Dies geschah stets innerhalb von 24 Stunden nach Inkubation der Antikörper.

2.2.10.8 Immunhistochemie

Eine weitere Möglichkeit, die Expression eines Proteins in bestimmten Zellen eines Gewebes zu lokalisieren, stellt die Immunhistochemie dar.

Diese Methode wurde zur Detektion von Nitrotyrosin und PCNA verwendet. Die Antikörper wurden 1:250 (rabbit anti-Nitrotyrosin, Sigma, München) bzw. 1:200 (rabbit anti-PCNA, Abcam, Cambridge, UK) in 10% (w/v) BSA verdünnt.

Zunächst wurden am Mikrotom 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die dann auf einen Objektträger überführt und getrocknet wurden. Die Schnitte wurden aus Lungen angefertigt, die vorher in Paraffin eingebettet worden sind. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst bei 60°C für 1 Stunde entparaffiniert. Die anschließende 3x 10min-Inkubation in Xylol diente

ebenfalls der Entfernung des Paraffins. Dann wurden die Schnitte einer absteigenden Ethanolreihe (2x 5 min 100%; 2x 5 min 95%; 2x 5 min 70%) unterzogen und so rehydriert. Nach zwei 5 min-Waschschritten in PBS (150 mM NaCl; 1,7 mM KH_2PO_4; 5,2 mM Na_2HPO_4, pH 7,4), wurden die Schnitte für 20 min bei ca. 100°C in einer Zitratpufferlösung (pH 6,0) erhitzt, gefolgt von einer 20-minütigen Behandlung mit einem 15%igen H_2O_2-Methanol-Gemisch (für PCNA) oder mit Trypsin (für Nitrotyrosin) 15 min bei 37°C behandelt. Dadurch wurde das jeweilige Antigen demaskiert und die basale Peroxidase-Aktivität (für PCNA) herabgesetzt, um Hintergrund zu reduzieren. Nach Waschen mit PBS wurde für 1 Stunde mit 10% BSA geblockt und wieder gewaschen. Danach wurde unter Verwendung von Immpress® Reagent Anti-Rabbit Ig- und Substratkits (Vector/Linaris, Wertheim) die gebundenden Antikörper detektiert und visualisiert. Zwischendurch wurde der jeweilige primäre Antikörper über Nacht bei 4°C appliziert. Für Nitrotyrosin wurde VIP- (violett) und für PCNA NovaRED-Substrat (rotbraun) verwendet. Gegenfärbungen erfolgten durch Methylgrün bzw. Hämatoxylin.

2.2.10.9 Untersuchung der Proteinexpression

2.2.10.9.1 Proteinextraktion aus Gewebe

Für die Extraktion von Proteinen aus Lungengewebe wurden ca. 150 mg Gewebe in 500 µl kaltem RIPA-Lysepuffer (50 mM Tris, 10 mM $CaCl_2$, 150 mM NaCl, 60 mM NaN_3, 1% Triton X-100, 15% Protease-Inhibitor, 1 mM PMSF, 1 mM Na-Orthovanadat) mit einem Homogenisator (Precellys 24, Peqlab, Erlangen) homogenisiert. Im Anschluss wurden die Gewebereste für 10 min bei 10000 rpm, 4°C pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen. Danach wurde die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt (2.2.10.9.3) und die Proteinlösung bei -20°C gelagert.

2.2.10.9.2 Proteinextraktion aus Zellen

Vor Beginn der Isolation wurden Zellen (meist auf 6-well Platten oder 10 cm-Zellkulturschalen) zunächst einmal mit 2 ml bzw. 8 ml DPBS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 300 µl RIPA-Lysepuffer (50mM Tris; 150mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Na-Deoxycholat; 0,1% SDS; 0,004% Na-Azid; 2% Protease-Inhibitor; 2 mM PMSF; 1 mM

Na-Orthovanadat) lysiert. Danach wurden sie mit einem Zellschaber von der Schale entfernt und in ein neues Eppendorftube überführt. Nach Vortexen erfolgte die Proteinbestimmung und Lagerung bei -20°C bis zur Benutzung.

2.2.10.9.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der DC Protein Assay von Bio-Rad verwendet, der auf dem Prinzip des Lowry-Assays basiert.

Vor der Messung der Konzentration wurden die Proteinproben 1:5 in H_2O vorverdünnt. Als Standard wurde eine BSA-Lösung (2 mg/ml) von Bio-Rad verwendet. Aus dieser wurde eine Standardreihe von 0,2 mg/ml bis 1,6 mg/ml hergestellt. Für den Leerwert wurde der Lyse-Puffer im gleichen Verhältnis wie die Proteinproben in Wasser verdünnt. Dann wurde der Assay in eine 96-well Mikroplatte pipettiert. Zunächst wurden jeweils 5 µl des Leerwerts, der Standardreihe und der verdünnten Proteinproben im Duplikat in die *Wells* pipettiert. Anschließend wurden 25 µl von Reagenz A´ (vorher wurde 1 ml Reagenz A mit 20 µl Reagenz S gemischt) und danach 200 µl von Reagenz B in jedes Well gegeben. Dann wurde die 96-well Platte in das ELISA-Messgerät gestellt und zunächst für 15 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei 750 nm im ELISA-Messgerät. Eine Berechnung der Standardkurve und der Proteinkonzentrationen erfolgte Standard-Software.

2.2.10.9.4 SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli werden vor dem eigentlichen Western Blot denaturierte Proteine in einem denaturierenden Gel der Größe nach aufgetrennt. Dabei wurden zur späteren Detektion via Western Blot je nach untersuchtem Protein 20-100 µg Protein je Probe geladen. Zur Herstellung eines Gels wurde je 2 ml Sammelgel (5%ig) und 10 ml Trenngel benötigt. Je nach Proteingröße wurden unterschiedlich prozentige Gele verwendet. So wurden für iNOS und eNOS 8%ige, für NOXA1 und NOXO1 12%ige und für Proteine des MAPK-Signalwegs 14%ige Gele benutzt.

Die Sammel- und Trenngele setzten sich pro 10 ml wie folgt zusammen:

Gel-Konzentration	**5%**	**8%**	**12%**	**14%**
Aqua dest.	5,7 ml	4,7 ml	3,4 ml	2,7 ml
30% Acrylamid/Bis	1,7 ml	2,7 ml	4,0 ml	4,7 ml
Tris-Puffer*	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% w/v SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Temed	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

* Trispuffer:
Trenngel: 1,5 M Tris pH 8,8
Sammelgel: 0,5 M Tris pH 6,8

Die Proteine wurden zunächst an eine einheitliche Proteinkonzentration angeglichen und im Anschluss mit einem 4fach konzentrierten NuPage LDS-Ladepuffer (Invitrogen, Karlsruhe) und 2,6 µl β-Mercaptoethanol pro 100 µl Probenvolumen versetzt. Anschließend wurden die Proteine für 10 min bei 99°C im Thermoblock (VWR, Bruchsal) erhitzt. Nach einer kurzen Zentrifugation, bei der kondensierte Probenbestandteile wieder in Lösung gebracht wurden, wurden die Proben durch Elektrophorese bei 100 V, 400 mA, 150W für 90 min in Laufpuffer (Lämmli-Puffer; 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS) aufgetrennt. Zusätzlich zu den Proben wurde zuvor 4 µl eines Proteinstandards (Bio-Rad, München) aufgetragen.

2.2.10.9.5 Western Blot

Der Western Blot oder Immunoblot ist eine Methode zur spezifischen Detektion von Proteinen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Dafür wurde ein Semidry-Blot der Firma Keutz verwendet. Dabei handelt es sich um ein Blot-System, bei dem der Proteintransfer vertikal vom Gel auf eine PVDF-Membran (Pall Corporation, Dreieich) stattfindet. Vor dem Zusammenbau des Blots wurden eine PVDF-Membran (8,5*5,5 cm) und 6 Filterpapiere (8,5*5,5 cm) vorgeschnitten. Die Membran wurde für 1 s in Methanol zur Aktivierung eingetaucht und die Filterpapiere in Transferpuffer bis zur Benutzung eingelegt. Dann wurde der Blot in der Reihenfolge 3x Filterpapier – Membran – Gel – 3x Filterpapier zusammen gebaut. Die Anschlüsse für den Stromfluss wurden so angelegt, dass

eine Bewegung der Proteine (durch SDS negativ geladen) von minus nach plus, also von oben (Gel) nach unten (Membran) erfolgte. Der Transfer dauerte 75 min bei 100 V, 115 mA und 150 W. Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran in 6% (w/v) Milchpuffer (Skim Milk, Sigma-Aldrich, gelöst in TBST) für eine Stunde geblockt, wobei unspezifische Bindungen abgesättigt wurden. Die Inkubation im Primärantikörper, der in 6% (w/v) Milchpuffer verdünnt wurde, erfolgte bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst 3x 10 min in TBST (20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20) gewaschen und dann für 1h in Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (in 6% (w/v) Milchpuffer) inkubiert. Danach wurde die Membran wiederum für 3-5x für 10 min in TBST gewaschen und dann kurz mit *Aqua dest* abgespült. Zur Entwicklung des Western Blots wurde das Peroxidase-Substrat ECL Plus (1 ml Lösung A + 25 µl Lösung B pro Membran) von GE Healthcare (München) verwendet, in welchem die Membran 5 min inkubiert wurde. Danach wurden mehrere Chemilumineszenz-Filme (Cronex 5 Medical X-Ray Film, Agfa, Mortsel, Belgien) für 1-10 min auf der Membran exponiert und danach mit der Entwicklermaschine (Curix, Agfa, Mortsel, Belgien) entwickelt. Zur Auswertung wurde der Film mit dem Bio-Imaging System fotografiert und die Banden mit der Gene-Tools-Software quantifiziert.

Wenn die Membran ein zweites Mal mit einem anderen Antikörper, z.B. β-Aktin, inkubiert werden sollte, wurde diese gestrippt. Das heißt, die gebundenen Antikörper wurden 1 h Inkubation in Stripping-Puffer (90 ml *Aqua dest.*, 10 ml 1 M Glycin, 1-2 ml HCl 37%) entfernt („gestrippt“). Danach wurde die Membran 3x 10min in TBST gewaschen und danach wieder für 1h in 6% Milchpuffer geblockt. Danach wurde sie, wie schon beschrieben, mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert und entwickelt.

2.2.10.10 Zellkultur-Experimente

2.2.10.10.1 CMT64/61-Zellen

Dabei handelte es sich um Lungenkarzinom-Epithelzellen von der *European Collection of Cell Cultures* (ECACC; Nr. 86082105), isoliert aus C57BL/1CRF-Mäusen.

Die Zellen wurden in Waymouth´s Medium MB 752/1 (Promocell, Heidelberg) mit 2 mM Glutamin, 10% Hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C mit 5% CO_2 in Zellkulturflaschen (75 cm^2 Kulturfläche) kultiviert. Zum Passagieren

wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 8 ml DPBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA für 1 min bei 37°C inkubiert bis sie sich von der Oberfläche abgelöst haben. Dann wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 8 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen zur Zellerhaltung im Verhältnis 1:10 in neue Zellkulturflaschen verteilt und 48-72 h inkubiert.

2.2.11.10.2 Isolierung und Kultivierung von präkapillären, vaskulären glatten Muskelzellen

Um die Genexpression von NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen zu untersuchen und um die Proteinexpression von NOXA1 und NOXO1 in diesen Zellen zu lokalisieren und Unterschiede in der Expression nach Rauchexposition zu untersuchen, wurden glatte Muskelzellen (SMCs) aus Kontroll- und 2 Wochen Rauch-exponierten Mäusen isoliert und kultiviert.

Dazu wurden die Mäuse durch intraperitoneale (*i.p.*) Injektion von 150 µl eines Gemisches aus Narkoren (Pentobarbital-Natrium, Merial GmbH, Hallbergmoos) und NaCl (Natriumchlorid, Braun, Melsungen) im Verhältnis 1:10 narkotisiert. Die intravenöse Applikation von Heparin (150 µl, 1:10 mit NaCl verdünnt; Roche, Basel, Schweiz) in die Penisvene diente der Antikoagulation. Zur weiteren Präparation wurde die narkotisierte Maus in Rückenlage fixiert und das Fell in Hals-, Thorax- und Bauchregion entfernt. Nach Freipräparation der Trachea wurde diese durch Querinzision geöffnet und eine Trachealkanüle eingebunden, die später zur Instillierung einer Agarose-Lösung benötigt wurde. Danach wurde die Bauchdecke angehoben und parallel zu den unteren Rippenbögen aufgeschnitten. Durch stumpfes (mit einer Pinzette) Abpräparieren des Diaphragmas wurde die Lunge zum kollabieren gebracht und der Thorax konnte geöffnet werden. Die vollständige Eröffnung des Thorax erfolgte durch einen medianen Schnitt entlang des gesamten Sternums. Mit Hilfe von zwei Klemmen wurden die beiden durch den Schnitt entstandenen Rippenenden fixiert und der Thorax gespreizt. Nach Entfernung des Thymus und Eröffnung des Perikards (Herzbeutel), wurden die Pulmonalarterie (*Arteria pulmonalis*) und die Aorta (*Aorta ascendens*) gemeinsam mit einem Faden (Coats GmbH, Kenzingen) locker umschlungen. Ein Schnitt in den rechten Ventrikel des Herzens ermöglichte das Einführen einer Kanüle in die Pulmonalarterie, die über einen kurzen Schlauch (Braun, Melsungen) mit einer leichtgängigen Spritze (Becton Dickinson, Heidelberg) verbunden war. Da diese Einheit von der Spritze bis zur Kanülenspitze luftblasenfrei mit DPBS-Puffer (*Dulbecco´s phosphate buffered saline*, PAN Biotech, Aidenbach) gefüllt war, bestand nach Einbinden der

Einheit mit Hilfe der Fadenschlinge luftblasenfreies System. Nach Eröffnen des linken Ventrikels wurde die pulmonal-vaskuläre Strombahn über die Pulmonalarterie langsam mit 15 ml DPBS gespült, um das Blut aus den Lungengefäßen zu entfernen. Die Lunge färbte sich dabei weiß. Beim nun folgenden Wechseln der Spritze gewährleistete das Abklemmen des Schlauches den Erhalt eines luftblasenfreien Systems. Nach Austausch der Spritze folgte die langsame Perfusion von ca. 40°C warmem Medium 199 1x + *Earle´s* + L-Glutamin (24 ml/kg; GIBCO Invitrogen, Karlsruhe), das 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin; PAN Biotech, Aidenbach), 0,5% Agarose (Type VII, Sigma-Aldrich, Steinheim) mit niedrigem Schmelzpunkt und 0,5% Eisenpartikel (Eisen-II, III-oxid, 98% Fe_3O_4, Sigma-Aldrich, Steinheim) enthielt und zuvor zum Lösen der Agarose für 20 Minuten bei ca. 70°C im Wasserbad erwärmt worden war. Die Eisenpartikel sammelten sich, aufgrund ihrer definierten Größe, besonders in den mikrovaskulären präkapillären Gefäßen der Lunge, da diese nicht durch die Kapillaren passten. Diese Eisenpartikel mit definierter Größe dienten dazu, Mikroproben von bestimmten Gefäßbereichen der Pulmonalarterie entnehmen zu können, aus denen dann später die PASMC kultiviert werden sollten. Aufgrund der magnetischen Eigenschaften des Eisens konnten diese Partikel später mit einem Magnet aus dem Lungenhomogenat aufgereinigt werden. Um das Lungengewebe anschließend besser zerkleinern zu können, wurden die Luftwege, nach Injektion der Eisenpartikel über die Trachealkanüle mit ca. 40°C warmem Medium 199 langsam befüllt und die Lunge so gebläht. Dieses Medium enthielt 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt und wurde ebenfalls zuvor zum Lösen der Agarose für ca. 20 Minuten bei ca. 70°C im Wasserbad erwärmt. Für die Entnahme des Herz-Lungen-Komplexes wurde die Trachea oberhalb der Trachealkanüle durchtrennt, die Lunge entlang der Wirbelsäule freipräpariert und schließlich der Ösophagus, die Aorta und die Hohlvene durchtrennt. Zur Abkühlung und der damit verbundenen Fixierung der Agarose in den Luftwegen bzw. der Agarose mit den Eisenpartikeln in den Gefäßen wurde der Herz-Lungen-Komplex in eiskalten DPBS-Puffer transferiert. Nach 15-20 Minuten erfolgten die Abpräparation der Lungenlappen vom Herz-Lungen-Komplex und eine mechanische Zerkleinerung derselben. Nach Überführung des zerkleinerten Lungengewebes in sterile Plastikröhrchen (*Blue Caps*, Greiner *Bio-one*, Frickenhausen) mit 30-35 ml DPBS wurden die Plastikröhrchen in einem Magnetkonzentrierer (Dynal A.S, Oslo, Norwegen) fixiert, das eine Ansammlung der auf Grund der Eisenpartikel magnetischen Gewebestückchen an den Rand des Plastikröhrchens bewirkte. So wurde ein Absaugen des Überstandes mit Gewebestückchen, die keine Eisenpartikel enthielten, ermöglicht.

Nach Entnahme des Röhrchens aus dem Magnetkonzentrierer wurde dieses wieder mit 30-35 ml DPBS-Puffer aufgefüllt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Daraufhin wurden die Eisenpartikel zum Ablösen des die Gefäße umgebenden Gewebes und der Fibroblasten mit 10 ml Kollagenase Typ IV (80 U/ml; Sigma-Aldrich, Steinheim) im Inkubator (Flow Laboratories, Meckenheim) bei 37°C und 5% Kohlendioxid über einen Zeitraum von 55 Minuten angedaut. Durch diese Behandlung des Gewebes wurden Proteine abgebaut, die den Zellverband aufrechterhalten. Dadurch konnten die Zellen vereinzelt werden, was eine spätere Aussaat der Zellen ermöglichte. Die Kollagenase war zuvor in Medium 199 und 1% Penicillin/Streptomycin gelöst worden. Der Kollagenase-Verdau führte außerdem dazu, dass z.B. enthaltene Pilze und Bakterien abgetötet wurden, wodurch die Suspension steril wurde. Das angedaute Lungengewebe wurde mit Hilfe einer Spritze mehrfach zunächst durch eine 15G-Kanüle (Dispomed Witt, Gelnhausen) und dann durch eine 18G-Kanüle (HMD Healthcare LTD., Horsham, UK) gezogen, um die angedauten Gewebestückchen von den Eisenpartikeln zu entfernen. Dann wurden die Eisenpartikel in ein Plastikröhrchen mit Zellkulturmedium, das aus Medium 199 mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS (Fetales Kälberserum, PAA Laboratories, Cölbe) bestand, überführt. Die Eisenpartikel wurden nachfolgend mittels des Magnetkonzentrierers aus dem Gemisch aus Gewebestückchen und Eisenpartikeln selektiert und nach dem gleichen Prinzip wie bereits oben beschrieben dreimal mit Zellkulturmedium (M 199) gewaschen. Die isolierten Gefäßstücke wurden in Zellkulturmedium (Medium 199 mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS) aufgenommen und zur Kultivierung in Zellkulturflaschen T25 (Corning, Wiesbaden) oder T75 (Greiner *Bio-One*, Frickenhausen) ausgesät, bis daraus SMCs hervorgegangen sind. Nachdem genügend Zellen gewachsen waren, wurde diese dann, je nach Verwendungszweck, auf 6-wells (Greiner bio-one, Frickenhausen) für spätere RNA-/Protein-Isolatio bzw. 8 Well-Permanox-Objektträgern (*8 well permanox chamber slides;* Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) für Immunfluoreszenz-Experimente transferiert und bis zum jeweiligen Versuch in Medium 199 mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

2.2.10.10.3 Transfektionen von CMTs mit Plasmiden

Um adäquate Positivkontrollen für die Detektion von NOXA1- bzw. NOXO1 via Western Blot zu erhalten, wurden CMT-Zellen mit Hilfe von Lipofektamin (LF) (Lipofectamine 2000,

Invitrogen, Karlsruhe) und den unter 2.1.8 beschriebenen Plasmiden transfiziert und 48 h nach Transfektion die überexprimierten Proteine isoliert.

Lipofektamin ist durch lipophile Eigenschaften in der Lage, die Zellmembranen zu durchdringen. Durch Komplexbildung mit den jeweiligen Plasmiden ermöglichte es die Einschleusung dieser zellfremden DNAs in die Zellen. Die Assays bezüglich ROS und Proliferation führten bei diesen Zellen leider zu keinem zufrieden stellenden Ergebnis. Jedoch wurden die überexprimierten NOXA1- bzw. NOXO1-Proteine aus den transfizierten Zellen isoliert und als Positivkontrollen in Western Blots eingesetzt.

Dazu wurden 1-3 x 10^5-Zellen am Vortag auf 6well-Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen) ausgesät, wobei Medium ohne Antibiotika verwendet wurde, da diese toxisch für die Zellen bei der Transfektion sein könnten. Am Tag der Transfektion waren die Zellen 70-80% konfluent. Pro well wurden 100 µl Opti-MEM® I-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) benötigt, das mit 2-3 µg des jeweiligen Plasmids und 2,5 µl Lipofektamin/µg Plasmid, inkubiert wurde, bevor der Mix zu den Zellen gegeben wurde. Dazu wurden 100 µl Opti-MEM® I-Medium für 5 min bei RT mit 5-7,5 µl LF inkubiert. Dann folgten die Zugabe von je 2-3 µg Plasmid und eine Inkubation für 20 min bei RT, wobei sich der Lipofektamin/Plasmid-Komplex bildete. Das Gemisch wurde dann tropfenweise zu den Zellen gegeben, die sich in 1 ml Kulturmedium befanden. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C mit 5% CO_2 inkubiert. Nach 4-6 Stunden wurde das Medium mit dem Transfektionsreagenz entfernt, mit 2 ml DPBS gewaschen und 2 ml Waymouth´s Kulturmedium (Promocell, Heidelberg) mit 10% FCS und Antibiotika zugegeben und die Zellen bis zur Verwendung weiter kultiviert.

2.2.11 Patienten-Merkmale

Human-Material stammte von transplantierten Lungen von Donoren (Kontrollen) und COPD-Patienten (GOLD-IV). Die Studien wurden genehmigt durch die Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität (AZ 31/93). Das Human-Gewebe wurde nach der Transplantation direkt in flüssigem Stickstoff für nachfolgende mRNA- und Proteinextraktionen gefroren oder in 4,5% Paraformaldehyd oder Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Staufen) für histologische Untersuchungen bzw. Mikrodissektion fixiert.

Tabelle 4: Patienten-Merkmale

Patient	FEV1/FVC	Diagnose	Alter (Jahre)	Geschlecht	Packjahre	Behandlung
1 COPD	49,3%	COPD (GOLD-IV)	53	m	39	IB / T/ SC
2 COPD	45,0%	COPD (GOLD-IV)	48	m	31	IB / ICS
3 COPD	30,6%	COPD (GOLD-IV)	58	m	88	IB / ICS / T
4 COPD	39,7%	COPD (GOLD-IV)	58	m	70	IB / SC /T
5 COPD	62,9%	COPD (GOLD-IV)	59	m	5	IB/ ICS
6 COPD	29,4%	COPD (GOLD-IV)	56	m	80	IB/ ICS
1 Donor		Normal	24	m		
2 Donor		Normal	52	w		
3 Donor		Normal	61	w		
4 Donor		Normal	26	m		
5 Donor		Normal	29	m		
6 Donor		Normal	60	m		

2.2.12 Statistische Analyse

Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Bei Vergleich von zwei Gruppen wurde der *Student's* t-Test, bei Vergleich mehrerer Gruppen untereinander eine Varianzanalyse (ANOVA) und der Student–Newman–Keuls *post-hoc* Test angewandt. Ein p-Wert <0,05 wurde dabei als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen während der Entwicklung der COPD in Wildtyp-Mäusen

Gemäß der These, dass NADPH-Oxidasen, deren zytosolische Untereinheiten und NO-Synthasen in der Entwicklung der Zigarettenrauch-induzierten COPD eine Rolle spielen, wurde zuerst die Expression dieser Gene im Lungenhomogenat von Rauch-exponierten Mäusen untersucht. Dabei wurden die Lungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung der Erkrankung isoliert: nach zwei Wochen, drei und acht Monaten Rauchexposition. Aus **Abbildung 5a** ist zu erkennen, dass nach zwei Wochen Rauchexposition die zytosolischen Untereinheiten $p47^{phox}$, NOXA1 und NOXO1, die membrangebundenen Untereinheiten $p22^{phox}$ und NOX1 heraufreguliert, während dessen die membrangebundenen $gp91^{phox}$ und NOX4 und die mRNA für das zytosolische Protein Rac1 und die NO-Synthase eNOS herunterreguliert waren. Die anderen untersuchten Gene waren zu diesem Zeitpunkt nicht reguliert.

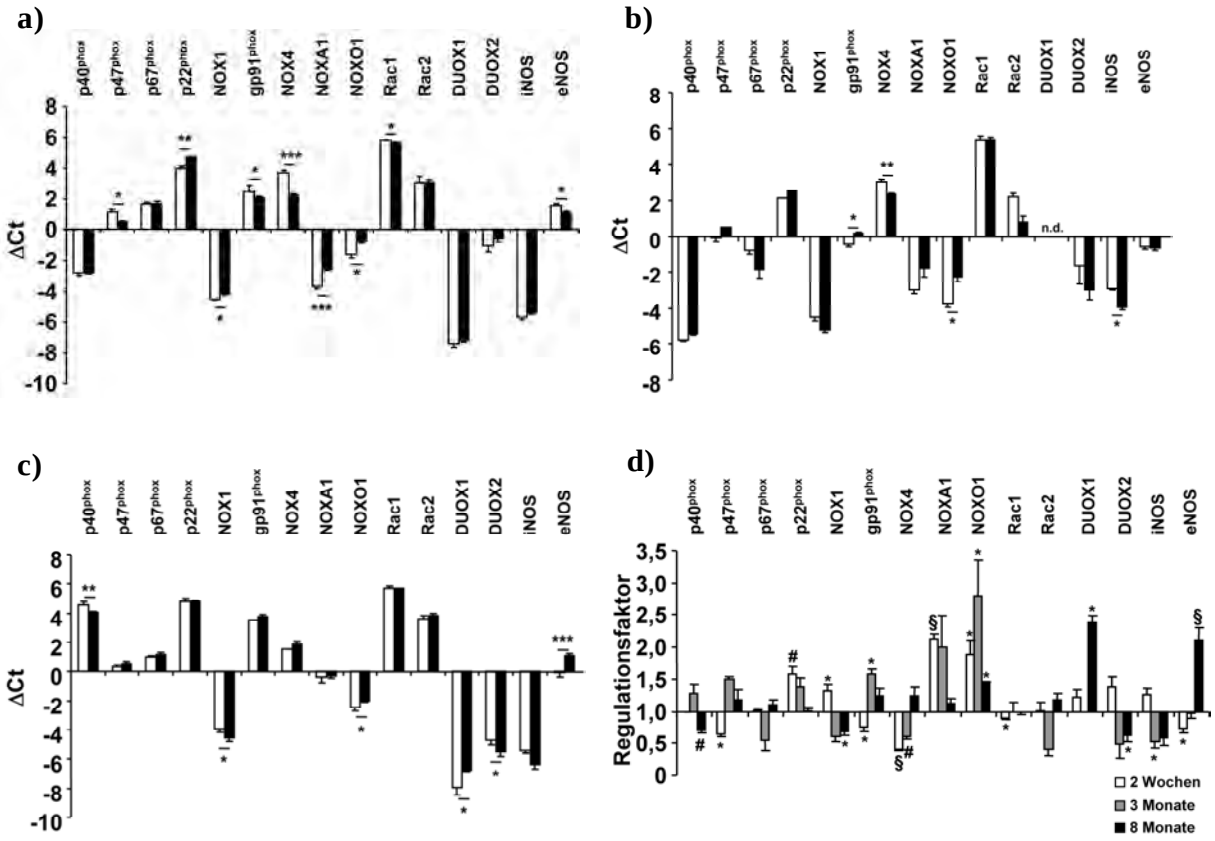


Abbildung 5: NADPH-Oxidasen- und NO-Synthasen-Expression im Verlauf der COPD-Entwicklung.

Genexpressionen aus Maus-Lungenhomogenat nach a) 2 Wochen, b) 3 Monaten, c) 8 Monaten Rauchexposition. d) spiegelt ein Gesamtdiagramm aller Zeitpunkte mit Regulationsfaktor wider. Expressionen normalisiert zu PBGD, Balken: weiß (Kontrolle), schwarz (Rauch-exponiert), n=5, signifikant zur Kontrolle, wenn * ($p<0,05$), ** und # ($p<0,01$), *** und § ($p<0,001$).

Abbildung 5b reflektiert die Genexpression nach drei Monaten Rauchexposition und zeigt wiederum, dass NOX4 herunter- und NOXO1 heraufreguliert waren. Jedoch war die Expression von $gp91^{phox}$ dieses Mal aktiviert worden und die iNOS-Expression signifikant unterdrückt. Die übrigen Gene wiesen keine Regulationen auf. Nach 8 Monaten Rauchexposition (**Abb. 5c**), an dem nachweislich Emphysem entstanden war (siehe Morphometrie), konnte beobachtet werden, dass NOXO1 weiterhin heraufreguliert war, was ebenfalls für DUOX1 und eNOS zutraf. Die Expression von $p40^{phox}$, NOX1 und iNOS waren zu diesem Zeitpunkt supprimiert. **Abbildung 5d** reflektiert ein Gesamtbild aller Zeitpunkte mit den jeweiligen Regulationsfaktoren.
Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass einige der untersuchten Gene durch die Rauchexposition in ihrer Expression signifikant beeinflusst wurden. Vor allem die Aktivierung von NOX1, NOXA1 und NOXO1 und die Suppression von NOX4 in frühen Zeitpunkten der COPD-Entwicklung (2 Wochen, 3 Monate) waren bemerkenswert. Interessanterweise wurde die $gp91^{phox}$-Expression zu dem Zeitpunkt (2 Wochen), an dem NOX1, $p22^{phox}$, NOXA1 und NOXO1 kollektiv heraufreguliert wurden, inhibiert. Die NO-Synthasen eNOS (2 Wochen) und iNOS (3, 8 Monate) wurden ebenfalls in ihrer Expression in Betrachtung der Gesamtlunge beeinträchtigt. Lediglich nach 8 Monaten zeigte eNOS eine signifikante Erhöhung der Expression. DUOX1, welches prinzipiell relativ schwach im Lungenhomogenat exprimiert zu sein scheint, und das nach 3 Monaten Rauchexposition nicht mehr nachweisbar war, war zum Zeitpunkt 8-monatiger Rauchexposition signifikant erhöht.

3.2 Regulation der NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen bei COPD-Patienten GOLD-IV

Um zu überprüfen, ob die Regulationen im Mausmodell mit der Regulation in humanen COPD-Lungen vergleichbar sind, wurde die Genexpression in Lungenhomogenat von Donor- und COPD-Patienten untersucht. Dabei ist anzumerken, dass die Ergebnisse am besten mit 8 Monate Rauch-exponierten Mäusen zu vergleichen sind, da diese einem *End-Stage*-Patienten (GOLD-IV)

am nächsten kommen, wobei jedoch bekannt ist, dass Mäuse lediglich GOLD II erreichen können.

Abbildung 6 zeigt, dass NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen bei COPD-Patienten zumindest teilweise reguliert sind. Dabei korrelieren die Expressionen von $p40^{phox}$, $p67^{phox}$, NOX1, NOXA1, Rac1 und iNOS mit denen 8 Monate Rauch-exponierter Mäuse. Die signifikanten Herunterregulationen von $p47^{phox}$, $p22^{phox}$, $gp91^{phox}$, NOXO1 und Rac2 bei COPD-Patienten konnten im Mausmodell nicht bestätigt werden. NOXO1 war im Mausmodell sogar deutlich erhöht. Die signifikante Heraufregulation von NOX4 in den humanen Proben ist zumindest tendenziell mit dem Mausmodell vergleichbar. Die erniedrigte eNOS-Expression bei den Mäusen konnte bei den COPD-Patienten im Lungenhomogenat nicht aufgezeigt werden.

Schließlich kann zusammengefasst werden, dass es gewisse Komparität zwischen den Mausdaten, hervorgegangen aus den Untersuchungen der Genexpressionen, mit denen von COPD-Patienten besteht.

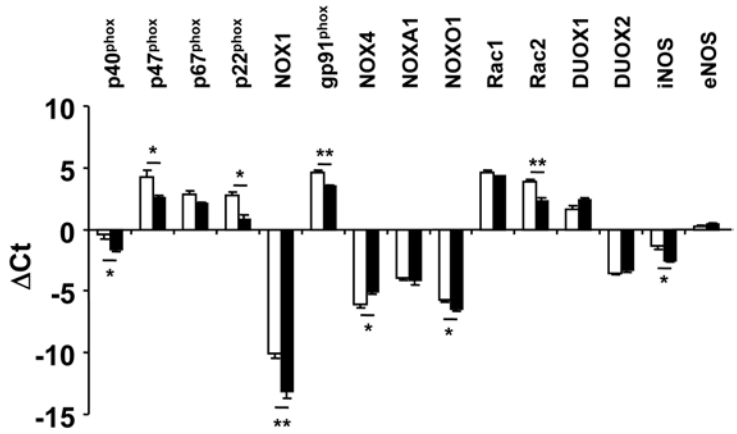


Abbildung 6: NADPH-Oxidasen- und NO-Synthasen-Expression bei ausgeprägter humaner COPD.
Genexpressionen aus humanem Lungenhomogenat von gesunden Donoren und COPD-Patienten (GOLD-IV). Expressionen normalisiert zu PBGD, Balken: weiß (Kontrolle), schwarz (Rauch-exponiert), n=5, signifikant zu Donor, wenn * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$).

3.3 Screening von NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC)

Um einen Eindruck über den Einfluss der Rauchexposition auf die Gefäße zu bekommen, wurden die Expressionen der genannten Gene in vaskulären glatten Muskelzellen untersucht. Dazu wurden Mäuse 2 Wochen lang mit Rauch begast und darauf folgend die Zellen isoliert und bis zur Benutzung kultiviert, wobei die Zellen maximal Passage 1 durchliefen. **Abbildung 7** zeigt,

dass auch in glatten Muskelzellen eine veränderte Expression einiger der untersuchten Gene stattgefunden hat, vor allem $gp91^{phox}$, NOXO1 und Rac2 wurden verstärkt exprimiert. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) zeigte eine herabgesetzte mRNA-Menge. Die anderen Gene waren entweder gar nicht verändert oder zeigten lediglich Tendenzen der Regulation, ohne jedoch signifikante Werte zu erreichen. Bemerkenswert war, dass $p40^{phox}$ nicht nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte NOX1 nicht eindeutig detektiert werden, da die Ct-Werte größer 35 waren und bei den meisten Proben ungewöhnliche Dissoziationskurven entstanden.
Die Untersuchung der VSMCs zeigte, dass diese Zellen auf Rauchexposition mit einer veränderten Expression von NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen reagierten, wobei bestimmte NOX-Untereinheiten vermehrt und eNOS verringert gebildet wurden.

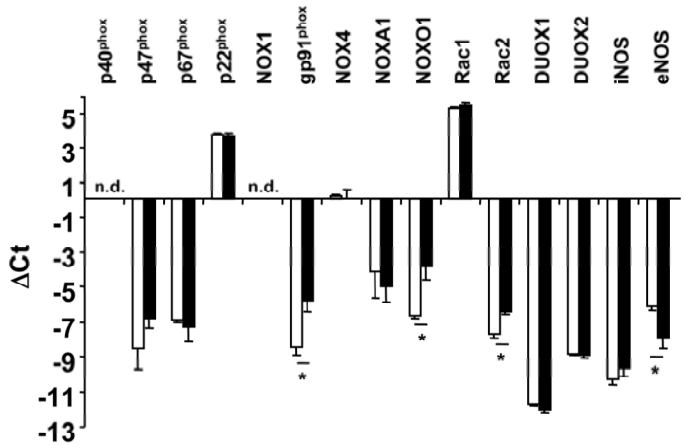


Abbildung 7: NADPH-Oxidasen- und NO-Synthasen-Expression in pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC).
PASMCs wurden aus 2 Wochen Rauch-exponierten Tieren isoliert und Genexpressionsanalysen durchgeführt. Expressionen normalisiert zu PBGD, Balken: weiß (Kontrolle), schwarz (Rauch-exponiert), n=3, * = signifikant zu den Kontrolltieren ($p<0,05$), n.d. = nicht oder nicht eindeutig ($Ct>35$) detektierbar.

3.4 Microarray-Analyse aus RNA von mikrodissektierten alveolären Septen

Genexpressions-Analysen mittels Microarray bieten den Vorteil, dass man die Expression einer Vielzahl von Genen zeitgleich untersuchen kann, wobei unterschiedlichste Gruppen bzw. Konditionen miteinander verglichen werden können. Da Emphysementwicklung einhergeht mit Destruktion alveolärer Septen, wurden in diesem Experiment alveoläre Septen mit Hilfe von Laser-Mikrodissektion von Kontrollen und Rauch-exponierten Mäusen (3 und 8 Monate) aus Lungenquerschnitten dissektiert und, wie unter **2.2.10.4** beschrieben, untersucht.

3.4.1 Expression der NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen

Aus den Analysen der Zeitpunkte 3 und 8 Monate Rauchexposition geht hervor, dass lediglich NOXO1 zu beiden Zeitpunkten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht war. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass es nach 8-monatiger Rauchexposition zu einer signifikanten Erhöhung von DUOX2 kam. Diese Ergebnisse konnten durch Real-Time PCR bestätigt werden.

Ergänzend lässt sich konstatieren, dass mathematisch nicht signifikante Regulationen einzelner assoziierter Gene, wie etwa NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen, durchaus synergistische, ausschlaggebende Effekte auf biologische Prozesse erreichen können. So ist aus **Abbildung 8** ebenfalls zu erkennen, dass gp91^{phox}, NOX1 und p22^{phox} zusammen mit ihren zytosolischen Untereinheiten nach 3 Monaten Rauch Hochregulationen zeigten, wohingegen NOX4 und iNOS/eNOS tendenziell geringere Expressionen zeigten. Weiterhin konnte nach 8 Monaten Rauch beobachtet werden, dass die membrangebundenen NADPH-Oxidasen gp91^{phox}, p22^{phox} und NOX1 und die zytosolischen Untereinheiten p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} und NOXO1 erneut vermehrte Expression aufwiesen, wohingegen NOX4, NOXA1, Rac1 und eNOS reduziert waren. Die iNOS-Expression war dieses Mal erhöht. DUOX1 und DUOX2, die nach 3 Monaten Rauch tendenziell weniger exprimiert waren, waren nach 8 Monaten deutlich in ihrer mRNA-Menge erhöht.

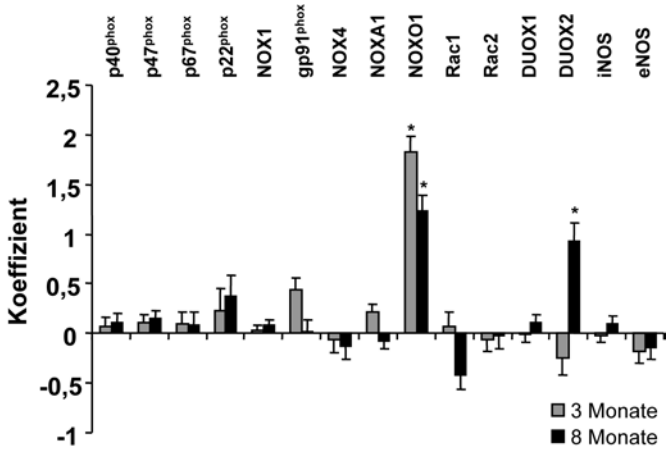


Abbildung 8: Hochregulation von NOXO1 mRNA-Expression in mikrodissektierten alveolären Septen.
Microarray-Analyse mikrodissektierter Septen zur Untersuchung der NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen nach 3- und 8-monatiger Rauchexposition. NOXO1 war zu beiden Zeitpunkten und DUOX2 nach 8 Monaten hochreguliert. Regulationen ermittelt durch Vergleich mit Kontrolltieren selben Alters, n=12, * = signifikant zu den Kontrolltieren ($p<0,05$), Koeffizient entspricht in etwa $2^{\Delta\Delta Ct}$.

3.5 Alveoläre und vaskuläre Charakterisierung von WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen

Parallel zu den Genexpressionsanalysen wurden Wildtyp- und gp91$^{phox-/-}$-Mäuse 8 Monate Rauch-exponiert, da in vorangegangenen Studien gezeigt wurde, dass nach 8 Monaten deutliche Anzeichen für COPD im Mausmodell nachweisbar sind. Anschließend wurden alveoläre und vaskuläre morphometrische Messungen und Lungenfunktionstests durchgeführt, um die Phänotypen zu charakterisieren und zu vergleichen.

Die Selektion von gp91$^{phox-/-}$-Mäusen beruhte dabei 1) auf der Tatsache, dass gp91^{phox} als membrangebundene NADPH-Oxidase potentiell eine Haupt-ROS-Quelle als Antwort auf oxidativen Stress und Inflammation, u.a. verursacht durch Zigarettenrauch, darstellt und 2) die Expressionsanalysen zeigten, dass gp91^{phox} im Verlauf der COPD-Entwicklung im Mausmodell Regulationen unterworfen war und dieses Gen in COPD-Patienten herunterreguliert war.

3.5.1 Nachweis der Emphysementwicklung

Um Aussagen über die Emphysementwicklung treffen zu können, wurden drei Parameter bestimmt: 1) der prozentuale Luftraum in den Gewebeschnitten (*Air Space* [%]), 2) der mittlere interalveoläre Abstand im Lungengewebe (*Mean linear intercept*, MLI) und 3) die Septendicke (*Septal wall thickness*).

Wildtyp (WT)- und gp91$^{phox-/-}$-Mäuse zeigten nach 8 Monaten Rauchexposition deutliche Anzeichen eines Emphysems (**Abb. 9d, e**), reflektiert durch den Anstieg des prozentualen Luftraums (**Abb. 9a**) und des *Mean linear intercepts* (**Abb. 9b**) und schließlich durch die signifikante Abnahme der Septendicke (**Abb. 9c**). Diese Veränderungen wurden ebenfalls bei den gp91$^{phox-/-}$-Kontroll-Mäusen festgestellt, die zu keinem Zeitpunkt Zigarettenrauch ausgesetzt waren, wohin gegen die Kontrollen des Wildtyps keine pathologischen Anzeichen aufzeigten (**Abb. 9a-c**).

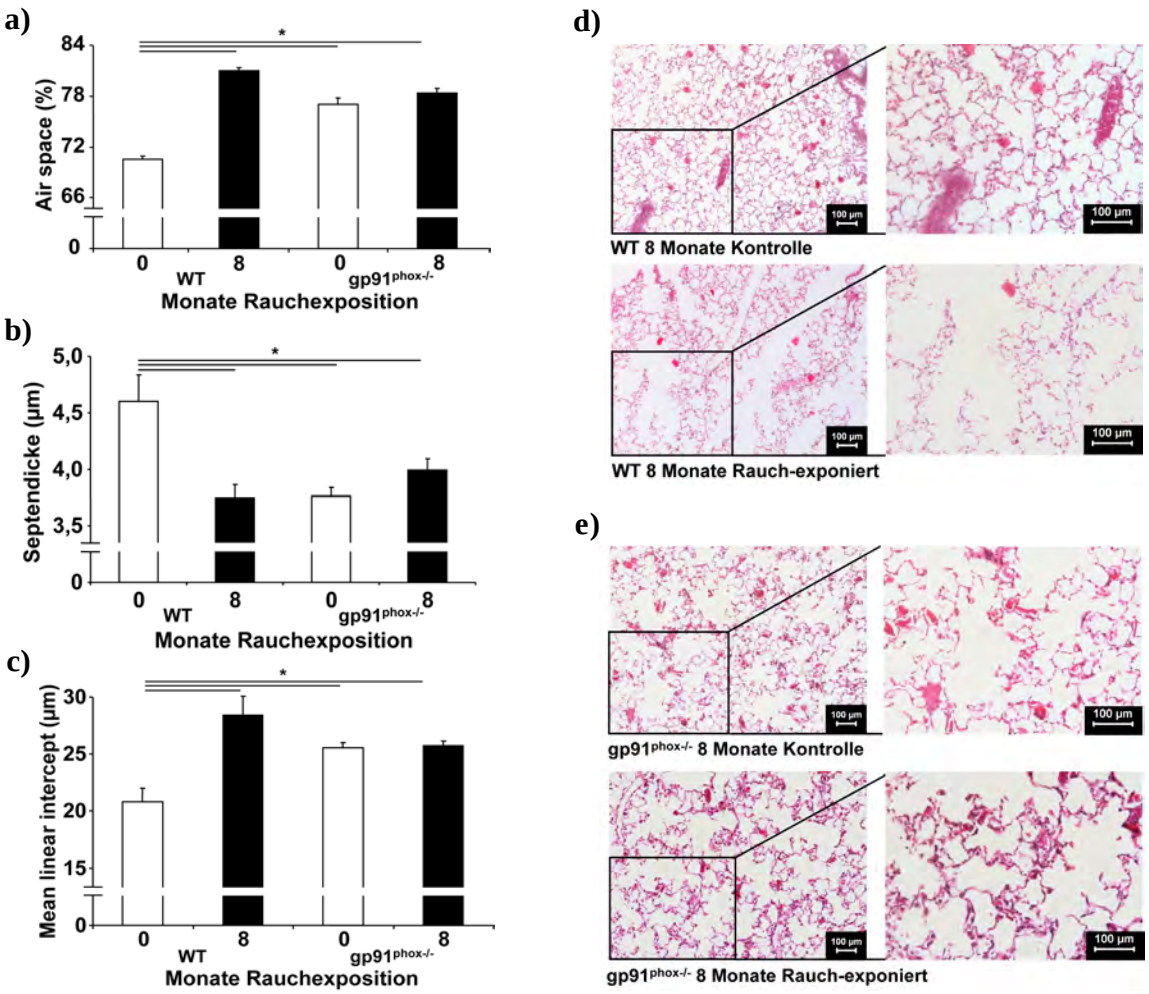


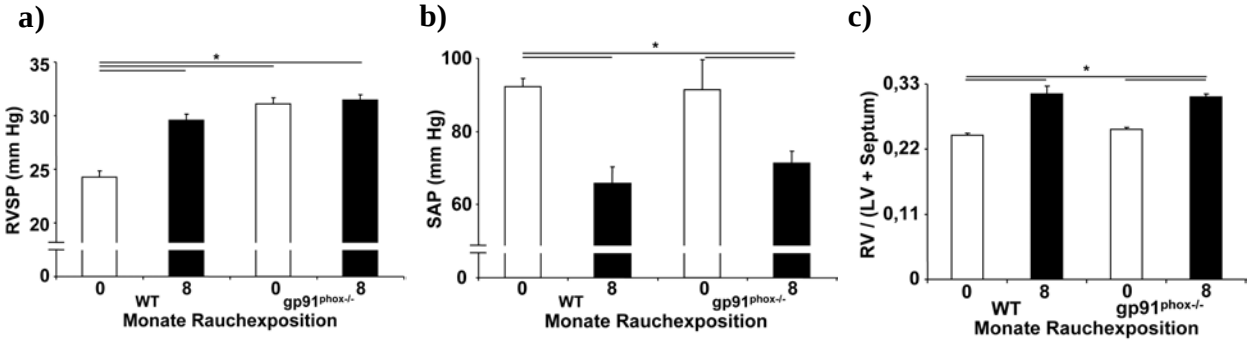
Abbildung 9: Emphysementwicklung in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen.
a) prozentualer Luftraum (Air Space), b) Septendicke, c) Mean linear intercept, ermittelt aus Hämatoxylin+Eosin (HE)-gefärbten Lungenschnitten, d+e) repräsentative Bilder HE-gefärbter Lungenschnitte, n=6, * = signifikant ($p<0,05$).

3.5.2 Entwicklung von pulmonaler Hypertonie

3.5.2.1 Hämodynamik und Herzratio

In diesem Versuchsteil wurde überprüft, ob die Rauchexposition und der Genknockout von gp91^{phox} direkte oder indirekte Effekte auf das Herz haben und zur pulmonalen Hypertonie führen. Dazu wurden hämodynamische Untersuchungen mit Messungen des rechts-ventrikulären systolischen (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) und des system-arteriellen Drucks (*systemic arterial pressure*, SAP) durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Ratio zwischen dem rechten zum linken Ventrikel plus Septum bestimmt, um gegebenenfalls eine Rechtsherzhypertrophie zu zeigen. Aus **Abb. 10a** geht hervor, dass der RVSP nach

Rauchexposition in WT und gp91$^{phox-/-}$ signifikant erhöht war. Dasselbe Phänomen konnte bei gp91$^{phox-/-}$-Mäusen ohne Rauchexposition beobachtet werden. Der signifikante Abfall des SAP (**Abb. 10b**) und die Rechtsherzhypertrophie (**Abb. 10c**) konnten lediglich in den Rauch-exponierten Individuen von WT und gp91$^{phox-/-}$ beobachtet werden, jedoch nicht in den Kontrolltieren von gp91$^{phox-/-}$. Die tabellarische Darstellung (**Abb. 10d**) der Massen von RV und LV+S verdeutlichen, dass sich lediglich die Massen des RV, nicht jedoch des LV+S änderten.



d)

	RV (g) ± SEM		LV+ S (g) ± SEM		RV/(LV+S) ± SEM	
	Kontrolle	**RE**	**Kontrolle**	**RE**	**Kontrolle**	**RE**
WT	0,0051 ± 0,0001	0,0065***** ± 0,0002	0,0207 ±0,00089	0,0207 ± 0,0003	0,2464 ± 0,0036	0,314***** ± 0,0132
gp91$^{phox-/-}$	0,0053 ± 0,0001	0,0067***** ± 0,0001	0,0211 ± 0,0002	0,0214 ± 0,0002	0,2512 ± 0,0042	0,3131***§** ± 0,0066

Abbildung 10: Parameter-Messung bezüglich pulmonaler Hypertonie und arterieller Druckveränderungen in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen.
a) rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP), b) system-arterieller Druck (SAP), c) Verhältnis von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum, d) Massen von RV und LV+S; n=6, SEM = Standardfehler, RE = Rauch-exponiert, * = signifikant ($p<0,05$) zur jeweiligen Kontrolle, § = signifikant zu Kontrolle_WT.

3.5.3 Vaskuläre Veränderungen in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen

3.5.3.1 Muskularisierungsgrad und vaskuläres Lumen

Da COPD nicht nur eine alveoläre Erkrankung darstellt, sondern durchaus auch vaskuläre Veränderungen stattfinden können, wurden in diesem Teil der Arbeit die Gefäße näher untersucht. Aus **Abb. 11a** ist zu sehen, dass der Muskularisierungsgrad von Gefäßen der Größe 20-70 µm durch Rauchexposition in WT und gp91$^{phox-/-}$, aber auch in gp91$^{phox-/-}$-Kontrollen ohne Rauch nach 8 Monaten deutlich erhöht war. Darüber hinaus war das Lumen dieser Gefäße signifikant reduziert (**Abb. 11d**). Ähnliches konnte bei Gefäßen von 70-150 µm beobachtet werden, jedoch war das Lumen der gp91$^{phox-/-}$-Kontrollen zwar zu den nicht-exponierten WT-

Mäusen reduziert, jedoch nicht signifikant (**Abb. 11b, e**). Gefäße größer 150 µm zeigten eine stärkere Muskularisierung und Verkleinerung des Lumens ausschließlich bei den Rauch-exponierten Gruppen von WT und gp91$^{phox-/-}$ im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (**Abb. 11c, f**). Die verstärkte Muskularisierung nach Rauchexposition bzw. Deletion von gp91^{phox} ist auch visuell in **Abb. 12** dargestellt.

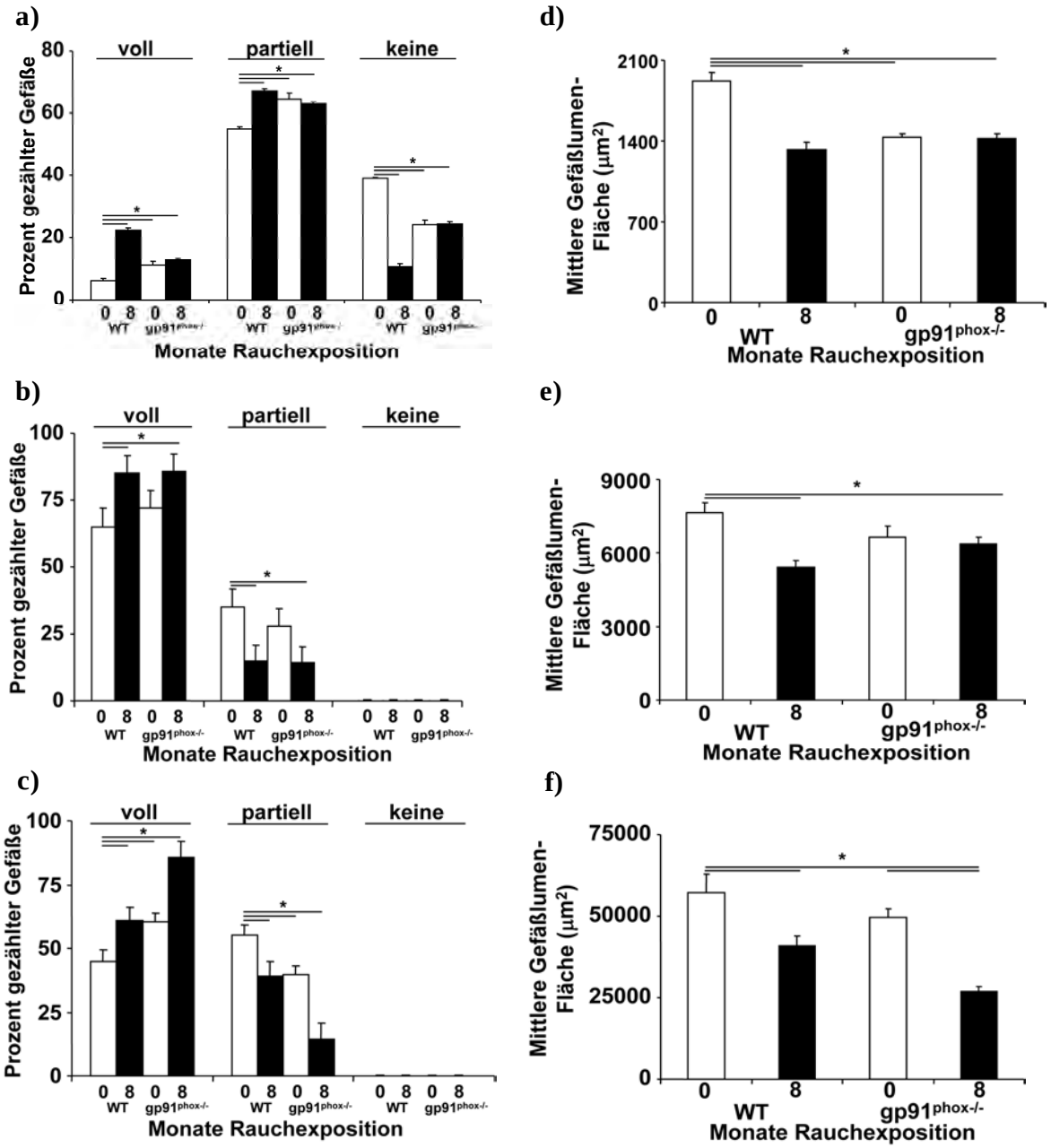


Abbildung 11: Erhöhter Muskularisierungsgrad und Verengung des Lumes pulmonaler Arterien in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen aufgrund von Rauchexposition bzw. gp91^{phox}-Deletion
Muskularisierungsgrad und Lumina von Gefäßen der Größe a) bzw. d) 20-70 µm, b) bzw. e) 70-150 µm, c) bzw. f) >150 µm. Die Muskularisierung wurde durch Auszählen von Gefäßen von Lungen, die mit Antikörpern gegen α-

smooth muscle actin and von Willebrand-Faktor gefärbt wurden, bestimmt. Lungen zur Ermittlung der Lumenfläche der Gefäße wurden mit Elastica Kernechtrot-Färbung coloriert, voll = voll muskularisiert, partiell = teilweise muskularisiert, keine = nicht muskularisiert, n=6, * = signifikant (p<0,05).

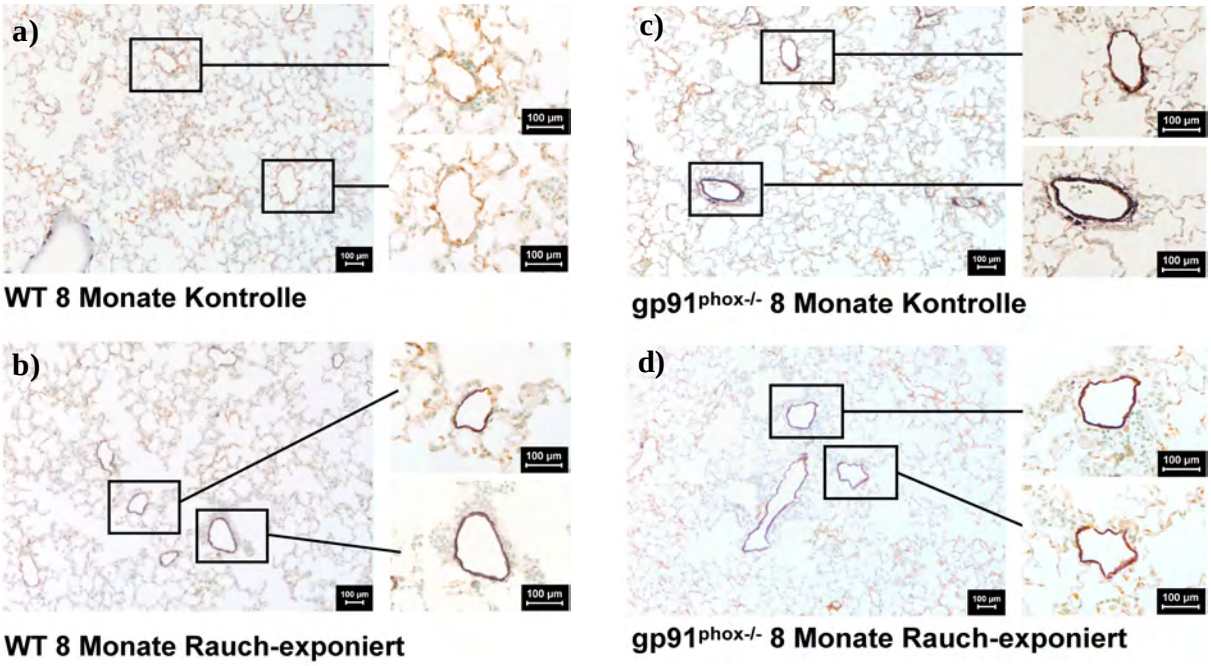


Abbildung 12: Repräsentative Bilder histologischer Färbungen zur Visualisierung erhöhter Muskularisierung pulmonaler Arterien in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen aufgrund von Rauchexposition bzw. gp91^{phox}-Deletion
Muskularisierung von Gefäßen nach a, c) 8 Monaten ohne Rauchexposition (WT- bzw. gp91$^{phox-/-}$-Kontrolle und 8 Monaten Rauchexposition in b) Wildtyp und d) gp91$^{phox-/-}$. Die Muskularisierung wurde durch Färbung mit Antikörper gegen α-*smooth muscle actin* and von Willebrand-Faktor visualisiert, je n=6.

3.5.3.2 Verhältnis Alveolen zu Gefäßen

Mit der Auszählung von den Alveolen und Gefäßen sollte gezeigt werden, ob es zu einer Verschiebung des Verhältnisses entweder durch den Verlust an Alveolen oder Gefäßen durch die Rauchexposition bzw. des Gen-Knockouts kam. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass sich das Verhältnis Alveolen zu Gefäße nach Rauchexposition sowohl in den Wildtyp- als auch in den gp91^{phox}-Knockout-Mäusen in Richtung Alveolen aufgrund des Verlusts an Gefäßen verschoben hat. Dies konnte ebenfalls bei den Kontrolltieren der gp91$^{phox-/-}$-Mäuse beobachtet werden. Ergänzend ist zu sagen, dass sich das Ausmaß der Verschiebung am deutlichsten bei den Rauch-exponierten gp91$^{phox-/-}$-Mäusen zeigte, wobei eine Signifikanz zwischen gp91$^{phox-/-}$ Kontrolle und Rauch-exponiert auszumachen war (**Abb. 13**).

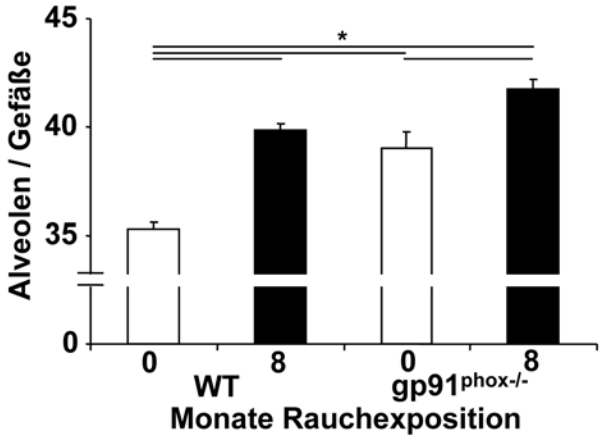


Abbildung 13: Verlust an Gefäßen aufgrund von Rauchexposition und/oder Ablation von gp91^{phox}
In Lungenquerschnitten, die mit Antikörpern gegen α-*smooth muscle actin* and von Willebrand-Faktor gefärbt wurden, wurden Alveolen und Gefäße ausgezählt und die Ratio berechnet, n=6, * = signifikant (p<0,05).

3.5.4 Lungenfunktionstests (*Compliance*, Tidalvolumen, *Resistance*)

In diesen Versuchen wurden die Lungen auf ihre Funktion getestet. Aus **Abb. 14a** geht hervor, dass die *Compliance* und damit die Elastizität der Lunge und das Tidalvolumen (**Abb. 14b**) in den Rauch-exponierten Mäusen von Wildtyp und gp91$^{phox-/-}$ signifikant erhöht waren. Dies konnte ebenfalls bei den Knockout-Tieren ohne Rauchexposition beobachtet werden, jedoch in Bezug auf die *Compliance* scheinbar in geringerem Maße als die Rauch-exponierten Individuen, aber dennoch signifikant zu den WT-Kontrollen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der pulmonale Widerstand (*Resistance*) sowohl bei den Rauch-exponierten Wildtyp- als auch bei den beiden Gruppen der gp91$^{phox-/-}$-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen reduziert war (**Abb. 14c**).

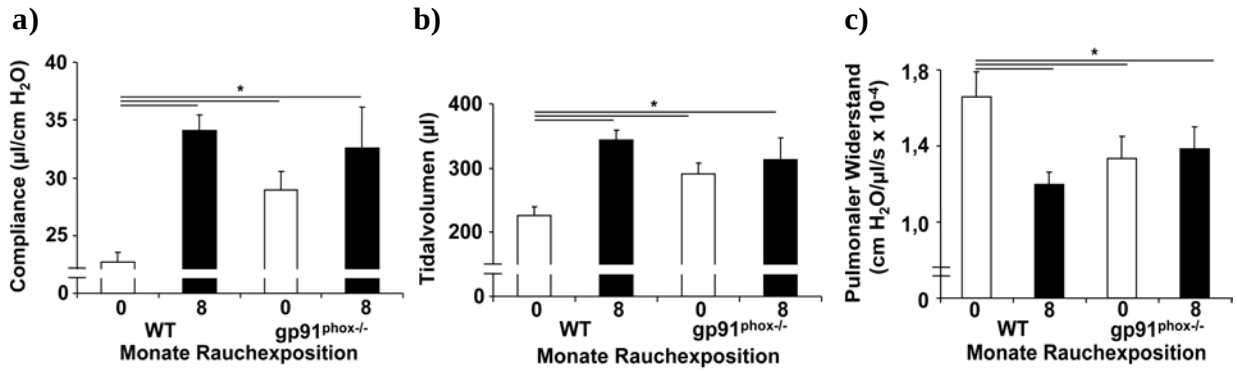


Abbildung 14: Lungen-Compliance, Tidalvolumen und Atemwegswiderstand in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen nach 8-monatiger Rauchexpositon.
Funktionale Lungenparameter, ermittelt durch Messung an isoliert-perfundierten Mauslungen unter Ventilation mit negativem Druck, n=6, * = signifikant (p<0,05).

3.6 Lokalisation von gp91^{phox} in WT und COPD-Patienten und Vergleich der Expressionsintensitäten vor und nach Rauchexposition

Die Immunfluoreszenzfärbungen der Lungenquerschnitte aus **Abb. 15** zeigen die Expression von gp91^{phox} in den Bronchien, Gefäßen und den alveolären Septen, sowohl in den Mäusen als auch in den humanen Proben. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Signalintensitäten in den Rauch-exponierten Mäusen und den COPD-Patienten augenscheinlich geringer waren als in den dazugehörigen Kontrollen, was geringere Proteinexpressionen in diesen Individuen suggeriert.

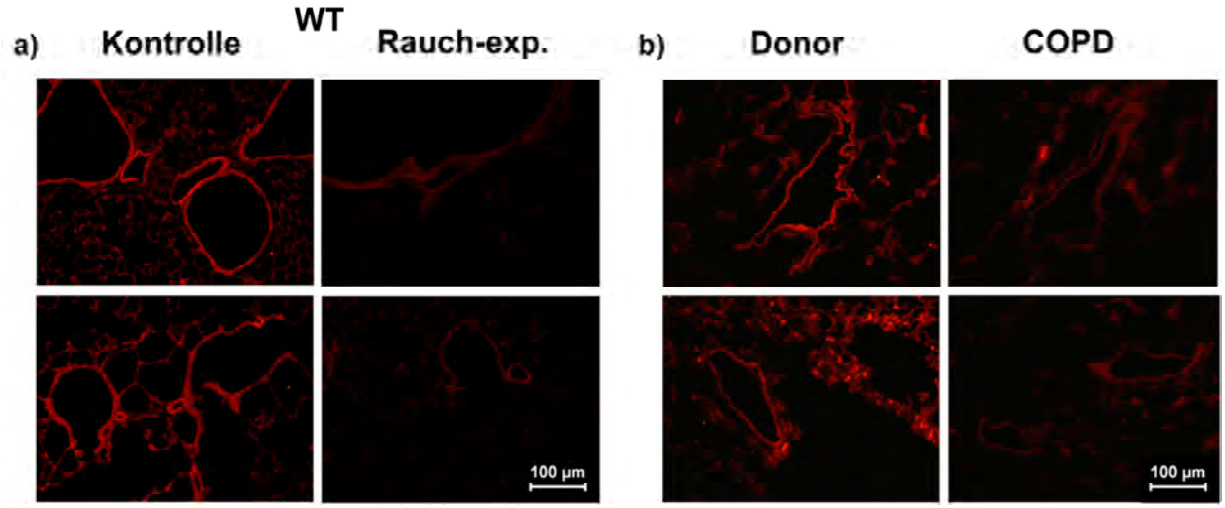


Abbildung 15: Lokalisation und Herunterregulation von gp91^{phox} in WT-Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition und COPD-Patienten.
Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen gp91^{phox} zur Lokalisation in a) murinen und b) humanen Lungen. Das Protein scheint in Gefäßen, Bronchien und alveolären Septen lokalisiert und durch Rauchexposition herunterreguliert zu sein, repräsentative Aufnahmen, n=5.

3.7 Screening von NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen in Lungenhomogenat von gp91$^{phox-/-}$-Mäusen und Überprüfung von Konterregulation

Nachdem die alveolären und vaskulären Veränderungen nach dem Knockout von gp91^{phox} charakterisiert wurden, stellte sich die Frage, ob und inwiefern die NADPH-Oxidasen nach Rauchexposition reguliert waren. Darüber hinaus drängte sich die Frage auf, ob eine Konterregulation durch die verbliebenen NADPH-Oxidasen und ggf. der NO-Synthasen stattfand. Zu diesem Zweck wurde zuerst die Genexpression der einzelnen Gene mit und ohne Rauchexposition verglichen. Danach wurden die Expressionsniveaus dieser Gene mit denen des Wildtyps verglichen. Aus **Abb. 16** geht hervor, dass es nach Rauchexposition in den Knockout-Mäusen zu signifikanter Abnahme von NOX1, NOXA1, NOXO1, DUOX1 und DUOX2 im Vergleich zu den Kontrollen kam. Heraufregulierungen konnten nicht festgestellt werden. Diese Herunterregulationen, vor allem von NOX1, NOXA1 und NOXO1, scheinen auf den ersten Blick kontrovers zu den Ergebnissen vom Wildtyp. Jedoch bei näherer Betrachtung der Expressionslevel aller Gene im Vergleich zu dem Wildtyp ist zu konstatieren, dass NOX1 auf Basal-Ebene, d.h. ohne Rauchexposition, und NOXO1 auf Basal-Ebene als auch nach Behandlung mit Zigarettenrauch deutlich stärker in den gp91$^{phox-/-}$-Mäusen exprimiert waren (**Abb. 17**). Nach Rauchexposition nahm die verstärkte Expression von NOX1 ab und kehrte in etwa zum Niveau des vergleichbaren Wildtyps zurück. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass p47^{phox}, p67^{phox} und iNOS mit und ohne Rauchexposition in den Knockout-Mäusen deutlich stärker exprimiert, wohin gegen die Expressionslevel von p40^{phox}, NOXA1, Rac2 und eNOS in diesen Gruppen reduziert waren. Bemerkenswert war außerdem, dass DUOX1 und DUOX2 auf Basal-Ebene in den Knockout-Mäusen erhöht waren und nach Rauchexposition wieder absanken. Die Gene p22^{phox}, NOX4 und Rac1 wurden scheinbar weder durch die Rauchexposition, noch durch den Gen-Knockout zum Zeitpunkt 8-monatiger Exposition beeinflusst.

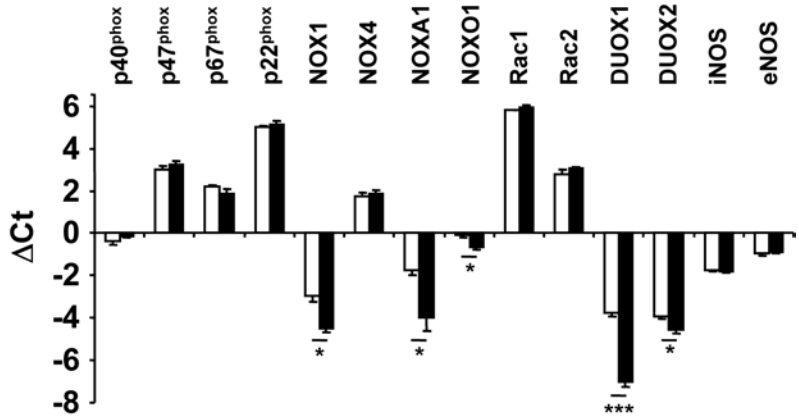


Abbildung 16: NADPH-Oxidasen- und NO-Synthasen-Expression in gp91$^{phox-/-}$-Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition

Genexpressionen aus murinem Lungenhomogenat von Kontroll- und Rauch-exponierten Tieren. Expressionen normalisiert zu PBGD, Balken: weiß (Kontrolle), schwarz (Rauch-exponiert), n=5, signifikant, wenn * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001).

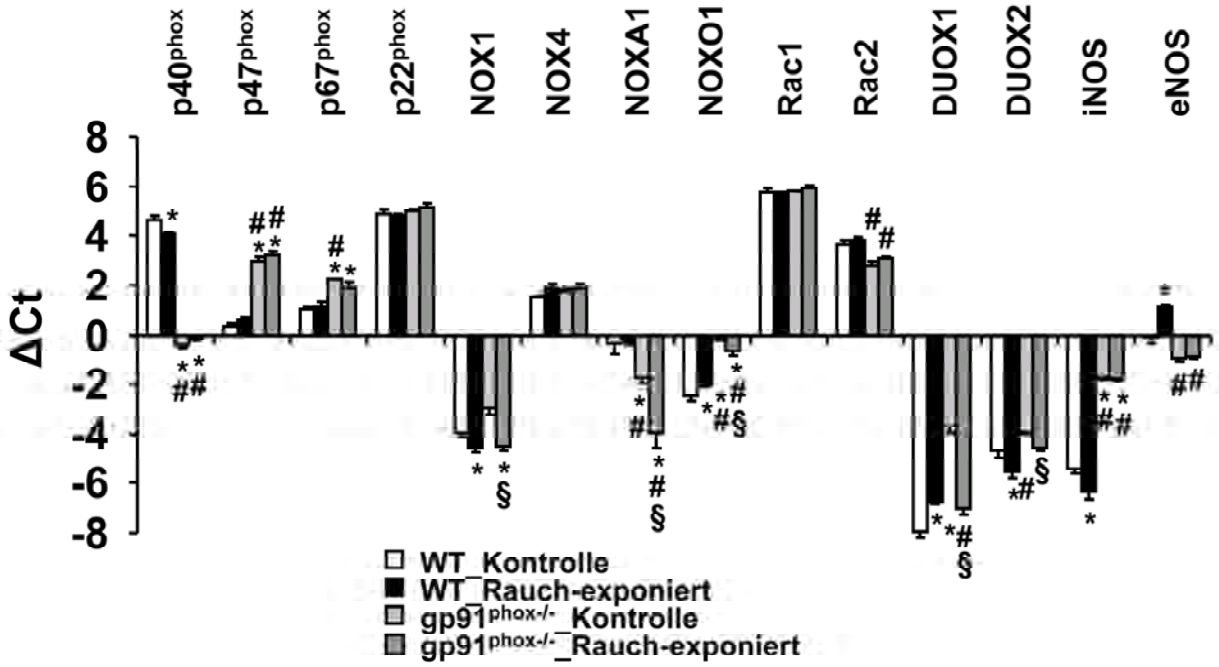


Abbildung 17: Vergleich der NADPH-Oxidasen- und NO-Synthasen-Expressionslevel in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition

Genexpressionen aus murinem Lungenhomogenat jeweils von Kontroll- und Rauch-exponierten Tieren. Diese Darstellung fokussiert auf die unterschiedlichen Expressionsniveaus der einelnen Gene in WT und Knockout und der Konterregulation nach Deletion von gp91^{phox}. Normalisierung fand zu PBGD statt, * = signifikant zu WT_Kontrolle, # = signifikant zu WT_Rauch-exponiert, § = signifikant zu gp91$^{phox-/-}$_Kontrolle, je p<0,05, n=5.

3.8 Nähere Untersuchung von NOXA1 und NOXO1

Obwohl die vorangegangenen *Screenings* verschiedenste Regulationen der untersuchten NADPH-Oxidasen aufzeigten, stellten vor allem NOXA1 und NOXO1 interessante Zielgene dar, da sie zu unterschiedlichsten Zeitpunkten in der Entwicklung der COPD in den Wildtyp-Mäusen reguliert waren. Weiterhin zeigten sie deutliche Veränderungen in ihren Expressionslevels in den $gp91^{phox-/-}$-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Somit stand das Regulator(NOXA1)- bzw. Organisator(NOXO1)-Protein im Fokus der folgenden Untersuchungen.

Ebenfalls von Interesse weiterer, näherer Untersuchungen standen die NO-Synthasen, da auch diese im Verlauf der COPD-Entwicklung Regulationen zeigten und insbesondere deutliche Unterschiede in der Expression in den $gp91^{phox-/-}$-Mäusen aufwiesen. Auf die NO-Synthasen wird später eingegangen.

3.8.1 Proteinexpression in Lungenhomogenat von WT und $gp91^{phox-/-}$

Die mRNA-Expression gibt in den meisten Fällen Aufschluss auf die darauf folgende Protein-Expression, jedoch korreliert eine Erhöhung der mRNA- nicht immer mit der Protein-Menge. Eine Erhöhung/Erniedrigung der mRNA resultiert nicht zwangsläufig in mehr bzw. weniger Protein. Schließlich stellt das Protein die funktionelle Einheit dar. Aus diesem Grund wurde in diesem Teil der Arbeit die Proteinexpression nach Rauchexposition überprüft.

Abb. 18a, c zeigt, dass NOXO1 im Wildtyp kontinuierlich nach Rauchexposition vermehrt gebildet bzw. detektiert wurde. Weiterhin ist erkennbar, dass in den KO-Tieren im Vergleich zum WT sowohl ohne als auch mit Begasung mit Zigarettenrauch signifikant mehr NOXO1 feststellbar war. Auch bei NOXO1 in $gp91^{phox}$-KO konnte eine Absenkung nach Rauchgabe beobachtet werden.

Aus **Abb. 18b, c** wird ersichtlich, dass das NOXA1-Protein nach drei Monaten Rauchexposition signifikant erhöht war. Zum Zeitpunkt 8-monatiger Exposition konnte kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Diese Regulationen korrelierten mit den mRNA-Ergebnissen. Beim Vergleich von WT und $gp91^{phox-/-}$ wird deutlich, dass auf Basalebene, d.h. in der Kontrolle ohne Rauchexposition, NOXA1 in den Knockout-Tieren deutlich auf Proteinebene erhöht war. Darüber hinaus konnte ein Absinken infolge des Rauchens beobachtet werden. Jedoch war die Protein-Menge, in etwa vergleichbar mit dem Rauch-exponierten Wildtyp, immer noch höher als in der Kontrolle des Wildtyps.

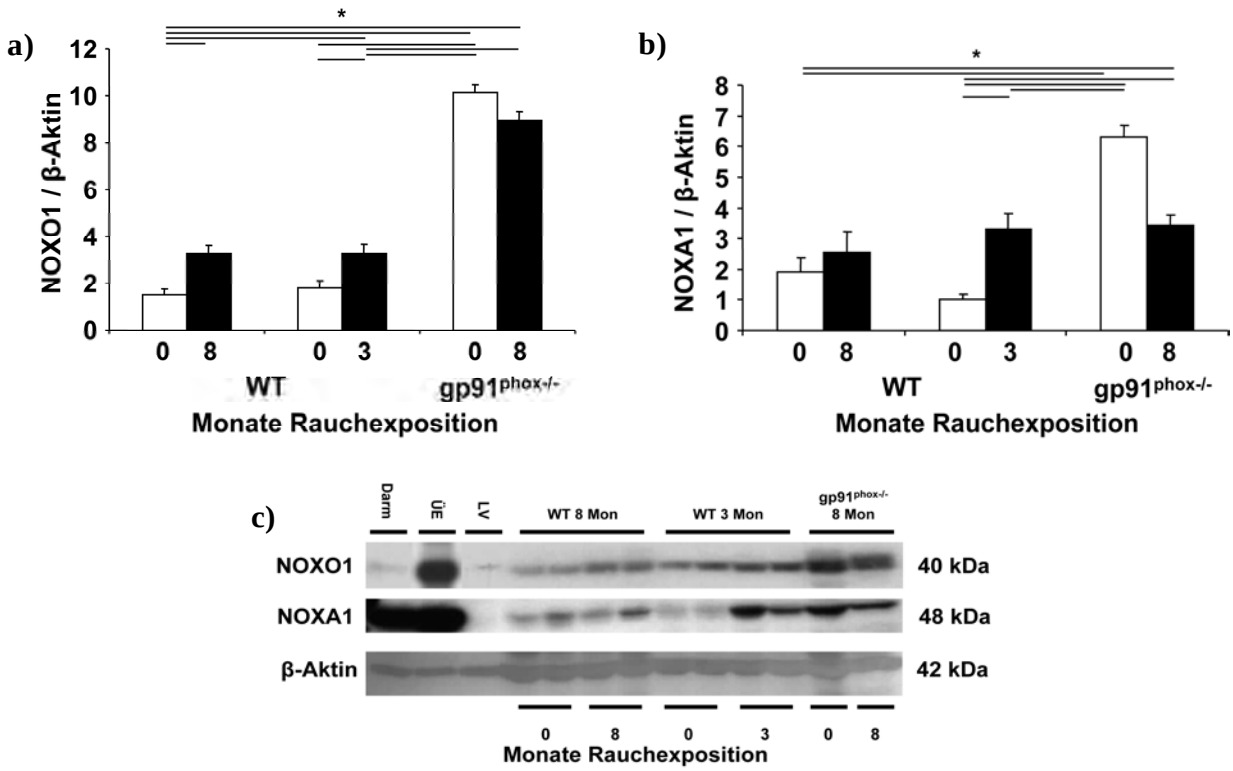


Abbildung 18: NOXA1- und NOXO1-Proteinexpressionen in WT-Mäusen nach 3- und 8-monatiger Rauchexposition
Western Blot-Analysen aus Lungenhomogenat von Kontroll- und Rauch-exponierten Mäusen. a) Densometrische Auswertung der NOXO1-Expression, b) Densometrische Auswertung der NOXA1-Expression, c) repräsentative Western Blots der NOXA1- und NOXO1-Expressionen. Normalisierung zu β-Aktin, ÜE = überexprimiertes Protein, LV = Leervektor, WT = Wildtyp, KO = gp91$^{phox-/-}$, * = signifikant ($p<0,05$), n=5.

3.8.2 Proteinexpression von NOXA1 und NOXO1 in COPD-Patienten

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus dem Mausmodell gegenüber humanen COPD-Patienten zu zeigen, wurde die Proteinexpression von NOXA1 und NOXO1 in Donor- und COPD-Lungen untersucht.

Obwohl NOXA1 (**Abb. 19a, c**) auf mRNA-Ebene nicht und NOXO1 (**Abb. 19b, d**) herabreguliert waren, zeigte die Untersuchung auf Proteinebene signifikante Anstiege beider Proteine in Lungen von COPD-Patienten im Vergleich zu Donoren, die Nichtraucher waren.

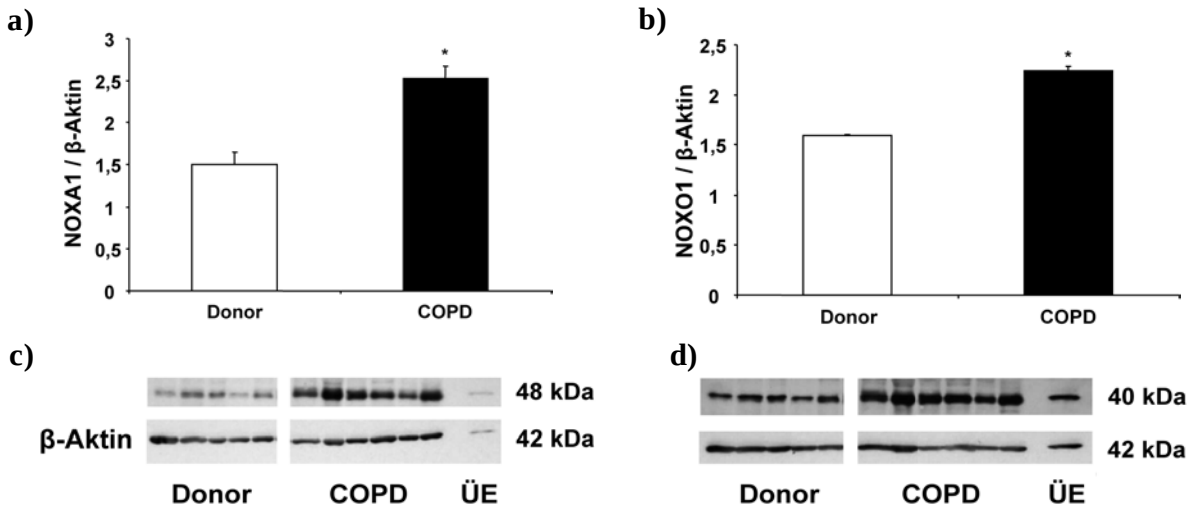


Abbildung 19: NOXA1- und NOXO1-Proteinexpressionen in Lungen von Donoren und COPD-Patienten
Western Blot-Analysen aus Lungenhomogenat von Donoren und COPD-Patienten. a) Densometrische Auswertung der NOXA1-Expression, b) Densometrische Auswertung der NOXO1-Expression, c) repräsentative Western Blots der NOXA1- und d) NOXO1-Expressionen. Normalisierung zu β-Aktin, ÜE = überexprimiertes Protein, * = signifikant ($p<0,05$), n=6.

3.8.3 Lokalisation von NOXA1 und NOXO1

Nachdem die Regulationen dieser Proteine im Lungenhomogenat nach Rauchexposition gezeigt wurden, stellte sich die Frage nach der genaueren Lokalisation innerhalb der Lunge.

Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenz-Färbungen an Kryo-Lungenquerschnitten durchgeführt. Dabei wurden neben den Lungen von Kontrolltieren auch solche von Rauch-exponierten Tieren verwendet, um neben der Lokalisation auch Hinweise auf die Regulation der Proteine, reflektiert durch stärkeres oder schwächeres Fluoreszenzsignal, zu bekommen.

3.8.3.1 in der Lunge von WT und gp91$^{phox-/-}$

NOXA1 scheint in der Lunge von WT-Mäusen vor allem in den Gefäßen und den Bronchien und schwächer in den alveolären Septen lokalisiert zu sein, wohin gegen NOXO1 in allen drei Kompartimenten deutlich verbreitet zu sein scheint (**Abb. 20a, b**). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Expression von NOXA1 nach 3 Monaten Rauch-Exposition in den Gefäßen und Bronchien erhöht war, visualisiert durch die höhere Intensität des Fluoreszenzsignals. Nach 8 Monaten Rauch konnte keine verstärkte Expression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass NOXO1 sowohl nach 3

als auch nach 8 Monaten Rauch-Exposition in den Gefäßen, Bronchien und Septen vermehrt auftrat.

Auf Proteinebene via Western Blot wurde in Lungenhomogenat in Abschnitt **3.6.1** bereits gezeigt, dass NOXA1 und NOXO1 sowohl auf Basal-Ebene ohne als auch nach 8-monatiger Rauch-Exposition in den gp91^{phox}-Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht waren. Fluoreszenzfärbungen auf Lungenschnitten konnten dies bestätigen (**Abb. 20c**). Die Lokalisation der einzelnen Proteine stimmte mit denen des Wildtyps überein, jedoch waren die Intensitäten des Fluoreszenzsignals und damit die detektierten Proteinmengen im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Selbst NOXA1 war zum Zeitpunkt 8-monatiger Rauchexposition im gp91^{phox} -Knockout erhöht, was beim Wildtyp lediglich nach 3 Monaten zu beobachten war.

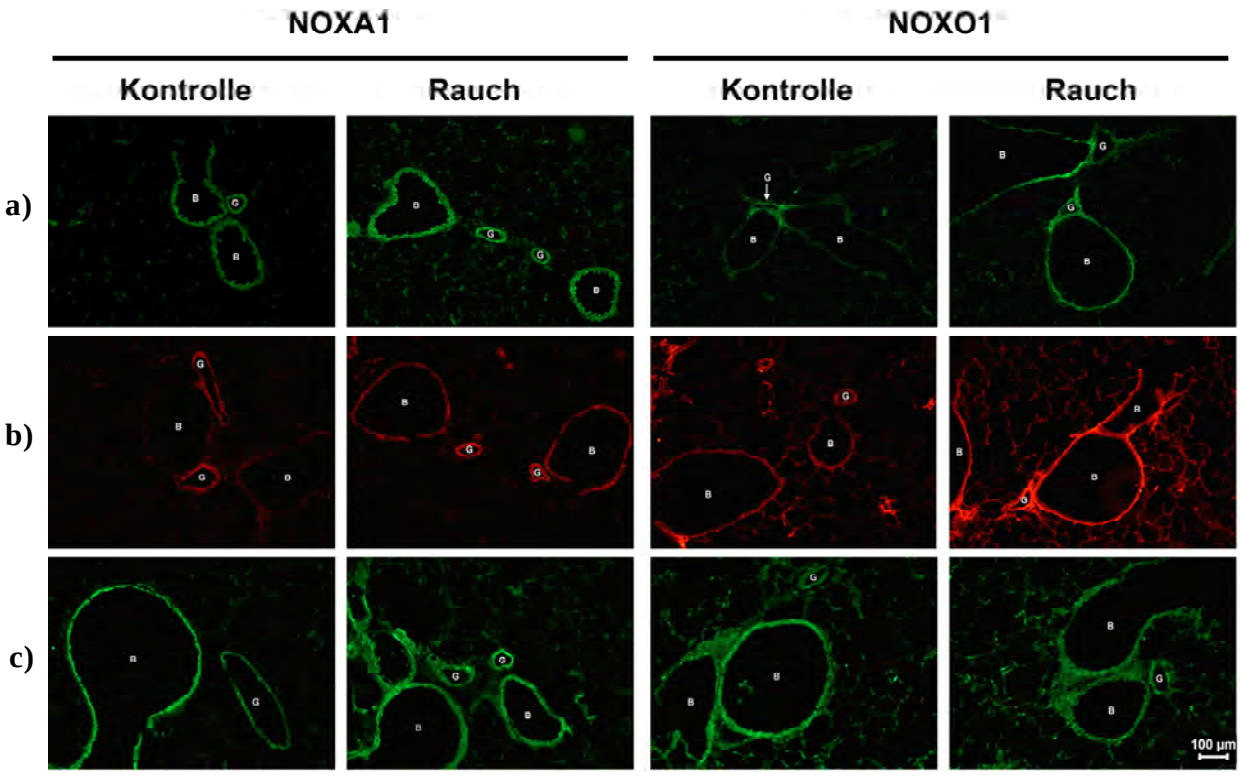


Abbildung 20: Lokalisation von NOXA1 und NOXO1 in Lungen von WT und gp91$^{phox-/-}$ vor und nach Rauchexposition
Immunfluoreszenz-Färbungen von NOXA1 und NOXO1 an 8 µm-Lungen-Kryoschnitten in a) WT nach 3-monatiger, b) WT nach 8-monatiger und c) gp91$^{phox-/-}$ nach 8-montiger Rauchexposition; B = Bronchus, G = Gefäß.

3.8.3.2 in VSMCs vom WT

Da die Lokalisation von NOXA1 und NOXO1 ergab, dass die Proteine sich u.a. in den Gefäßen befanden, wurden glatte Muskelzellen präkapillärer Gefäße von 2 Wochen Rauch-exponierten Mäusen und den dazugehörigen Kontrollen ohne Rauchexposition isoliert und Fluoreszenzfärbungen durchgeführt, um 1) die Proteine innerhalb dieser Zellen näher zu lokalisieren und um 2) Effekte durch die Rauchexposition, wie Translokation oder Heraufregulation des jeweiligen Proteins gegebenenfalls aufzuzeigen.

Die Immunfluoreszenzfärbungen ergaben, dass NOXA1 innerhalb der glatten Muskelzellen hauptsächlich in den Zellkernen als Vesikel-ähnliche Strukturen lokalisiert ist. NOXO1 hingegen konnte sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma detektiert werden. Ergänzend ist hinzuzufügen, dass sich NOXO1 scheinbar in der Membran des Zellkerns befand. Weiterhin wurde für beide Proteine beobachtet, dass die Rauchexposition einen direkten, stimulierenden Einfluss auf die Menge an detektierbarem Protein hatte.

Obwohl die Quantität der Proteine durch die Rauchexposition scheinbar zunahm, konnten Translokationen von NOXA1 und NOXO1 nicht beobachtet werden.

Interessanterweise zeigten vergleichbare Untersuchungen mit $p47^{phox}$, einem Homolog zu NOXO1, in glatten Muskelzellen, dass dieses außerhalb des Zellkerns vorwiegend im Zytoplasma dieser Zellen exprimiert wird, wobei scheinbar Akkumulationen im Bereich der Zellkernmembran, besonders nach Rauchexposition, stattfanden. Untersuchungen von $p67^{phox}$, dem Homolog zu NOXA1, blieben im Rahmen dieser Arbeit aufgrund unspezifischer Antikörper ohne Ergebnis.

Da im nachfolgenden Ergebnisteil auch näher auf iNOS eingegangen wird, wird an dieser Stelle auch die Lokalisation dieses Proteins in glatten Muskelzellen gezeigt. Es scheint hauptsächlich im Zytoplasma und in der Nähe der Kernmembran lokalisiert zu sein, was durch Rauchexposition unverändert zu sein scheint (**Abb. 21**).

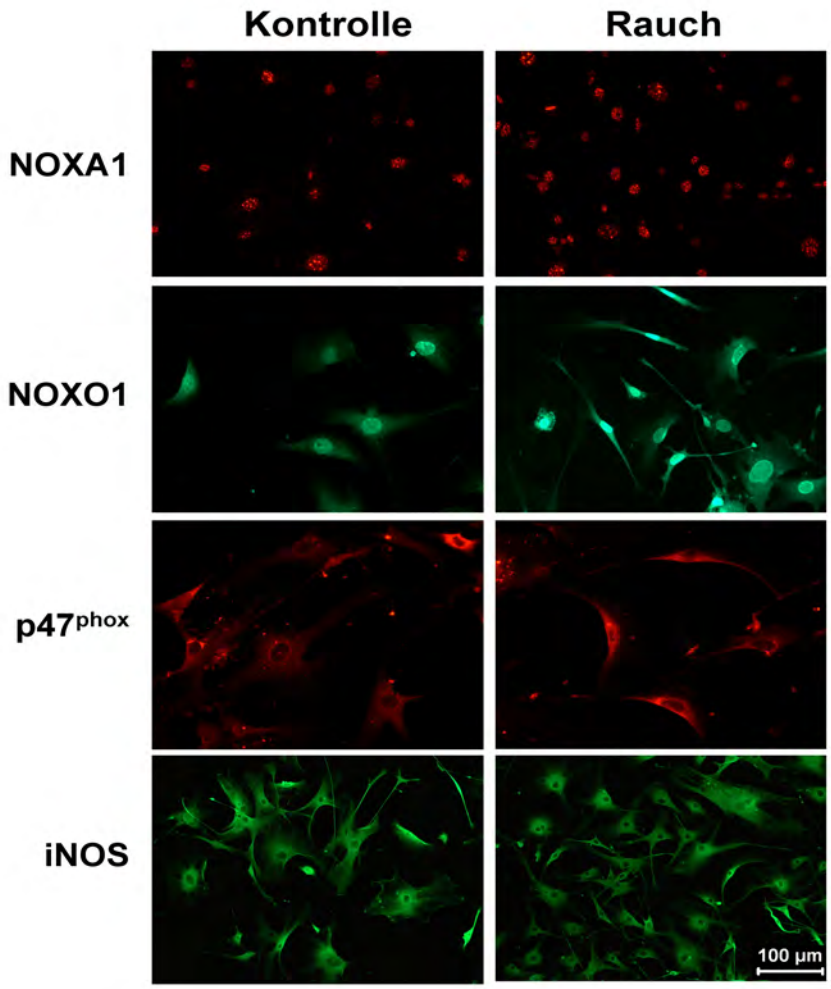


Abbildung 21: Lokalisation von NOXA1, NOXO1, p47^{phox} und iNOS in isolierten pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen von WT-Mäusen vor und nach Rauchexposition
Immunfluoreszenz-Färbungen an SMCs, isoliert aus Kontrollen und 2 Wochen Rauch-exponierten Mäusen.

3.8.4 NOXA1- und NOXO1-Expression in mikrodissektierten Gefäßen

Da die vorangegangenen Untersuchungen ergaben, dass NOXA1 und NOXO1 u.a. in Gefäßen lokalisiert sind, wurden Gefäße mit Hilfe eines Lasers aus Lungenquerschnitten isoliert, die RNA aufgereinigt und präamplifiziert. Schließlich wurde eine Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR durchgeführt.

Aus **Abb. 22** ist zu erkennen, dass NOXA1 nach 3 Monaten Rauchexposition signifikant hochreguliert war, was nach 8 Monaten nicht mehr zu festzustellen war. Weiterhin zeigt die Abbildung, dass die NOXO1-Expression zu beiden Zeitpunkten kontinuierlich erhöht war. Diese Daten stimmten mit den augenscheinlichen Ergebnissen der Immunfluoreszenz-färbungen und den Ergebnissen der Proteinexpression im Lungenhomogenat überein.

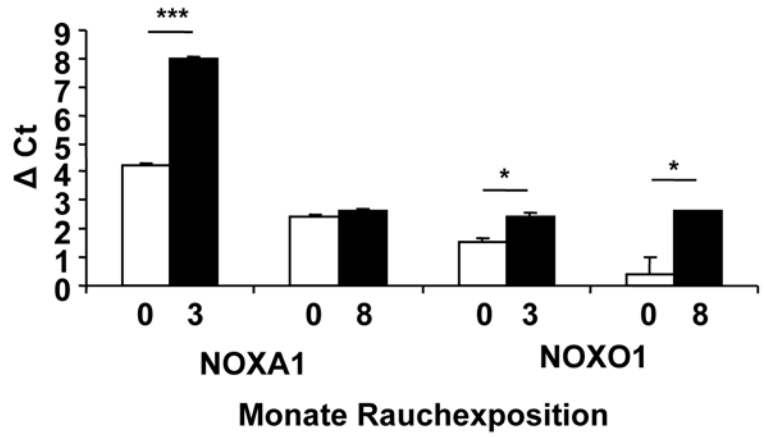


Abbildung 22: mRNA-Expressionen von NOXA1 und NOXO1 in mikrodissektierten Gefäßen von WT-Mäusen
RT-PCR aus murinem Pulmonal-Gefäßen von Kontroll- und Rauch-exponierten WT-Tieren. Expressionen normalisiert zu PBGD, n=5, signifikant, wenn * ($p<0,05$), *** ($p<0,001$).

3.9 Nähere Untersuchung von iNOS und eNOS

Da neben NADPH-Oxidasen auch die NO-Synthasen in vorangegangen *Screenings* Regulationen aufzeigten, wird im Folgenden auf diese Moleküle näher eingegangen.

3.9.1 Lokalisation von iNOS und eNOS in der Lunge auf mRNA- und Proteinebene

Immunofluoreszenzfärbungen haben gezeigt, dass das iNOS-Protein vor allem in den Gefäßen und den Bronchien lokalisiert ist. Geringere Expressionen waren in den Alveolarsepten nachweisbar. Weiterhin schien es, dass iNOS nach Rauchexposition, sowohl nach 3 als auch nach 8 Monaten, in den Gefäßen und den Bronchien heraufreguliert war (**Abb. 23a**). Diese Beobachtungen konnten auf mRNA-Ebene durch *in situ* Hybridisierung bestätigt werden (**Abb. 23c**). Darüber hinaus zeigten sich auch vermehrte Protein-Expressionen in den genannten Kompartimenten in Lungen von $gp91^{phox}$-Knockout-Mäusen mit und ohne Rauchexposition (**Abb. 23a**). Im Gegensatz zur iNOS-Hochregulation zeigte sich, dass eNOS sowohl auf Protein- (**Abb. 23b**) als auch auf mRNA-Ebene eine transiente Erhöhung (3 Monate Rauch) der Expression im Vergleich zur Kontrolle ohne Rauchexposition aufwies und nach 8 Monaten weniger exprimiert wurde (**Abb. 23d**).

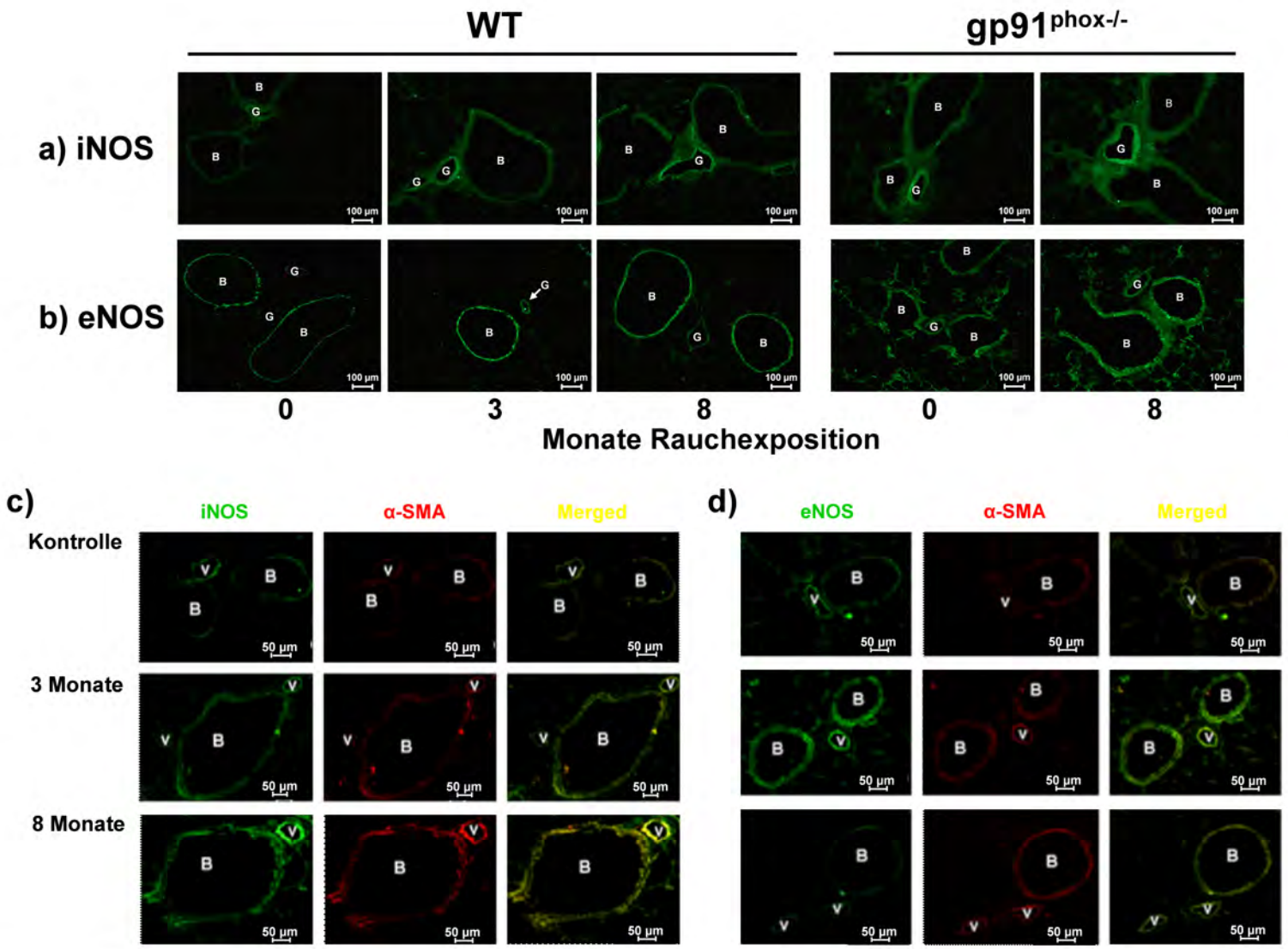


Abbildung 23: Lokalisation von iNOS und eNOS in WT-Mauslungen vor und nach Rauchexposition
Immunfluoreszenz-Färbungen zur Proteinlokalisierung von a) iNOS, b) eNOS und in situ Hybridisierung zur mRNA-Lokalisierung von c) iNOS und d) eNOS auf 8 µm-Lungen-Kryoschnitten, α-SMA = *alpha-smooth muscle actin*, Merged = überlagerte Bilder zur Co-Lokalisierung von iNOS/eNOS und α-SMA; B = Bronchus, G/V = Gefäß.

3.9.2 Expression von iNOS und eNOS auf mRNA- und Proteinebene im Mausmodell und in COPD (GOLD-IV)-Patienten

In **3.1** und **3.2** wurden die Expressionen der NO-Synthasen auf mRNA-Ebene bereits in Lungenhomogenat gezeigt. Da diese jedoch speziell auch in den Gefäßen in der Lunge exprimiert wurden, gezeigt durch Immunfluoreszenzfärbungen, wurden pulmonale Gefäße (50-100 µm) Laser-mikrodissektiert und die mRNA-Expressionen mittels Real-Time PCR untersucht. Darüber hinaus wurden Proteinexpressions-Analysen mit Lungenhomogenat via Western Blot durchgeführt. Die Ergebnisse aus **Abbildung 24a, b, c** zeigen, dass iNOS sowohl nach 3 als auch nach 8 Monaten Rauchexposition in den Gefäßen als auch in der Gesamtlunge im Mausmodell heraufreguliert war, wohingegen eNOS lediglich nach 3 Monaten eine transiente Hochregulation aufwies und nach 8 Monaten auf mRNA-Ebene in den Gefäßen nicht reguliert und in Lungenhomogenat auf Proteinebene herunterreguliert war (**Abb. 24d, e, f**).

In Lungen von COPD-Patienten zeigten sich vergleichbare Ergebnisse wie in den 8 Monate Rauch-exponierten Mäusen. Auf mRNA- und Proteinebene konnte eine signifikante Erhöhung der iNOS-Expression in den Gefäßen bzw. dem Lungenhomogenat beobachtet werden. Hingegen konnte keine nennenswerte Regulation von eNOS in den Gefäßen und eine Herunterregulation der Proteinmenge im Lungenhomogenat festgestellt werden (**Abb. 25**).

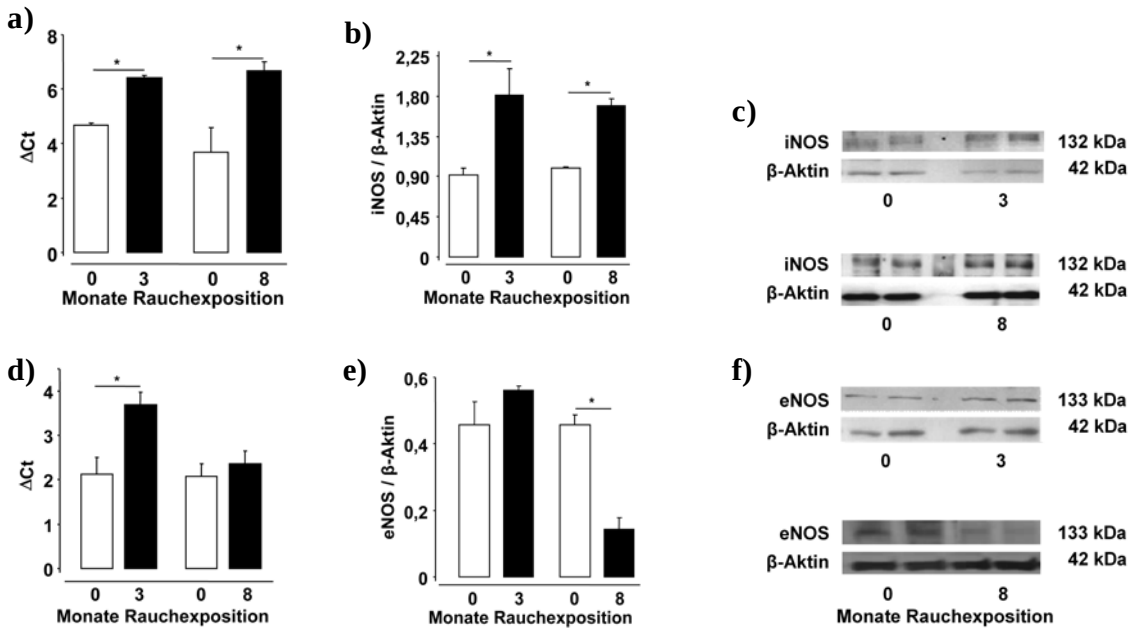


Abbildung 24: iNOS- und eNOS-Expression in WT-Mäuse vor und nach Rauchexposition
Quantitative RT-PCR zur Ermittlung der mRNA-Expression von a) iNOS und d) eNOS in mikrodissektierten pulmonalen Gefäßen (Durchmesser: 50-100 µm). Normalisierung gegen PBGD, je 20 Gefäße, n=3. Western Blot-

Analysen aus Lungenhomogenat 3 und 8 Monate Rauch-exponierter Tiere plus dazugehöriger Kontrollen, wobei b) iNOS und e) eNOS densitometrische Auswertungen der eigentlichen Blots (repräsentative Bilder) von c) iNOS und f) eNOS sind. Normalisierung gegen β-Aktin, * = signifikant (p<0,05), n=5.

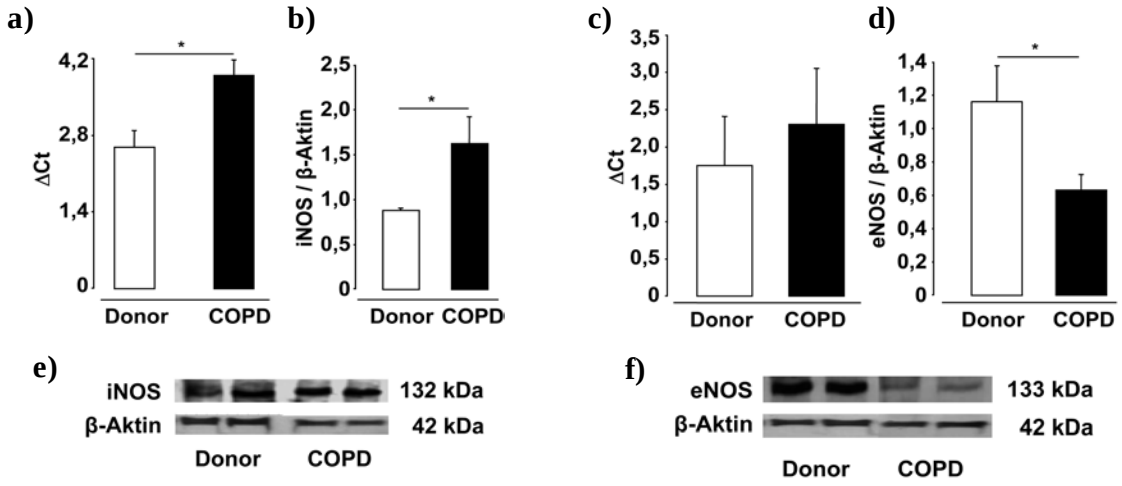


Abbildung 25: iNOS- und eNOS-Expression in Lungen von gesunden Donoren und COPD-Patienten
Quantitative RT-PCR zur Ermittlung der mRNA-Expression von a) iNOS und c) eNOS in mikrodissektierten humanen pulmonalen Gefäßen (Durchmesser: 50-100 µm). Normalisierung gegen PBGD, je 20 Gefäße, n=5. Western Blot-Analysen aus Lungenhomogenat, wobei b) iNOS und d) eNOS densitometrische Auswertungen der eigentlichen Blots (repräsentative Bilder) von e) iNOS und f) eNOS sind. Normalisierung gegen β-Aktin, * = signifikant (p<0,05), n=5.

3.10 Genauere Betrachtung des gp91$^{phox-/-}$-Phänotyps auf Basis molekularer Untersuchungen

In Anbetracht der bisherigen Ergebnisse lässt sich konstatieren, dass vor allem die Moleküle NOXA1, NOXO1, iNOS und in eNOS auffällige Regulationen in verschiedenen Kompartimenten der Lungen sowohl von den WT-, den gp91$^{phox-/-}$-Mäusen als auch von COPD-Patienten aufwiesen.

Nach dem Knockout von gp91^{phox} lies sich feststellen, dass diese mit und ohne Rauchexposition Lungenemphysem entwickelten. Die Knockout-Mäuse zeigten darüber hinaus nach Rauchexposition Anzeichen für pulmonale Hypertonie und Rechtsherzhypertrophie (RHHT). Die RHHT konnte jedoch nicht bei den Kontrolltieren des Knockouts beobachtet werden. Um herauszufinden, welche Mechanismen an der Entstehung des Phänotyps nach Rauchexposition im WT und nach Genknockout von gp91^{phox} beteiligt sind, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

3.10.1 Genexpressionsanalyse von Homogenat des rechten Ventrikels

Da, wie erwähnt, die Kontrolltiere der gp91^{phox}-defizienten Mäuse zwar einen erhöhten RVSP zeigten, jedoch im Gegensatz zu den Rauch-exponierten (RE) Individuen keine Rechtsherzhypertrophie entwickelten, wurden die rechten Ventrikel von WT- und gp91^{phox}-Knockout-Tieren (jeweils Kontrollen und RE) isoliert und Genexpressionsanalysen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Expressionen der NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen in den Kontrolltieren des Knockouts andere Expressionsmuster aufzeigten als in den Rauch-exponierten Tieren, die eine RHHT entwickelten.

Das Screening (**Abb. 26**) zeigte, dass die meisten der untersuchten Gene (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p22^{phox}, gp91^{phox}, Rac1, DUOX1, iNOS) im rechten Ventrikel weder durch die Rauchexposition, noch durch den Genknockout in ihrer Expression verändert wurden. NOX1 und NOXA1 konnten nicht eindeutig detektiert werden. NOX4 zeigte nach Rauchapplikation im WT eine signifikante Abnahme an mRNA. Der Vergleich der Rauch-exponierten Individuen des WTs mit den Knockout-Tieren beider Gruppen ergab, dass NOX4 in den Knockout-Tieren deutlich hochreguliert war. Die Expression von eNOS war nach Rauch-Exposition im WT tendenziell und im Knockout signifikant im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle heraufreguliert. Rac2 zeigte ausschließlich zum Rauch-exponierten WT, jedoch nicht zum Knockout, einen signifikanten Unterschied.

Zusammenfassend lies sich feststellen, dass die Kontrolltiere des gp91^{phox}-Knockouts keinen exklusiven Unterschied in der Expression der NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen im Vergleich zu den WT-Tieren bzw. der Rauch-exponierten Knockouts aufzeigte, der eine Beteiligung dieser Moleküle am Ausbleiben der RHHT erklären könnte.

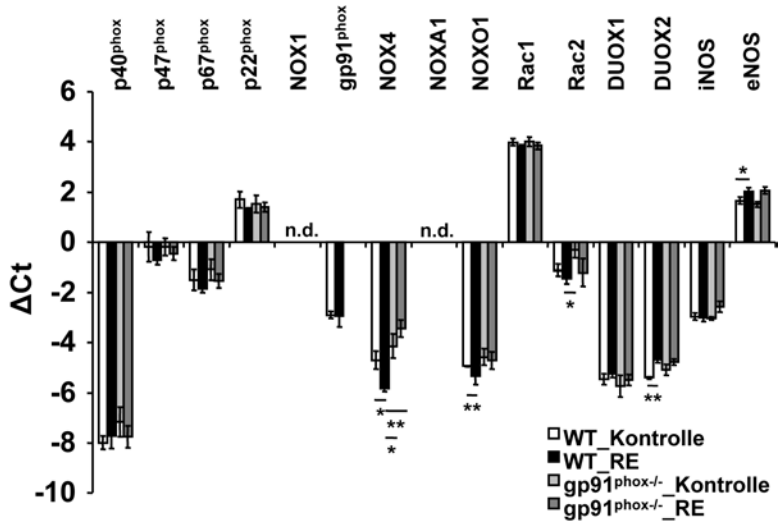


Abbildung 26: NADPH-Oxidasen- und NO-Synthasen-Expression im rechten Ventrikel von WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition
Genexpressionen aus murinem Homogenat des rechten Ventrikels von Kontroll- und Rauch-exponierten Tieren. Expressionen normalisiert zu PBGD, n=3, n.d. = nicht detektierbar, signifikant, wenn * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$).

3.10.2 Co-Lokalisation von iNOS und NOXA1/NOXO1/gp91^{phox}

Falls sich iNOS und die NADPH-Oxidasen in ihren Funktionen beeinflussen, was durch die Gegenregulationen nach Knockout bzw. Inhibition (siehe **3.7** und **3.10.1**) einer Komponente der Fall zu sein scheint, sollten sie räumlich in relativer Nähe stehen. Zu diesem Zweck wurde eine Co-Lokalisation mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Abbildung 28 zeigt, dass iNOS mit den NADPH-Oxidasen a) gp91^{phox}, b) NOXA1 und c) NOXO1 co-lokalisiert ist, vor allem in Gefäßen und Bronchien und besonders deutlich nach Rauch-Exposition zu sehen. Die Co-Lokalisation von iNOS mit NOXA1 bzw. NOXO1 konnte ebenfalls in den gp91^{phox}-Knockout-Mäusen beobachtet werden.

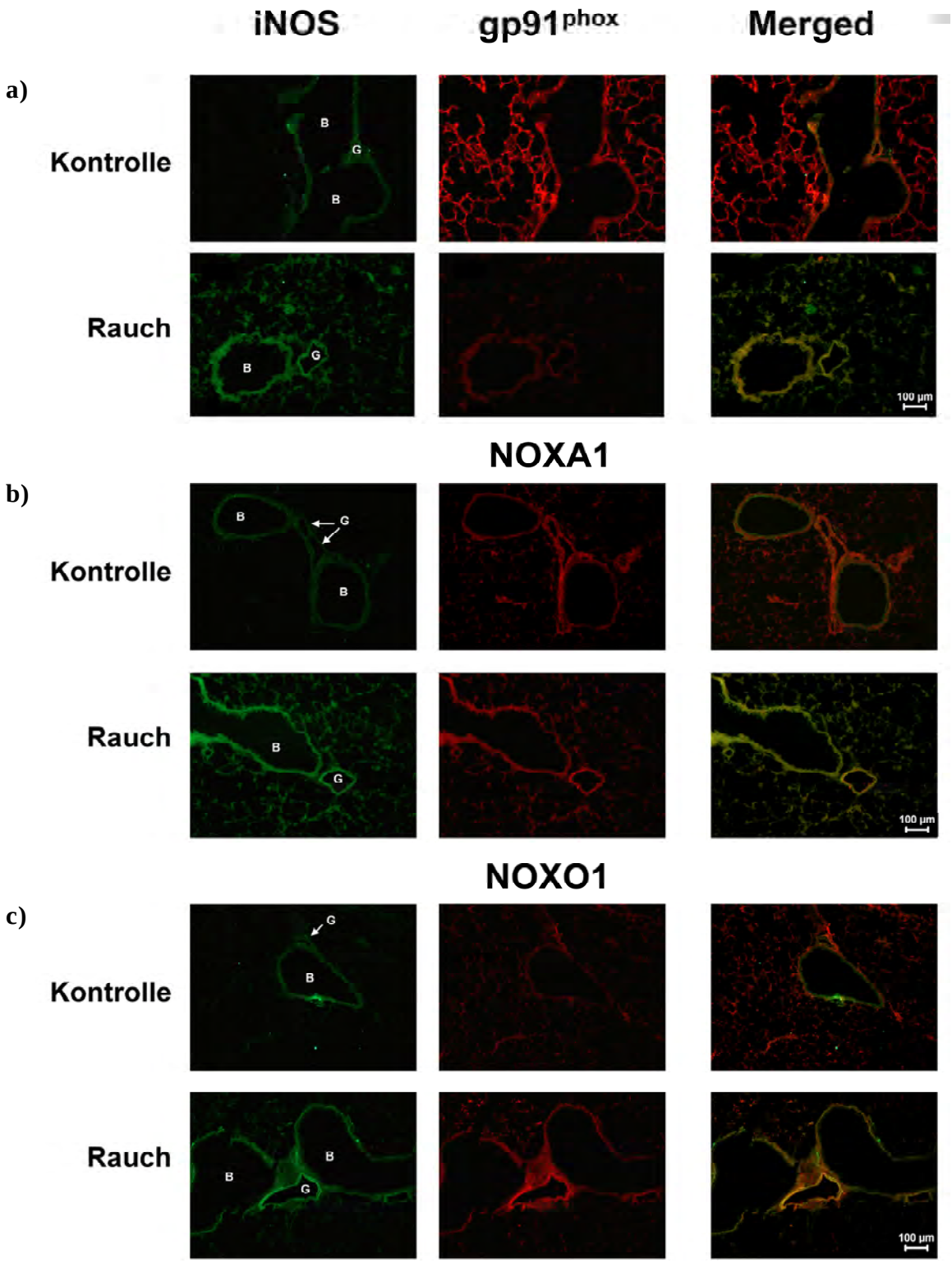


Abbildung 28: Co-Lokalisierung von iNOS und gp91^{phox}, NOXA1, NOXO1 in Lungen von WT-Mäusen vor und nach Rauchexposition

Immunfluoreszenz-Färbungen an Kryo-Schnitten von Lungen nicht- bzw. 8 Monate Rauch-exponierter Mäuse, um Effekt der Rauchexposition auf die jeweilige Protein-Expression und Co-Lokalisierung von iNOS und a) gp91^{phox}, b) NOXA1 und c) NOXO1 zu zeigen; B = Bronchus, G = Gefäß.

3.10.3 Untersuchung des MAPK-Signalwegs in WT und gp91$^{phox-/-}$

Pathway-Analysen aus den Microarray-Experimenten zeigten, dass eine Vielzahl von Signalwegen durch die Rauchexposition im Verlauf der Emphysementwicklung signifikant beeinflusst wurde. Vor allem *Pathways*, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, wie etwa der MAPK-Signalweg, wurde durch die Rauchexposition in dessen Aktivität verändert. Zu diesem Zweck wurde dieser Signalweg in WT und gp91$^{phox-/-}$ näher betrachtet.

Densitometrische Auswertungen von Expressionen phosphorylisierter Proteine werden in der Regel durch Normalisierung der ermittelten Werte mit denen des unphosphorylisierten Proteins vorgenommen. Wenn aber Regulationen schon auf unphosphorylisierter Ebene von Statten gehen, wie bei ERK und JNK, ist es sinnvoll, zusätzlich auch die Normalisierung gegen das Referenzprotein (β-Aktin) durchzuführen, um Vergleiche über die tatsächlichen Mengen phosphorylierter Proteine ziehen zu können.

Es zeigte sich, dass es durch Rauchexposition im Wildtyp zur Phosphorylierung von ERK1/2 kam. Weiterhin war zu beobachten, dass ebenfalls mehr Phosphorylierung in den Knockout-Mäusen stattfand, als in der Kontrolle des Wildtyps, wobei die Rauch-exponierten Individuen vermehrt p-ERK zeigten. Ergänzend war festzustellen, dass die Kontrollen, sowohl in WT- als auch Knockout-Mäuse weniger ERK2 aufwiesen als die Rauch-exponierten Gruppen (**Abb. 29**).

JNK schien nach Rauchexposition im WT nicht beeinflusst worden zu sein. Bemerkenswert war, dass die nicht-phosphorylierte Form von JNK (JNK2) selbst in den gp91^{phox}-Knockout-Mäusen stärker exprimiert wurde, was sich letztlich in einer erhöhten Menge an p-JNK im Vergleich zum WT äußerte, besonders in der Kontroll-Gruppe des Knockouts (**Abb. 30**).

Die Untersuchung von p38^{MAPK} ergab, dass sowohl in den Rauch-exponierten WT-Mäusen als auch den beiden Gruppen der gp91$^{phox-/-}$-Mäuse weniger Phosphorylierung von p38^{MAPK} stattfand, als in den Kontrolltieren des WTs (**Abb. 31**).

Abbildung 32 zeigt, dass Cyclin D1 nach Rauchexposition in WT und Knockout erhöhte Proteinexpressionen aufwies. Dies war ebenfalls in den Kontrollen des Knockouts der Fall.

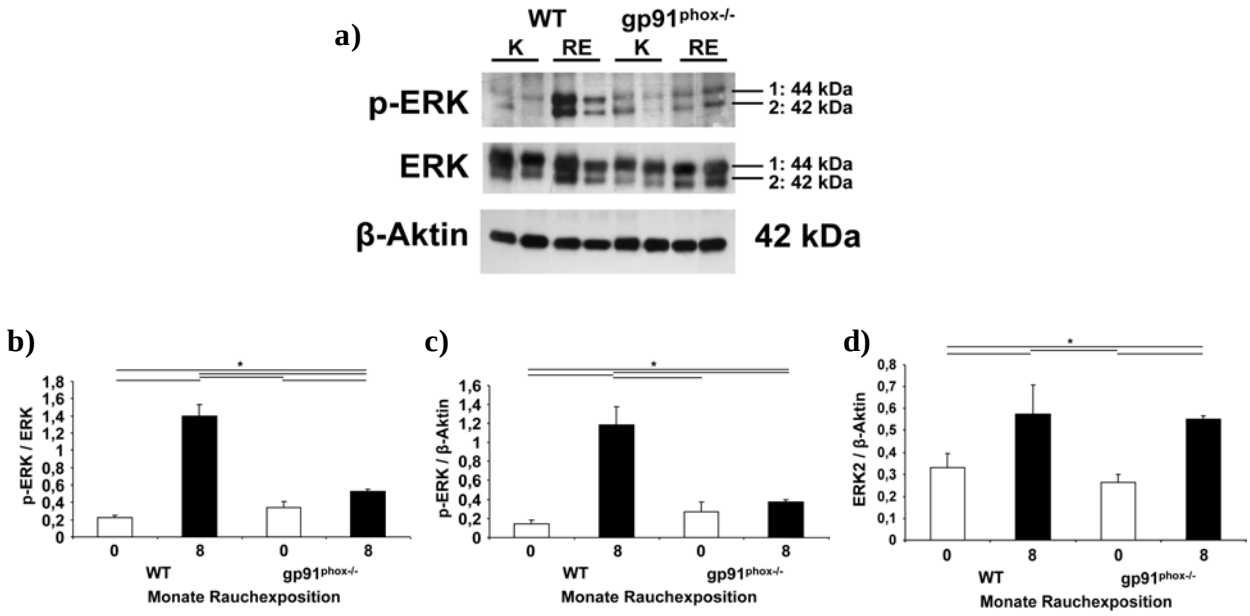


Abbildung 29: ERK1/2-Analyse in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition
Proteinexpressions-Analyse von ERK1/2 und der aktivierten, phophorylierten Form p-ERK1/2 via Western Blot. a) repräsentativer Blot. Densitometrische Auswertung von b) p-ERK zu ERK, c) p-ERK zu β-Aktin und d) ERK2 zu β-Aktin, * = signifikant ($p<0,05$), n=4.

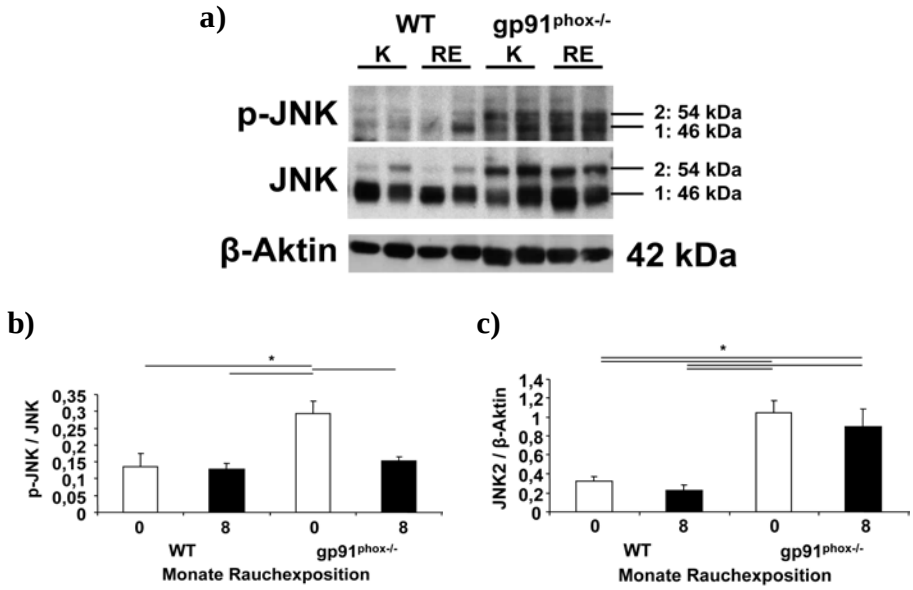


Abbildung 30: JNK-Analyse in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition
Proteinexpressions-Analyse von JNK1/2 und der aktivierten, phophorylierten Form p-JNK1/2 via Western Blot. a) repräsentativer Blot. Densitometrische Auswertung von b) p-JNK zu JNK und c) JNK2 zu β-Aktin, * = signifikant ($p<0,05$), n=4.

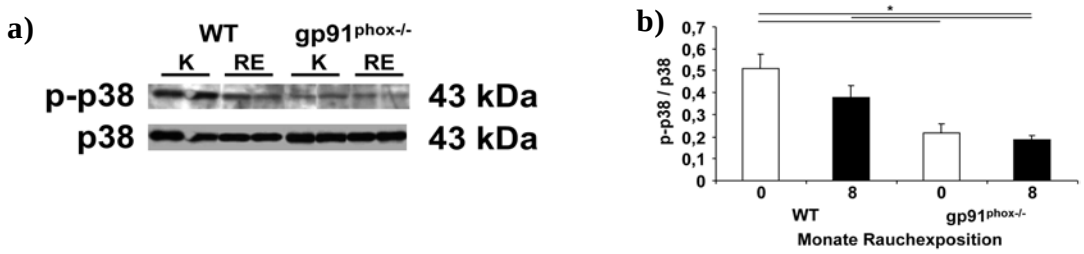


Abbildung 31: p38^{MAPK}-Analyse in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition
Proteinexpressions-Analyse von p38^{MAPK} und der aktivierten, phophorylierten Form p-p38^{MAPK} via Western Blot. a) repräsentativer Blot. b) densitometrische Auswertung von p-p38 zu p38. Normalisierung hier von der phosphorylisierten Form zur unphosphorylierten.* = signifikant ($p<0,05$), n=4.

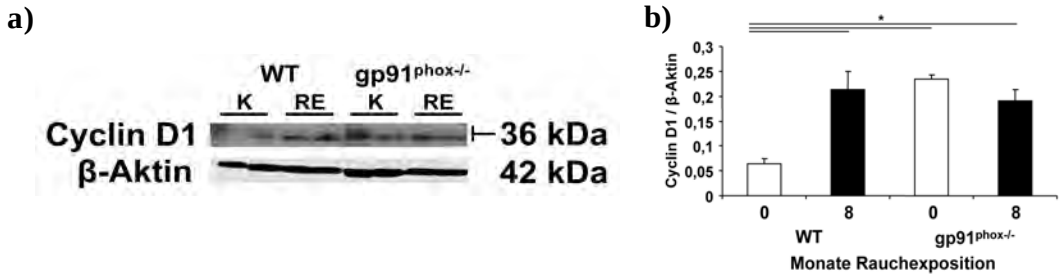


Abbildung 32: Cyclin D1-Analyse in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition
Proteinexpressions-Analyse von Cyclin D1 via Western Blot. a) repräsentativer Blot. b) densitometrische Auswertung der Cyclin D1-Expression. Normalisierung zu β-Aktin.* = signifikant ($p<0,05$), n=4.

3.10.4 Expression von Nitrotyrosin in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen

Da vorangegangene Versuche gezeigt haben, dass verstärkt iNOS nach Rauchexposition im WT- und in gp91$^{phox-/-}$-Mäusen sowohl mit und ohne Zigarettenrauch-Applikation gebildet wurde, wurde nun Nitrotyrosin als Produkt erhöhter NO-Produktion durch iNOS untersucht.

Zu diesem Zweck wurden immunhistochemische Färbungen an Paraffin-Schnitten der genannten Individuen durchgeführt.

Nitrotyrosin konnte vermehrt in den Gefäßen und alveolären Septen von Rauch-exponierten WT-Mäusen (**Abb. 33a**) und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen mit und ohne Rauchexposition (**Abb. 33b**) im Vergleich zu den jeweiligen nicht-exponierten Kontrollen nachgewiesen werden.

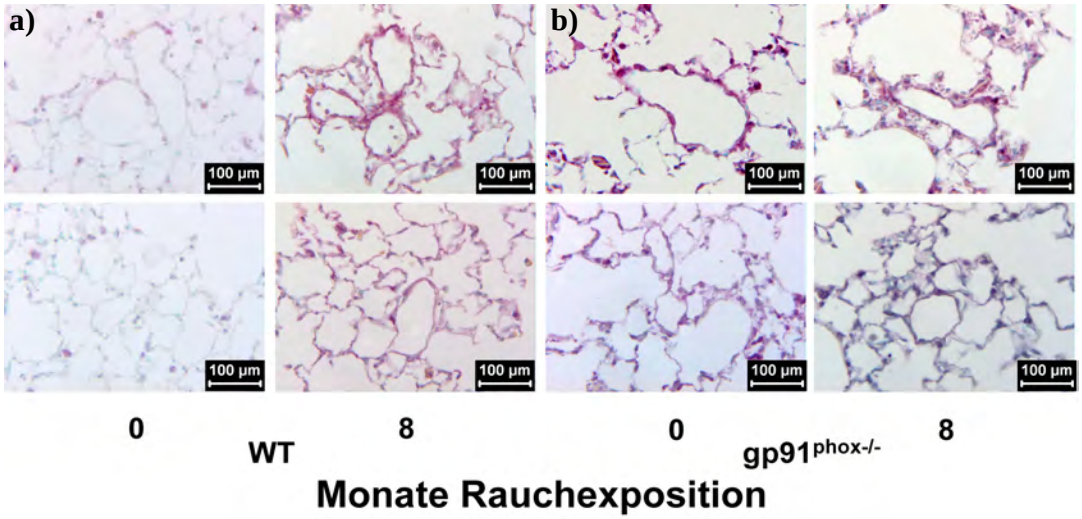


Abbildung 33: Nitrotyrosin-Lokalisierung und -Expression in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen aufgrund von Rauchexposition bzw. gp91^{phox}-Deletion
Repräsentative Bilder immunhistologischer Färbungen an Mauslungen von a) WT- und b) gp91$^{phox-/-}$-Tieren; die spezifische Färbung von Nitrotyrosin erscheint aufgrund des verwendeten Substrats rötlich, je n=6.

3.10.5 Proliferation in WT und gp91$^{phox-/-}$ reflektiert durch Expression von PCNA

Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs kann zu unterschiedlichen biologischen Prozessen, wie etwa Proliferation, beitragen. Da in Rauch-exponierten WT- und in den gp91^{phox}-Knockout-Mäusen festgestellt wurde, dass es zu vaskulären Verengungen durch erhöhte Anzahl an glatten Muskelzellen kam, lag eine verstärkte Proliferationsaktivität in diesen Individuen nahe. Deshalb wurden immunhistochemische Färbungen mit dem Proliferationsmarker PCNA durchgeführt.

Wie aus **Abbildung 34** zu entnehmen, zeigten die o.g. Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen mehr PCNA-positive Zellen, vor allem in den Gefäßen und in Regionen, wo es zu Zellansammlungen kam.

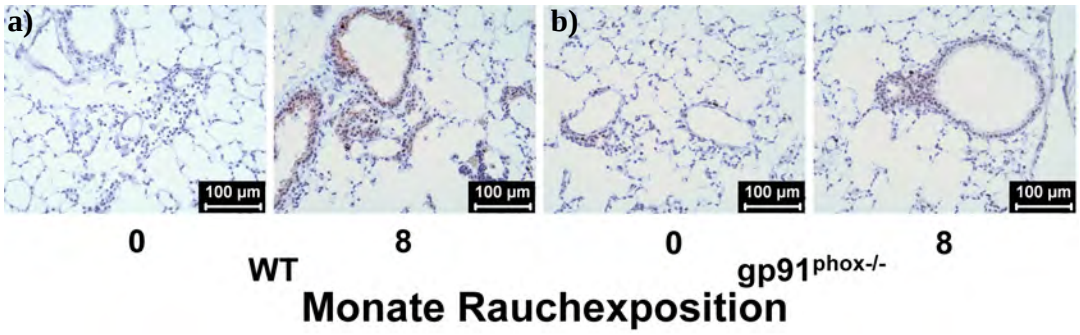


Abbildung 34: Lokalisierung und -Expression des Proliferationsmarkers PCNA in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen aufgrund von Rauchexposition bzw. gp91^{phox}-Deletion
Repräsentative Bilder immunhistologischer Färbungen an Mauslungen von a) WT- und b) gp91$^{phox-/-}$-Tieren; die spezifische Färbung von PCNA erscheint aufgrund des verwendeten Substrats braun, je n=6.

3.10.6 MMP12-Vorkommen in WT und gp91$^{phox-/-}$

In WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen konnte gezeigt werden, dass es zur alveolären Destruktion kommt (**3.5.1**). Die Matrixmetalloproteinase 12 (MMP12) ist ein Enzym, das in der Lage ist, alveoläre Strukturen proteolytisch zu spalten. Deshalb wurde in diesem Versuch die Expression dieses Enzyms via quantitativer Real-Time PCR überprüft.

Die mRNA von MMP12 war im Vergleich zu den nicht-exponierten Kontrollen sowohl in den Rauch-exponierten WT- als auch in beiden Gruppen der gp91$^{phox-/-}$-Mäusen im Lungenhomogenat verstärkt nachweisbar. Die Expressionslevel in den Knockout-Tieren waren darüber hinaus wesentlich höher als in den Rauch-exponierten Wildtypen (**Abb. 35**).

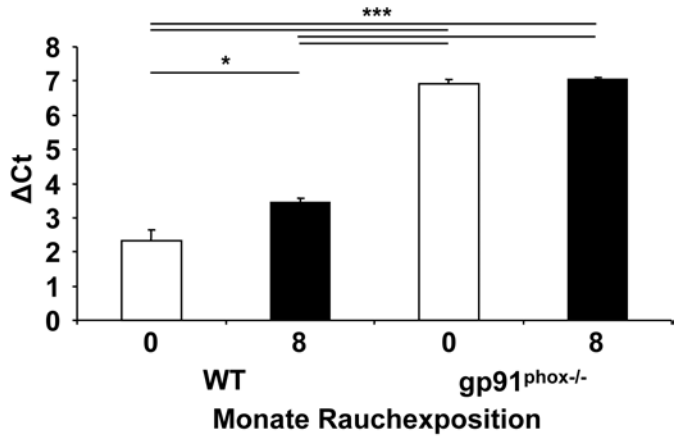


Abbildung 35: MMP-12-mRNA-Expression in WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition bzw. Deletion von gp91^{phox}
Genexpressions-Analyse via RT-PCR aus murinem Lungenhomogenat von Kontroll- und Rauch-exponierten Tieren. Expressionen normalisiert zu PBGD, n=3, signifikant, wenn * ($p<0,05$), *** ($p<0,001$).

4 Diskussion

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine „Volkskrankheit“ und eine der wesentlichen Todesursachen weltweit. Die Fallzahl ist weiterhin steigend. Bisher sind nur Symptom-lindernde Therapieformen verfügbar. Eine kurative Behandlung dieser ernsten Erkrankung ist bisher nicht möglich. Um neue Therapieansätze zu identifizieren, müssen die molekularen Mechanismen der Pathogenese der COPD tiefgründiger erforscht und aufgedeckt werden. Es existieren mit steigender Tendenz Beweise dafür, dass oxidativer Stress ein wichtiges Merkmal bei COPD darstellt[84-86]. Es gibt Hinweise darauf, dass NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Persistierung kardio-vaskulärer Erkrankungen spielen könnten. Jedoch fehlen bisher detaillierte Untersuchungen dieser Moleküle im Zusammenhang mit COPD. NADPH-Oxidasen sind die Haupt-ROS-Quelle in mononukleären und granulozytären Leukozyten und sind involviert in die Immunabwehr[344]. ROS können zu pulmonalem oxidativen Stress führen und sind an diversen Krankheitsbildern, u.a. COPD und Asthma, beteiligt[345]. Andererseits sind ROS wichtige *second messenger* in einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie zellulärem *Signalling*, Zellproliferation und Apoptose[346]. Sie können entscheidend für Immunabwehr bei mikrobiellen Infektionen sein[344;347]. Es wurde gezeigt, dass Zigarettenrauch die endotheliale Superoxid-Produktion NADPH-Oxidasen-vermittelt induziert[348;349] und zu Lungeninflammation und –schädigung führen kann. Die Rolle von NADPH-Oxidasen *in vivo* bei Zigarettenrauch-induzierter pulmonaler Entzündung und Gewebsschädigung ist bisher weitgehend unbekannt. Leukozyten, isoliert aus COPD-Patienten, generieren erhöhte Mengen an Superoxid[350;351], assoziiert mit erhöhten systemischen Niveaus an inflammatorischen Mediatoren[352;353].

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, aufzuzeigen, ob NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen *in vivo* bei der Entwicklung von COPD eine entscheidende Rolle spielen könnten und *per se* Regulationen durch Zigarettenrauch-Applikation unterworfen sind.

Mit Hilfe des verwendeten Zigarettenrauch-induzierten Emphysem-Mausmodells konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Untereinheiten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (akut, subchronisch, chronisch) diverse Regulationen in verschiedenen Kompartimenten der Lunge aufwiesen. Auf Seite der NADPH-Oxidasen schienen der Aktivator NOXA1 und Organisator NOXO1 und bezüglich der NO-Synthasen iNOS eine außerordentliche Stellung in der Pathogenese einzunehmen. NOXA1 war besonders in relativ frühen Zeitpunkten der COPD-Entwicklung akuter (2 Wochen) und subchronischer (3 Monate) Rauchapplikation verstärkt in

Gesamtlunge, BALF und pulmonalen Gefäßen exprimiert. NOXO1 hingegen zeigte eine permanente Hochregulation in allen untersuchten Kompartimenten. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die induzierbare NO-Synthase zwar nicht in Lungenhomogenat von WT-Mäusen, jedoch speziell in pulmonalen Gefäßen erhöhte Expressionen aufwies. Die drei genannten Moleküle waren darüber hinaus in gp91$^{phox-/-}$-Mäusen, die Emphysem mit und ohne Rauchexposition bildeten, deutlich überexprimiert. Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, gestützt durch parallele Untersuchungen und diverser Veröffentlichungen kann geschlossen werden, dass NADPH-Oxidasen, besonders NOXA1 und NOXO1, wahrscheinlich in Verbindung mit NOX1, und iNOS bedeutend für die Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung sind. Diese und andere Schlussfolgerungen werden im folgenden Text näher erörtert.

4.1 Chronische Tabakrauch-Exposition und Deletion von gp91^{phox} führen zu strukturellen und funktionalen Veränderungen in der Mauslunge

Die strukturellen und funktionalen Veränderungen als Konsequenz der chronischen Zigarettenrauch-Applikation wurden im Mausmodell umfassend charakterisiert. Rauchexpositionsmodelle, vergleichbar mit dem Modell, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, wurden in vorangegangenen Studien bereits im Hinblick darauf, dass Zigarettenrauch die Hauptursache für COPD ist, genutzt[334;354;355]. Ein anderer wichtiger *Trigger* für COPD stellt die Luftverschmutzung dar, die wahrscheinlich auch die Tatsache erklärt, dass das globale Vorkommen der Erkrankung trotz abnehmendem Zigarettenkonsum stetig angestiegen ist[31;356]. Das Langzeit-Rauchexpositions-Mausmodell bietet die Möglichkeit, sequenzielle Struktur- und Funktionsänderungen der Alveolen und der pulmonalen Gefäße zu untersuchen. Die Quantifizierbarkeit des durch Rauchexposition induzierten Lungenemphysems durch Erfassung des *Mean Linear Intercepts* (MLI), des Luftraums und der Septendicke wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt[355;357;358]. Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung des Lungenemphysems im verwendeten Mausmodell sich mit vorherigen Berichten deckt, in denen Mäuse Zigarettenrauch ausgesetzt wurden[357;358]. Eine 8-monatige Rauchexposition führte zur Entwicklung von Lungenemphysem, sowohl in WT- als auch in gp91$^{phox-/-}$-Mäusen und ebenfalls in gp91$^{phox-/-}$-Kontrolltieren. Ein Grund könnte die Abnahme von antioxidativer Kapazität, reflektiert durch Veränderungen oxidierter Glutathione, Ascorbinsäure, Protein-Thiolen und

Prostaglandin (PGF-2α) in bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit sein. Weiterhin könnte die herabgesetzte Antitrypsin- und die Zunahme der Metalloelastasen-Aktivität der Neutrophilen und Makrophagen (MME, MMP-12) als auch der Anstieg an Desmosin (Marker für Elastin-Abbau) und Hydroxyprolin (Marker für Kollagen-Abbau) in BALF zur Degradation von Bindegewebe in Folge des Rauchs geführt haben[359;360]. Entzündungsprozesse, vermittelt durch Einwanderung von Entzündungszellen und der darauf folgenden Sekretion von Mediatoren können zu erhöhten oxidativen und nitrosativen Stress führen, der seinerseits die Degradation der Lungenmatrix zur Folge hat[334;361]. Vermehrte Entzündung bei COPD wurde mehrfach schon berichtet und konnte in der eigenen Arbeit durch Zählung von Makrophagen aus BALF und Heraufregulationen inflammatorischer Gene in den Microarray-Experimenten sowohl nach 3- als auch nach 8-monatiger Rauchexposition bestätigt werden. Es ist bekannt, dass die inflammatorische Kaskade nach Aktivierung von Makrophagen und Epithelzellen durch Zigarettenrauch initiiert wird, wobei es zur Ausschüttung von Chemo- und Zytokinen kommt, wodurch verschiedene Monozyten, Neutrophile, T- und B-Lymphozyten hin zum pulmonalen Blutkreislauf und dem Lungenparenchym rekrutiert werden. Diese chemotaktischen Mediatoren, Proteasen und Oxidantien induzieren strukturelle Veränderungen durch Degradation von Bindegewebe. Chronische Applikation des Stimulus Zigarettenrauch führt wahrscheinlich zur Destruktion des Lungenparenchyms, dem Verlust an Alveolen und Gefäßen und zum Ausdünnen der septalen Wände, wodurch schließlich Lungenemphysem entsteht.

Das Aufkommen von spontanem Emphysem in den Kontrolltieren von $gp91^{phox-/-}$ könnte durch eine Hyperinflammation nicht nur nach Rauchgabe, sondern schon durch den Knockout bedingt sein[362]. Da dieses Phänomen in $gp91^{phox-/-}$- und $p47^{phox-/-}$-Mäusen auftrat, postulierten Yao *et al.*, dass die NADPH-Oxidasen scheinbar eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Lungenintegrität spielen[362]. Beide Stämme hatten erhöhte MPO-Aktivität, wodurch wahrscheinlich die erhöhte Neutrophil-Infiltration bedingt war. Eine weitere mögliche Erklärung für die erhöhte Inflammation in diesen Mäusen könnte die Akkumulation eingeschlossener Partikel sein, die nicht phagozytiert werden können und/oder verringerte Apoptose inflammatorischer Zellen[363;364]. Tatsächlich gibt es Anhaltspunkte, dass die apoptotische *Clearance* in Lungen von COPD-Patienten beeinträchtigt ist und dass die Makrophagen dieser Lungen einen Defekt in der Erkennung und Phagozytierung apoptotischer Zellen aufweisen[365;366]. Weiterhin könnte die erhöhte Migration entzündlicher Zellen ins Lungengewebe $gp91^{phox}$-defizienter Mäuse Quelle höherer Zyto- und Chemokinausschüttung sein, was wiederum periphere Monozyten und

Neutrophile mit und ohne Rauchexposition anlockt[358;367]. Die Ablation von gp91^{phox} führte nach Rauchexposition zu verstärkter zytoplasmatischer Degradation von IκBα, wodurch mehr NFκB aktiv war[362]. Es wurde gezeigt, dass mehrere Phosphorylierungsstellen für die Aktivierung der NF-κB RelA/p65-Untereinheit existieren[368;369]. Die Phosphorylierung von Ser^{276} und Ser^{536} war in Nuklearextrakt nach Rauchexposition in WT- und generell in p47$^{phox-/-}$- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen erhöht[362]. Vorangegangene Studien demonstrierten, dass Ser^{276} für die Assoziation mit CBP und der NFκB-Transkriptionsaktivität notwendig ist [370;371]. Obwohl die gp91$^{phox-/-}$-Mäuse weniger ROS bilden, scheint die Suszeptibilität zu pro-inflammatorischen Effekten/Mediatoren erhöht zu sein, wodurch es zur Emphysembildung kommt[362].
Toll-like-Rezeptoren (TLR) wurden mit einer Vielzahl Lungen-assoziierter Immunantworten und Pathologien in Verbindung gebracht[372]. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Neutralisierung von TLR4 durch einen komplementären Antikörper signifikant die Zigarettenrauch-vermittelte Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren in humanen Makrophagen unterbindet[373]. Zigarettenrauch-Applikation erhöhte die pulmonale TLR4-Expression in WT-Mäusen und die Deletion des Proteins schützte die Mäuse vor Tabakrauch-induzierter Inflammation[374;375]. P47$^{phox-/-}$- und gp91$^{phox-/-}$-Mäuse hatten erhöhte Mengen an TLR4 in Lungen und peritonealen Makrophagen nach Rauchgabe[362]. Es wurde suggeriert, dass TLR4 ein Sensor für Zigarettenrauchkomponenten, wie Oxidantien und Aldehyde, darstellt, um nachfolgend entzündliches NF-κB-*Signalling* auszulösen.

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen der pulmonalen Struktur ebenfalls von Änderungen funktionaler Parameter begleitet, wie etwa erhöhte Lungen-*Compliance* und Atemzugvolumen und erniedrigtem Atemwegswiderstand. Es wurde bereits gezeigt, dass der Verlust an Gewebeelastizität auf den Abbau von elastischen Fasern mit Degradation der extrazellulären Matrix im Lungenparenchym basiert, so dass die Lunge nach Ausdehnung während der Inspiration in der darauf folgenden Exspiration nicht mehr völlig in ihre Ausgangslage zurückkehren kann[24;376]. Der Abbau von Matrixbestandteilen und der Verlust an alveolärer Oberfläche reduzieren die elastische Beweglichkeit und die Fähigkeit, In- und Exspirationen in äquivalentem Maße durchzuführen, was ein typisches Charakteristikum von Emphysem darstellt. Zerstörte Alveolarwände und vergrößerter Luftraum können die Vitalkapazität erhöhen, was den Anstieg des Tidalvolumens erklärt, der im Mausmodell nach Rauchexposition bzw. durch gp91^{phox}-Ablation in dieser Arbeit experimentell ermittelt wurde. Interessanterweise wurde dabei

der Atemwegswiderstand im Mausmodell mit Abnahme charakterisiert[334], wohin gegen COPD-Patienten einen erhöhten Atemwegswiderstand aufweisen. Diese Diskrepanz kann jedoch durch Unterschiede der Luftwegsanatomie bei Mäusen in Kombination mit deutlich geringerer end- und exspiratorischer Schließung der terminalen Atemwege erklärt werden[24;376]. Darüber hinaus repräsentiert das hier verwendete Modell eher die Lungenemphysem-, jedoch nicht die obstruktive Atemwegskomponente der COPD.

4.1.1 Beteiligung von MMP-12 bei der Emphysementwicklung in WT und gp91^{phox}-KO

Tatsächlich wurde in dieser Arbeit eine erhöhte Expression von MMP-12 in Rauch-exponierten WT- und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen, als auch in gp91$^{phox-/-}$-Kontrolltieren festgestellt. Dabei wurde MMP-12 durch Rauchexposition, aber noch in größerem Maße durch die Deletion von gp91^{phox} induziert. Das Enzym war in den Lungen der KO-Tiere mit und ohne Rauchapplikation selbst im Vergleich zu den Rauch-exponierten Wildtypen in einem solchen Maße erhöht, dass es nahe liegt, dass dieses Enzym eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des emphysematösen Phänotyps spielen könnte.

MMP-12 degradiert Elastin und wird von Alveolar-Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet[377]. Es wurde in Sputum, BAL, Bronchialbiopsien[378;379] und peripherem Lungengewebe von Patienten mit ausgeprägtem Emphysem nachgewiesen[380]. Patienten mit COPD, u.a. verursacht durch Zigarettenrauch, zeigten höhere Expressionslevel von MMP-2, -9 und -12 in Makrophagen als Kontroll-Patienten[381]. Zigarettenrauch-Extrakt oder ein Zytokinmix (TNF-α und INF-γ) induzierte MMP-12-mRNA in HBEC[382;383]. MMP-12-Expression war assoziiert mit H_2O_2-Produktion und dabei abhängig von NADPH-Oxidasen, p67^{phox} und NOXA1[382]. IL-1β induzierte die MMP12-Expression via Aktivierung von JNK und PI3K[384]. IL-1β-vermittelte Expression von MMP-9 und -12 wurde ebenfalls in IL-1β-überexprimierenden Mäusen demonstriert[385]. Es gibt vermehrt Indizien dafür, dass MMP-12 an der Zigarettenrauch-induzierten Emphysembildung beteiligt ist[386]. Chronische Zigarettenrauch-Inhalation endete in erhöhter MMP-12-Expression in Lunge und BAL[377]. Makrophagen wurden wahrscheinlich durch MMP12-vermittelte Elastin-Fragmente angelockt, da MMP-12-KO-Mäuse keine Akkumulation von Alveolarmakrophagen aufwiesen[387]. MMP-12 ist speziell in die Zigarettenrauch-induzierte Inflammation involviert, da keine Unterschiede in der Neutrophilen-Anzahl zwischen WT- und MMP-12-defizienten Mäusen nach LPS-Gabe beobachtet werden konnte. TIMP3$^{-/-}$-Mäuse

entwickelten spontane alveoläre Vergrößerung[388-390]. Diese Mäuse waren charakterisiert durch reduziertes Kollagen und Fibronektin, fragmentiertem Kollagen im peribronchiolären Raum und Disorganisation der Kollagen-Fibrillen in den Alveolarwänden ohne Veränderungen der MMP-2, -7, -8, -9 und -12 aufzuweisen, wodurch eine Verschiebung des MMP / TIMP-Verhältnisses[391;392] in Richtung der MMPs resultierte, finalisiert in Destruktion der extrazellulären Lungenmatrix[356].

4.2 Andauernde Rauchexposition führt zu pulmonaler Hypertonie und Rechtsherzhypertrophie in Wildtyp und gp91^{phox}-Knockout, nicht jedoch in gp91^{phox}-Kontrollmäusen

Chronische Applikation von Tabakrauch führte zur Vergrößerung des rechten Ventrikels in Relation zum linken Ventrikel plus Septum und zur Steigerung des RVSPs. Dabei ist zu konstatieren, dass sich in der Tat die absolute Masse des rechten Ventrikels, jedoch nicht des linken Ventrikels plus Septum verändert hat, resultierend in der Erhöhung der Ratio RV/LV+Septum. Obwohl der RVSP in den Kontrolltieren (ohne Rauchapplikation) des Knockouts im Vergleich zu den WT-Kontrollen erhöht war, kam es nicht zur Ausprägung einer Rechtsherzhypertrophie. Dies scheint zu indizieren, dass die Vergrößerung des rechten Ventrikels nicht bzw. nicht nur durch Erhöhung des RVSPs bedingt ist, sondern die Induktion einem Zigarettenrauch-spezifischen Mechanismus unterliegt, der einen unmittelbaren Effekt auf den rechten Ventrikel hat. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass gezeigt werden konnte, dass gp91^{phox} kritisch für die Entwicklung von Herz-Hypertrophie als Antwort auf Angiotensin II[322] und Aldosteron[393], jedoch nicht essentiell bei Hypertrophie, induziert durch Erhöhung des pulmonalen Drucks[322], ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass NOX2 an Herz-*Remodeling* gefolgt von Myokardinfarkt[394;395], beteiligt ist. Darüber hinaus waren Kardiomyozyten-Hypertrophie, Apoptose, interstitielle Fibrose und kardiale Dysfunktion deutlich in p47$^{phox-/-}$-[394] und gp91$^{phox-/-}$-Mäusen[395] reduziert. NOX2-Ablation reduzierte systemische Hypertension[396;397] und verhinderte Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie[398].

Außerdem ist der pulmonale Blutstrom mit erhöhtem pulmonal-arteriellem Druck aufgrund von Gefäß-Distensibilität und der Unfähigkeit, ungenutzte Gefäßteile zu rekrutieren, verbunden[399-401], was sich in erhöhtem rechtsventrikulären, systolischen Druck bei Rauchern widerspiegelt. Da Superoxid rasch den Vasodilator NO neutralisieren kann, induziert gp91^{phox} wahrscheinlich Kontraktion. Dies wird dadurch gestützt, dass die gp91^{phox}-Expression invers mit der

Endothelium-abhängigen Relaxation in isolierter Aorta[402;403] korreliert. Weiterhin inhibiert die Deletion von NOX2 die PKC-vermittelte Aortenkontraktion[404], invertiert die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation der Zerebralarterie[405] und verstärkt die Kontraktion dieser Arterie bei Männern nach Angiotensin II-Gabe[406]. Es wurde schon mehrfach ein kausaler Zusammenhang zwischen NOX2 und Hypertension beobachtet[407;408]. Eine Hypertension wurde durch Überexpression von NOX2 in endothelialen KO-Mäusen verstärkt[409].

In Anbetracht vaskulärer Erkrankungen schienen mehrere NADPH-Oxidasen zur Pathophysiologie beizutragen. NOX1 und NOX2 scheinen dabei eine Rolle bei Hypertonie zu spielen[396-398;410;411], da sie direkten Einfluss auf den Blutdruck und Endorgan-Schädigung oder *Remodeling* haben[410;412;413].

Es nicht verwunderlich, dass die Deletion von NOX2 zwar einige Konsequenzen, wie Hyperinflammation, spontane Emphysembildung und Erhöhung des RVSPs hatte, jedoch nicht für alle in dem verwendeten Rauchmodell beobachteten Veränderungen allein verantwortlich sein kann. Es ist wichtig zu betrachten, dass NOX-Enzyme verschiedener Gewebe zu einer Erkrankung beitragen können. Bei Hypertonie scheinen NADPH-Oxidasen von Gehirn, Gefäßen, Herz und Niere in koordinierter Manier zusammen zu arbeiten[414-417]. Bei Atheriosklerose werden Zytokine NOX2-abhängig in den Gefäßwänden sekretiert, die dann NOX1 und NOX2 in VSMCs, Endothelzellen und Fibroblasten der Adventitia innervieren[418-421]. Zusammen genommen sprechen die genannten Beobachtungen dieser und anderer Studien dafür, dass die Rechtsherzhypertrophie, die sich lediglich nach chronischer Rauchapplikation entwickelte, relativ unabhängig von der Deletion von NOX2 zu sein scheint.

Der Abfall des SAP bei den Rauch-exponierten Tieren von WT und Knockout fand bei den Knockouts ohne Rauchexpositon nicht statt. Der Abfall des SAP beruhte wahrscheinlich auf Vasodilatation in den systemischen Arterien infolge der Rauchapplikation. Da die Kontrollen des Knockouts zusätzlich auch keine Rechtsherzhypertrophie zeigten, schien der Gen-Knockout von $gp91^{phox}$ lediglich Effekte auf die Lunge zu haben, da alle Messungen, die nicht Lungen-spezifisch waren, bei den Kontrolltieren von $gp91^{phox-/-}$ keine Veränderungen zum vergleichbaren Wildtyp aufwiesen. Exklusiv die Rauchexposition verursachte bei den KO-Mäusen Veränderungen im Herz und in systemischen Arterien. Frühere Studien haben auch gezeigt, dass aktive und passive Rauchexposition von Koronar- und systemischen Arterien zu endothelialer Beeinträchtigung führen kann[7;422-424].

4.3 Vaskuläre Veränderungen aufgrund von Rauchexposition und/oder Deletion von gp91^{phox}

Die Untersuchung der Vaskularisierung pulmonaler Gefäße ergab, dass diese durch Rauchexpositon in WT und gp91^{phox}-KO deutlich stärker muskularisiert und die Lumina reduziert waren. Dies konnte ebenfalls bei den Kontrollen des Knockouts ohne Rauchexposition festgestellt werden, jedoch nur bei kleineren Gefäßen zwischen 20 und 70 µm. Größere Gefäße (70-150 µm) zeigten im Vergleich zu den WT-Kontrollen nur noch Tendenzen, dass sie stärker muskularisiert und im Lumen verringert waren. Gefäße >150 µm schienen durch den KO nicht beeinträchtigt gewesen zu sein. Die Muskularisierung von Gefäßen >70 µm basierte scheinbar ausschließlich auf die Rauchexposition.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass NOX2 eine Rolle bei der Angiogenese, assoziiert mit VEGF-induzierter Proliferation und Migration spielt[425;426]. In ähnlicher Weise ist die post-ischämische Neovaskularisierung durch NOX2 beeinflusst[427]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass VSMCs zwei Wochen Rauch-exponierter Tiere erhöhte Expression von gp91^{phox} und NOXO1 aufwiesen, wodurch ein pro-proliferativer Effekt vermittelt worden sein könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass NOX1, NOX2 und NOX4 nach vaskulärer Schädigung verändert sein können, wobei NOX1 und -2 proliferativen Effekt auf VSMCs und Endothelzellen haben, wohin gegen NOX4 zur Redifferenzierung der glatten Muskelzellen beiträgen kann[407]. In VSMCs wird NOX1 durch Wachstumsfaktoren und vasoaktive Agenzien durch Aktivierung eines speziellen Promoters hochreguliert[428]. Dieser Promoter ist verantwortlich für die Hochregulation von NOX1 durch PDGF, Prostaglandin-2α, EGFR-Transaktivierung und PI13K, ATF-1, MEF2B oder ERK1/2 und Jun-B[208;212;429;430]. NOX1-Überexpression erhöht Serum-induzierte Proliferation und PDGF-induzierte Migration in VSMCs[431]. Im Gegensatz dazu inhibiert die NOX1-Deletion sowohl die VSMC-Proliferation, induziert durch Serum[407], Thyroid-Hormon[432] oder PDGF[431], als auch die PDGF- oder FGF-induzierte Migration[431;433]. NOX1 scheint die vaskuläre Inflammation durch multiple Mechanismen zu vermitteln[212;434-437].

Entgegen der Literatur, dass NOX1 in VSMCs exprimiert wird[241], konnte NOX1 in diesen Zellen nicht eindeutig per Real-Time PCR detektiert werden. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die NOX1-Expression der verwendeten prä-kapillären glatten Muskelzellen während der Kultivierung so weit herabgesetzt wurde, dass es nicht mehr detektierbar war oder dass diese Zellen junger, für kurze Zeit Rauch-exponierter Tiere generell zu geringe Mengen an NOX1

exprimierten, als dass sie mit der verwendeten Methode nachgewiesen werden konnten. Es ist jedoch davon auszugehen, dass, gestützt von der Literatur, NOX1 nichtsdestotrotz in den Langzeit-Rauch-exponierten Mäusen von WT und gp91$^{phox-/-}$ in VSMCs exprimiert wurde. Dies wird ebenfalls dadurch bestärkt, dass NOXO1, ein bekannter Aktivator von NOX1, in den untersuchten Zellen nach Rauchexposition hochreguliert wurde, um, wahrscheinlich u.a. NOX1 zu aktivieren.

Eine Hypothese besagt, dass das Überleben von Endothelzellen der Lunge, u.a. auch alveoläre, septale Kapillarzellen, von VEGF abhängig ist[438]. Apoptose von Endothelzellen, das zum Verlust von Kapillaren führt, könnte vielleicht ein zentraler Mechanismus in Patienten mit Emphysem und Muskelverlust darstellen[439]. Tang *et al.*[440] demonstrierten, dass ein Skelettmuskel-spezifischer VEGF-KO in Mäusen Endothelzell-Apoptose und Verlust an Kapillaren verursacht. Diese Beobachtungen stützen das Konzept des Verlusts von Kapillaren via Endothelzell-Apoptose in Emphysem-Tiermodellen[439]. Mehrere Studien in Mäusen[441;442] und Ratten zeigten, dass chronischer Zigarettenrauch und Administration eines VEGF-Rezeptor-Blockers[443;444] zu Lungenzell-Apoptose und signifikanter Luftraumvergrößerung führte.
Bisher wurde postuliert, dass die pulmonal-vaskuläre Veränderungen durch alveoläre Hypoxie, Gefäßverlust und erhöhtem intrathorakalen Druck in Verbindung mit Lungenemphysem getrieben werden[445]. Weiterhin wird ein direkter Einfluss von Zigarettenrauch auf die pulmonalen Gefäße vorgeschlagen[400;445;446]. In dieser Arbeit konnte hingegen beobachtet werden, dass es nach Rauchexposition zu einer Verschiebung der Ratio Alveolen / Gefäße in Richtung Alveolen kam, was einen Verlust an Gefäßen reflektiert, der der Alveolardestruktion vorausgeht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der gp91^{phox}-KO an sich schon zum selben Effekt wie im Wildtyp nach Rauchexposition geführt hat. Ein additiver Verlust an Gefäßen schien durch die Rauchexposition der KO-Tiere von Statten gegangen zu sein. Wahrscheinlich liegt ein Grund dafür in der unmittelbaren Nähe der alveolären und vaskulären Strukturen, so dass ein direkter Effekt von inhalierten noxischen Substanzen auf die pulmonalen Widerstandsgefäße stattgefunden haben könnte[447]. Die Zunahme an inflammatorischen Zellen in der Adventitia pulmonal-muskulärer Arterien führt zu verstärkter Entzündung vermittelt durch aktivierte T-Lymphozyten, vorwiegend CD8^{+}-T-Zellen, wodurch die Endothel-abhängige Gefäßrelaxation beeinflusst wird und es zur Verdickung der Intima kommt. Die erhöhte CD8^{+}-T-Zell-Infiltration pulmonaler Arterien bei Rauchern ohne Atemwegsobstruktion unterstützt die Hypothese, dass ein

inflammatorischer Mechanismus aufgrund von Zigarettenrauchen zur Entwicklung struktureller und funktionaler Veränderungen der pulmonalen Durchblutung in frühen Phasen der COPD beiträgt[400].

4.4 Heraufregulationen von NOXA1 und vor allem von NOXO1 scheinen auf Seite der NADPH-Oxidasen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der COPD zu spielen.

NOXA1 und NOXO1 sind bekanntermaßen zytosolische Untereinheiten der NADPH-Oxidasen, die vor allem mit NOX1 interagieren und $p67^{phox}$ bzw. $p47^{phox}$ als Aktivator- bzw. Organisator ersetzen. Von $p67^{phox}$ und $p47^{phox}$ ist bekannt, dass sie durch Phosphorylierung, z.B. mit Hilfe von PMA, stimulierbar sind und darauf folgend membrangebundene NADPH-Oxidasen aktivieren, wodurch mehr ROS gebildet wird. NOXA1 und NOXO1 scheinen hingegen in Verbindung mit NOX1 konstitutiv aktiv zu sein ohne die Notwendigkeit der Aktivierung durch Phosphorylierung. Eine Stimulierung mit PMA verstärkte jedoch die Superoxid-Bildung[263]. IFNγ-1 und TNFα können die Superoxid-Generierung nach PMA-Stimulation unter Hochregulierung von NOX1 und NOXO1 erhöhen[448]. Eine Behandlung von mukosalen Zellen von Meerschweinchen mit LPS führte zur Heraufregulierung von NOX1 und NOXO1, wodurch die ROS-Produktion 10fach gesteigert wurde[449]. Somit könnte NOXO1 ein später limitierender Faktor für die NOX1-abhängige Superoxid-Produktion sein. So induzierte TNFα die Superoxid-Produktion in intestinalen Epithelzellen in Abhängigkeit von NOXO1, da die $p22^{phox}$- und NOXA1-Expressionen nicht verändert wurden und die erhöhte Produktion nach Knockdown von NOXO1 geblockt wurde[448].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NOXA1 im Verlauf der COPD-Entwicklung sowohl in Lungenhomogenat, als auch in pulmonalen Gefäßen in relativ frühen Zeitpunkten (2 Wochen, 3 Monate) hochreguliert war, was eine Rolle in frühem Stadium der sich entwickelnden Erkrankung suggeriert. Zum Zeitpunkt ausgeprägter COPD (8 Monate) mit Emphysem und pulmonaler Hypertonie scheint die Innervierung von NOXA1 im Mausmodell weit weniger wichtig, reflektiert durch mRNA- und Proteinmengen, die denen der Kontrollen entsprachen. Ein weiteres Indiz über die relative Wichtigkeit von NOXA1 bei der untersuchten Erkrankung ist die Tatsache, dass es sowohl in COPD-Patienten (auf Proteinebene), als auch in $gp91^{phox-/-}$-Mäusen,

die auch ohne Rauchexposition Emphysem entwickelten, hochreguliert war, auch noch nach 8-monatiger Rauchexposition im Vergleich zu den WT-Kontrollen.
Interessanterweise war eine Erhöhung von NOXA1 (2 Wochen, 3 Monate in Lungenhomogenat und 3 Monate in Alveolar-Septum) im Wildtyp meist mit einer Inhibierung bzw. ausbleibenden Regulation von DUOX verbunden. Zum Zeitpunkt, in dem NOXA1 nicht mehr hochreguliert bzw. nicht reguliert war (8 Monate Lunge und 8 Monate Septum), war DUOX verstärkt exprimiert worden. Eine Begründung dafür könnte sein, dass NOXA1 eher ein inhibitorischer Adapter bzw. negativer Regulator als ein Aktivator für DUOX darstellt[345]. NOXA1 ist in primären Lungenepithelzellen membrangebunden und assoziiert mit DUOX via Src-Homologie-Domäne 3 (SH3), wodurch die basale und stimulierte H_2O_2-Produktion durch DUOX gesenkt wird. Nach Stimulation produziert DUOX mit Ca^{2+} H_2O_2 in Atemwegszellen. Nach Ca^{2+}-Influx dissoziiert NOXA1 von der Membran zum Zytosol. Dabei scheint der Ca^{2+}-Einstrom, nicht aber die ROS-Produktion, für die NOXA1-Translokation notwendig, wodurch indiziert wurde, dass die Dissoziation in einem frühen Schritt der DUOX-Aktivierung vorkam.

Spekulativ scheint NOXO1 eine besondere Rolle in diversen Kompartimenten der Lunge nach Applikation von Zigarettenrauch zu zukommen, da dieses zu allen untersuchten Zeitpunkten im Mausmodell im Lungenhomogenat, den alveolären Septen, Gefäßen und scheinbar auch Bronchien verstärkt exprimiert wurde. Es zeigte Hochregulationen sowohl nach Initiierung durch akute Rauchexposition (2 Wochen), als auch nach 8 Monaten, als die Krankheit bereits ausgeprägt war. Weiterhin war auffällig, dass NOXO1 nach Knockout von $gp91^{phox}$ noch wesentlich stärker als im WT nach Rauchexposition gebildet wurde, sogar in den Kontrollen ohne Rauchexposition. Eine Beteiligung von NOXA1 und NOXO1 bei humaner COPD spiegelt auch die Überexpression des funktionalen Proteins bei COPD-Patienten GOLD-IV wider. Da NOXA1 und NOXO1 im WT und in den KO-Tieren meist vermehrt gebildet wurden, wenn auch die NOX1-Expression erhöht wurde, scheint der Grund damit in der Aktivierung von NOX1 zur Bildung von ROS zu liegen. Dies wird dadurch gestützt, dass nach dem KO von $gp91^{phox}$ und dem Verlust der Haupt-ROS-Quelle eine kompensatorische Hochregulation von NOX1, NOXA1 und NOXO1 stattfand, um als neue ROS-Quelle zu dienen. So konnten Brandes *et al.* 2004 zeigen, dass diese drei Komponenten in der Lage sind, ROS zu bilden. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass in COPD-Patienten $gp91^{phox}$ reduziert exprimiert wurde, wohingegen NOXA1 und NOXO1 auf Proteinebene vermehrt gebildet wurden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund unzureichender Antikörper die mögliche Hochregulation von NOX1 auf Proteinebene nicht gezeigt werden, sondern lediglich indirekt durch die Hochregulationen der Interaktionspartner NOXA1 und NOXO1, die bekannter Weise hauptsächlich mit NOX1 interagieren. Aber selbst wenn sich in zukünftigen Arbeiten herausstellen sollte, dass NOX1 auf Proteinebene nicht reguliert sein sollte, würde eine verstärkte Aktivierung via Erhöhung der Expression des Aktivators und Organisators zu einer gesteigerten Aktivität von NOX1 führen.
Die Abnahme von NOXA1 und NOXO1 und damit geringerer Aktivierung von NOX1 in Rauch-exponierten gp91$^{phox-/-}$-Mäusen im Vergleich zu den nicht-exponierten Tieren kann durch die Tatsache erklärt werden, dass Zigarettenrauch selbst hohe Konzentrationen an ROS beinhaltet[29] und so eine geringere ROS-Menge via NADPH-Oxidasen benötigt wird und somit in ihrer Aktivität heruntergefahren werden.

Ueyama *et al.*[312] publizierten kürzlich, dass die Aktivatoren und besonders die Organisatoren NOXA1 und NOXO1 nicht nur kontrollieren, wie viel Superoxid, sondern auch wo die reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen gebildet werden. NOXO1 beinhaltet keine autoinhibitorische Region (AIR) und benötigt somit keine Aktivierung und scheint konstitutiv mit p22^{phox} zu interagieren, um NOX1 zu regulieren[450]. Die PX-Domäne dient bei p47^{phox} als autoinhibitorischer Regulator[451] und interagiert mit Phosphoinositiden (PI)[452], um die NOX2-katalysierte $O_2^{\cdot-}$-Produktion zu steigern[263]. Die PX-Domäne ist wahrscheinlich in die Proteinstabilisierung von p47^{phox} involviert[453]. Im Falle von NOXO1 scheint die PX-Domäne für die Lokalisation verschiedener Splicevarianten verantwortlich zu sein[311;454]. NOXO1β ist exklusiv in der Plasmamembran lokalisiert, wohin gegen NOXO1γ im Nukleus, NOXO1α und δ innerhalb von Vesikeln und zytoplasmatischen Aggregaten zu finden sind. Die Membran-lokalisierte Variante β scheint in Verbindung mit NOX1 die höchste Superoxid-Generierung anzuregen, gefolgt von NOXO1γ, α und δ. NOXO1-Splicevarianten und p47^{phox} könnten zu unterschiedlichen subzellulären Verteilungen von NOX1, 2 und 4 beitragen[210;325;455]. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass NOXO1 in PASMCs in Zytoplasma, Nukleus und vor allem in der Kernmembran lokalisiert war. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um die verschiedenen Splicevarianten α bzw. δ, γ und β. Obwohl die verschiedenen Varianten wahrscheinlich für die ROS-Produktion in Verbindung mit NOX1 verantwortlich waren, könnte die Kernlokalisation von NOXO1γ auf einen NOX-unabhängigen Mechanismus hindeuten, wie Opitz *et al.*

postulierten[209]. Aus eigenen Untersuchungen wurde ersichtlich, dass NOXA1 ebenfalls und ausschließlich als Vesikel-ähnliche Strukturen im Nukleus von PASMCs exprimiert wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass diese beiden Untereinheiten, die nach Rauchexposition scheinbar in PASMCs vermehrt gebildet wurden, nicht nur an der ROS-Produktion beteiligt sind, sondern auch Effekte auf die Transkriptionsaktivitäten im Kern haben könnten. Die Vermutung bedingt jedoch weitere Untersuchungen. Das Homologon zu NOXO1, $p47^{phox}$, war ausschließlich im Zytoplasma und vor allem rund um den Kern in der Membran von PASMCs lokalisiert, wo es wahrscheinlich mit membrangebundenen NADPH-Oxidasen, wie etwa NOX2, interagierte. Die induzierbare NO-Synthase konnte ebenfalls im Zytoplasma und Kernmembran-nahe lokalisiert werden, wo es ggf. NO produzierte, das aufgrund der Nähe zu den ROS der NADPH-Oxidasen reagieren und Peroxynitrit und schließlich Nitrotyrosin gebildet haben könnte. NOX1 bildet ein Heterodimer mit $p22^{phox}$ und wird deutlich durch die Bindung von NOXA1 und NOXO1 aktiviert[304;310;456]. Rac1 unterstützt die NOX1-Aktivität[313;314;457]. NOXO1 kann, wenn überexprimiert, selbst in Abwesenheit von NOXA1 oder $p67^{phox}$ zur Steigerung der NOX3-abhängigen ROS-Produktion führen[458;459], so dass gemutmaßt wurde, dass der Organisator unter bestimmten Umständen als Aktivator fungieren kann. NOXO1-defiziente Mäuse, ausgelöst durch eine spontane Mutation[459], zeigten schwere Gleichgewichtsstörungen ähnlich den NOX3-defizienten Mäusen[460]. Letztendlich könnte nicht nur eine exzessive NOX-Aktivierung, sondern auch durch pathologische Lokalisierung zur Ausbildung einer Erkrankung führen.

4.5 Heraufregulationen von iNOS, NOXA1 und NOXO1 und deren Zusammenspiel durch Co-Lokalisation führen zu erhöhter Nitrolysierung von Proteinen durch Nitrotyrosin.

Den Befunden dieser Arbeit ist zu entnehmen, dass die NADPH-Oxidasen NOXA1 und NOXO1 und die NO-Synthase iNOS im Verlauf der COPD-Entwicklung verstärkt exprimiert wurden. Darüber hinaus zeigten die Untersuchungen, dass diese Moleküle co-lokalisiert waren und somit ein Zusammenspiel prinzipiell möglich war. Von den NADPH-Oxidasen ist bekannt, dass sie primär ROS-Bildner[197] sind und vor allem dass Superoxid-Radikal[263;304;308;310] bilden. Dieses kann mit von iNOS-gebildetem NO zu Peroxynitrit[88] reagieren, das zur Bildung von Nitrotyrosin[89] führen kann. Nitrotyrosin ist in der Lage, Proteine zu nitrolysieren und so deren Funktion und Aktivität zu ändern. Es kann Apoptose, einem wichtigen Mechanismus für die

Entwicklung eines Emphysems, induzieren[461]. Unter diesem Gesichtspunkt wurde im Jahre 2005 der kausale Zusammenhang von RNS und Lungenemphysem durch Aktivierung von Proteasen aufgezeigt[462]. Die Hochregulation von iNOS, Nitrotyrosin und Peroxynitrit kann Nitrosylierung von Proteinen verursachen, wodurch die Proteinfunktionen verändert werden[361;463]. Weiterhin können RNS zu Lipidoxidationen führen, wodurch DNA geschädigt und mitochondriale Respiration inhibiert werden kann, was Apoptose und Nekrose zur Folge haben und aktiv die Bildung von Emphysem bedingen kann[31;463]. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) könnten ebenso durch RNS in Lungenepithelzellen Signaltransduktionskaskaden vermitteln, die zu Zelltod führen[464]. Darüber hinaus besitzt Peroxynitrit die Fähigkeit, pro-emphysematisch zu wirken, indem es oberflächenaktives *Surfactant* inaktiviert und Protein-Phosphorylierungen durch Proteinkinasen inhibiert, was wiederum mit Signaltransduktionsmechanismen interferiert[361;463].

Durch die Herunterregulation von eNOS in den Gefäßen bei gleichzeitig verstärkter iNOS-Expression kann spekuliert werden, dass eine Entkopplung von eNOS zum oxidativen Stress via Superoxid-Produktion bei COPD beitragen könnte, während iNOS verantwortlich für erhöhte NO-Produktion ist. Tatsächlich verursachte Zigarettenrauch eine irreversible Inhibition der eNOS-Aktivität in pulmonal-arteriellen Endothelzellen durch Verminderung von eNOS auf mRNA- und Proteinebene[7;400;465]. Diese Schlussfolgerungen decken sich mit veröffentlichten Befunden, die entkoppeltes eNOS mit oxidativem Stress assoziieren und Nitrotyrosin-Bildung bei COPD beschreiben[7;463;466-469]. Diese Interpretationen werden durch Ergebnisse dieser Arbeit gestützt, indem gezeigt werden konnte, dass iNOS und Nitrotyrosin sowohl in WT- als auch $gp91^{phox-/-}$-Mäusen erhöht waren und eNOS dabei deutlich vor allem in Gefäßen des Wildtyps und Lungenhomogenat des Knockouts reduziert war. Die Hochregulationen nach Rauchexposition von NOXA1, NOXO1 und iNOS im WT und generell nach Deletion von $gp91^{phox}$ und dem nachweislich vermehrten Vorkommen von Nitrotyrosin in Lungen dieser Individuen lassen den Schluss zu, dass das Superoxid, wahrscheinlich gebildet durch NOX1, zumindest im $gp91^{phox}$-KO, und durch Entkopplung von eNOS, mit NO von iNOS interagiert, zusammen vermehrt Nitrotyrosin bilden und somit u.a. zu der Emphysembildung beigetragen haben könnten. Die Humandaten dieser Arbeiten bestätigten die Beobachtungen des Mausmodells. Die Co-Lokalisation von iNOS und NOXA1 bzw. NOXO1 fand besonders in den Gefäßen statt. Aus parallelen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit N. Parajuli (gruppeninterner Kollege, Universität Gießen) ist bekannt, dass die vaskulären Veränderungen

den alveolären vorausgehen und dass dies scheinbar durch die Hochregulation von iNOS getrieben ist. Die Investigationen haben ergeben, dass die Inhibition von iNOS sowohl präventiv, als auch kurativ wirkt und somit die Entwicklung der COPD verhindern bzw. eine ausgeprägte Erkrankung mildern kann. Die vorliegende Arbeit deckte zusätzlich auf, dass eine höhere iNOS-Produktion einhergeht mit einer vermehrten Expression von NOXA1 und vor allem NOXO1, indirekt wahrscheinlich mit erhöhter NOX1-Aktivität. NO als Produkt von iNOS kann als Signalmolekül selbst diverse Signalwege beeinflussen, doch in Kombination mit dem NADPH-Oxidase-vermittelten Superoxid bildet es ein reaktives Produkt, das die Funktion von Proteinen beeinflussen bzw. beeinträchtigen kann. Die größeren Mengen von iNOS, NOXA1 und NOXO1 in Rauch-exponierten WT-Mäusen, in $gp91^{phox}$-KOs und in COPD-Patienten, die räumliche Nähe und die erhöhten Vorkommen an Nitrotyrosin in diesen Individuen lassen die Schlussfolgerung zu, dass diese Moleküle zusammen an der Entstehung von COPD beteiligt sind, mehr als nur hypothetisch erscheinen. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass $iNOS^{-/-}$-Mäuse und L-NIL-behandelte Rauch-exponierte Mäuse weniger Nitrotyrosin aufweisen als die Rauch-exponierten, unbehandelten WT-Mäuse. Aktivierung von iNOS könnte eine wichtige Rolle bezüglich humaner COPD spielen[400]. Die Zunahme an Nitrotyrosin in Lungen von COPD-Patienten unterstützt das Konzept, dass nitrosativer Stress eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von COPD einnehmen könnte[89].

4.6 Rauchexposition und Deletion von $gp91^{phox}$ bedingen Veränderungen des MAPK-Signalwegs

ERK wurde durch die Applikation von Tabakrauch und/oder Deletion von $gp91^{phox}$ vermehrt phosphoryliert und damit aktiviert. Die Phosphorylierung konnte ebenfalls in nicht-exponierten KO-Mäusen beobachtet werden, was den Schluss zulässt, dass die Deletion und/oder Herunterregulation durch Zigarettenrauch von $gp91^{phox}$ zu einer Aktivierung des ERK-Signalwegs führt. Auffallend war die geringere Menge an ERK2 in den Kontrollen der KO-Mäuse, jedoch kann nur spekuliert werden, ob dies tatsächlich einen Unterschied zum Rauch-exponierten Phänotyp der Mutanten führte, so z.B. das Ausbleiben der pulmonalen Hypertonie. Nach Aktivierung von ERK1/2 steigert sich die katalytische Aktivität enorm (170000-250000fach über Basalniveau) und hat zirka 160 potentielle Effektoren im Zytosol und Zellkern, darunter Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, zytoskeletale und Apoptose-assoziierte

Proteine[470], so dass dieses Molekül in diversen Stufen unterschiedlichster Signalwege involviert sein kann. ERK1/2 waren die zuerst charakterisierten Proteine der ERK-Familie[471]. Eine Aktivierung beginnt gewöhnlich an der Plasmamembran durch Rezeptor-Tyrosinkinasen[472]. Eine Weiterleitung geschieht meist über Raf-MEK1/2-ERK[473;474]. Der Effekt der Aktivierung hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab[473;474], jedoch scheint eine andauernde starke Aktivierung mit Seneszenz, Apoptose und Differenzierung verbunden zu sein, wohin gegen kürzere, geringere Stimulierung mit Proliferation korrelieren[475]. In Abhängigkeit des Zelltyps, Rezeptor-Anzahl und anderen Faktoren können aber sowohl transiente, als auch anhaltende ERK-Aktivierung zu Proliferation führen[473;476]. Darüber hinaus kann ERK1/2 an der Zellzyklus-Progression beteiligt sein[476;477]. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Cyclin D1 nach Rauchexposition und/oder Deletion von $gp91^{phox}$ bei gleichzeitiger ERK1/2-Innervierung hochreguliert wurde, was somit ein Hinweis für erhöhte Proliferation darstellt, da ERK1/2 Cyclin D1 durch Stabilisierung von c-Myc Transkriptionsfaktor hochregulieren kann[477]. Dies wurde durch die Untersuchung des Proliferationsmarkers PCNA bestätigt, das nach Rauchexposition im WT und generell mit und ohne Rauchapplikation im KO vermehrt nachweisbar war. Weiterhin vermittelt ERK1/2 die Inhibition anti-proliferativer Gen-Transkription durch einen AP-1-abhängigen Mechanismus während der G_1-Phase[478]. Obwohl meist davon ausgegangen wurde, dass ERK1 und -2 simultan reguliert werden, konnte durch KO-Modelle gezeigt werden, dass sich unter bestimmten Bedingungen unabhängige Funktionen darstellten[479;480]. Dies könnte auch bei Rauchexposition der Fall sein, da in dieser Arbeit beobachtet wurde, dass ERK2, jedoch nicht ERK1 nach Rauchapplikation sowohl im Wildtyp als auch im $gp91^{phox}$-Knockout vermehrt exprimiert wurde.
Arakawa und Kollegen konnten zeigen, dass NOX1 in VSMCs durch Wachstumsfaktoren und vasoreaktiven Agenzien mit Hilfe eines speziellen Promoters hochreguliert wird[428], der es ermöglicht, dass die NOX1-Expression durch PDGF, Prostaglandin-2α, EGFR-Transaktivierung und PI13K, ATF-1, MEF2B oder ERK1/2 und JunB stimuliert wird[208;212;429;430]. Somit könnte die verstärkte NOX1-Aktivität u.a. durch ERK-Aktivierung erklärt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass $p38^{MAPK}$ in COPD-Patienten und durch Rauchapplikation aktiviert wird und zu vermehrter Apoptose bzw. Proliferation führen kann. Jedoch zeigte sich nach 8-monatiger Rauchexposition sowohl im WT- als auch in den KO-Mäusen weniger Phosphorylierung von $p38^{MAPK}$. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass $p38^{MAPK}$ in früheren,

akuten Zeitpunkten eine Rolle spielt, jedoch nicht mehr nach ausgeprägter Erkrankung. Ein weiterer Grund könnte das Indiz, dass NOX2 die Endothelzell-Proliferation durch Stimulation von $p38^{MAPK}$- und Akt vermittelt, sein[481;482]. Demnach könnte durch Herunterregulation bzw. Deletion von NOX2 ($gp91^{phox}$) $p38^{MAPK}$ nicht bzw. weniger aktiviert worden sein. NOX4 wird durch TGF-β innerviert[483], u.a. unter hypoxischen Bedingungen[484]. Untersuchungen von nachgeschalteten Signalwegen ergaben, dass NOX4 $p38^{MAPK}$ zum Ziel hat[485-487]. Da NOX4 im Verlauf der COPD-Entwicklung, insbesondere in den früheren Zeitpunkten (2 Wochen, 3 Monate) im Lungenhomogenat und nach 3 und 8 Monaten tendenziell in alveolären Septen herunterreguliert war, könnte dies zu verringerter Aktivierung von $p38^{MAPK}$ geführt haben. Oft korrelieren mRNA- und Protein-Expression von NOX4 nicht zwangsläufig miteinander[487]. NOX4 soll auch in der Lage sein, den RAS/ERK-Pathway, JNK und Akt zu aktivieren[486;488;489]. Es wäre also möglich, dass NOX4 auf Proteinebene stabilisiert worden ist, obwohl die mRNA-Menge nach Rauchexposition geringer war, so dass es doch innervierenden Effekt auf die MAP-Kinasen gehabt haben könnte. $P38^{MAPK}$ wird, wie JNK, durch Stress, Zytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert[490]. Die JNK-Proteine, wie etwas JIP können auch $p38^{MAPK}$ binden und deren subzelluläre Lokalisation beeinflussen[491].

Die c-Jun N-teriminale Kinase (JNK) wurde in den $gp91^{phox-/-}$-Tieren unsphosphoryliert, besonders JNK2, bereits deutlich mehr gebildet als im Wildtyp, was letztendlich höhere Niveaus an aktiviertem JNK zur Folge hatte. 8-monatige Rauchexposition bewirkte im WT keine Aktivierung von JNK mehr, so dass die erhöhte JNK/p-JNK-Expressionen wahrscheinlich auf den Gen-Knockout zurückzuführen sind. Wie Morris *et al.* zeigten, kommt es in $gp91^{phox}$-defizienten Tieren zu einer persistierenden Hyperinflammation[362] selbst ohne Rauchexposition, so dass vermutet werden kann, dass diese u.a. durch JNK vermittelt wurde. Die Entstehung des Emphysems könnte ebenfalls durch Beteiligung von JNK von Statten gegangen sein, da IL-1β die MMP12-Expression via Aktivierung von JNK und PI3K induzieren kann[384]. Die nachgewiesene Hochregulation von NOXO1 im verwendeten Mausmodell in WT- und den KO-Mäusen könnte darüber hinaus auch durch Beteiligung von JNK bedingt gewesen sein. Die Stimulierung von TNF-R1 durch TNFα resultiert u.a. in Aktivierung von NFκB und JNKs[492]. TNFα phosphoryliert JNK1/2, wodurch c-Jun, c-Fos und AP-1 phosphoryliert werden[448]. Inhibition von JNK konnte die TNFα-vermittelte Induktion von NOXO1 und der damit verbundenen Steigerung der Superoxid-Produktion blocken[448].

JNK und $p38^{MAPK}$ spielen weiterhin eine wichtige Rolle in der Induktion von Apoptose und werden sequenziell für durch spezielle MAPK-Kinasen und MAPK-Kinasen-Kinasen (MAPK3) aktiviert[493]. Es wurde gezeigt, dass Apoptose durch diverse Stressarten, wie etwas ROS und endoplasmatischer Stress, induziert werden kann und teilweise durch die Aktivierung von ASK1-JNK/p38-Pathway vermittelt wird[494-497]. Die JNK-Familie wird durch Stress, Zytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert[490]. Diese Stimuli aktivierten das Signalmolekül KKK-MKK4/7-JNK[490;491;498]. Funktionen von JNK sind u.a. Beeinflussung von Zellmigrations-Aktivität[498-500] und in Abhängigkeit der Dauer der Aktivierung[501] pro- oder anti-apoptotische Aktivität[502]. JNK nimmt auch am Zell-Zyklus via c-Jun-Komponente von AP-1 teil[498;503-505].
Interessanterweise benötigt die ATP-abhängige Apoptose die Aktivierung von $p38^{MAPK}$, jedoch nicht von JNK, wobei die Induktion von Apoptose allerdings durch Millimolare von ATP erreicht wird[506]. NOX2 ist involviert in die ATP-vermittelte ROS-Produktion und -Apoptose, wobei die NOX2-ROS-Generierung ein *Downstream*-Ereignis des $P2X_7$-Rezeptors zu sein scheint, da eine Vorbehandlung mit einem $P2X_7$-Rezeptor-Antagonisten zur Verminderung der ROS-Produktion führen kann. NOX2 und $P2X_7$-Rezeptor sind notwendig für die ATP-induzierte $p38^{MAPK}$-Aktivierung in Makrophagen[506]. Somit könnte die Senkung bzw. Deletion von NOX2 die geringere $p38^{MAPK}$-Aktivierung, die in dieser Arbeit gezeigt wurde, erklären. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bezüglich TNF-Signalling berichtet[507]. NOX1, das in $gp91^{phox-/-}$ hochreguliert war, wird durch TNF aktiviert (TRADD und RIP1) und zwar auf zytoplasmatischer Seite des TNF-Rezeptors, wodurch anhaltend JNK und Nekrose vermittelt wird[506]. Diese Befunde implizieren, dass NADPH-Oxidasen als Signal-Transduktoren fungieren könnten, die ein extrazelluläres Signal in intrazelluläres ROS konvertieren, das ROS-abhängig Antworten, u.a. Zelltod, provozieren. Viele Gruppen berichteten über die wichtige Rolle von JNK bei der Caspase-3-Aktivierung[506].

Ergänzend ist zu sagen, dass sich ERK1/2, JNK und $p38^{MAPK}$ gegenseitig beeinflussen können. $P38^{MAPK}$-α und MKK4/7-JNK-c-Jun-Signalweg inhibieren ERK1/2-Aktivierung und Funktion in Zelllinien[508;509]. Die c-Jun-Transkriptionsaktivität wird für ERK-Inhibition benötigt[509], während JNK ERK1/2 in Primärzellen inhibiert und vielleicht auch $p38^{MAPK}$ [510]. Die Befunde könnten ebenfalls erklären, warum nach 8-monatiger Rauchexposition $p38^{MAPK}$ bei gleichzeitig höherer Aktivität von ERK1/2 und JNK weniger phosphoryliert wurde.

5 Ausblick

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die NADPH-Oxidasen und die NO-Synthasen vor allem iNOS, in der Entwicklung der COPD Regulationen unterworfen sind. Die Heraufregulationen von NOXA1, NOXO1 und damit verbunden die Aktivierung von NOX1 führten wahrscheinlich zu vermehrter ROS-Bildung assoziiert mit oxidativem Stress. Dies wurde wahrscheinlich durch Entkopplung und Herunterregulation von eNOS verstärkt. Die parallel erhöhte NO-Produktion durch vermehrtes iNOS könnte so zu mehr Peroxynitrit und schließlich zu mehr Nitrotyrosin-Bildung führen. Dieses Nitrotyrosin könnte zu Modifikationen von Proteinen und Signalwegen geführt haben, die zur Entwicklung des Emphysems beitrugen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Hochregulationen von NOXA1, NOXO1, NOX1 und iNOS meist mit Herunterregulationen von $gp91^{phox}$ einhergingen. Dieses Verhalten spiegelte sich besonders nach Deletion von $gp91^{phox}$ wider. Diese Ergebnisse suggerieren eine antiproportionale Beziehung zwischen iNOS und $gp91^{phox}$. Weiterhin scheint die NOX1-gebundene NADPH-Oxidase kompensatorische Aufgaben nach Inaktivierung bzw. Deletion von $gp91^{phox}$ zu erfüllen. Diese Spekulationen bedürfen weiterer Untersuchungen. Die konstitutive Hochregulation von NOXO1 nach Rauchexposition hinweg über den gesamten Zeitraum von der Initiierung bis hin zur Ausprägung der COPD suggeriert, dass dieses bisher „nur“ als Organisator-Molekül für NOX1 (und NOX3) postuliertes Protein als ein entscheidender Effektor für die COPD-Entwicklung fungieren könnte. U.a. aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit werden derzeit im Rahmen der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit erstellt wurde, NOXO1-Knockout-Tiere generiert, die sicherlich in zukünftigen Studien neue Erkenntnisse über NOXO1 und dessen Rolle bei COPD bringen werden. Die Charakterisierung von verfügbaren NOX1/$gp91^{phox}$-Doppel-KO-Tieren stellt ebenfalls ein interessantes und vielleicht sehr aussichtsreiches Unterfangen für das Verständnis der Pathogenese von COPD dar.

Obwohl durch die vorliegenden und vorangegangenen Ergebnisse unbestritten eine Rolle der NADPH-Oxidasen bei der Emphysembildung zukommt, scheint das Zusammenspiel mit iNOS kritisch für die Entwicklung des Emphysems zu sein, da wie schon erwähnt, in parallelen Studien mit N. Parajuli (gruppeninterner Kollege, Universität Gießen) gezeigt werden konnte, dass iNOS-KO-Mäuse gegenüber Zigarettenrauch immun zu sein scheinen und vor Emphysementstehung protektiert sind. Weiterhin zeigte eine prophylaktische Applikation eines iNOS-Inhibitors dasselbe Verhalten. Falls künftige Versuche ergeben sollten, dass NOXO1- bzw. NOX1/$gp91^{phox}$-

KO-Tiere ebenfalls vor COPD geschützt sein sollten, wäre mit dieser und der Arbeit von N. Parajuli eine essentielle Schaltstelle für die Pathogenese von COPD identifiziert.

NADPH-Oxidasen modulieren intrazelluläre Signalwege zur Regulation von Zellüberleben, Gefäßkontraktion und -Relaxation[212]. Unter pathologischen Bedingungen tragen sie zu VSMC-Proliferation und -Migration, Angiogenese, Inflammation, Hypertension und medialer Hypertrophie bei[212]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen und essenziellen Funktionen ist es nicht verwunderlich, dass antioxidative Therapien bisher subeffektive Protektion/Behandlung vaskulärer Erkrankungen zeigten. Zukünftige antioxidative Therapien sollten darauf zielen, lediglich ROS zu inhibieren, die für die normale vaskuläre Funktion wichtig sind. Weiterführende Studien sollten sich auf die Identifikation der spezifischen, molekularen Signalwege fokussieren, die durch die verschiedenen NOX-Subtypen affektiert werden. Die Kreierung Gewebe-spezifischer, genetisch modifizierter Tiere würde einen besseren Einblick in die Rollen der NADPH-Oxidasen bezüglich der Physiologie und Erkrankung gewährleisten. Subtyp-spezifische Inhibitoren könnten es ermöglichen, die einzelnen Aufgaben der NADPH-Oxidasen aufzuklären und die oxidative Hypothese vaskulärer Erkrankungen zu be- oder widerlegen.

6 Zusammenfassung

COPD ist die häufigste chronische Erkrankung des Respirationstraktes und Hauptursache für hohe Morbidität und Mortalität weltweit, sowie mittlerweile sozioökonomisch von großer Bedeutung. Bisher ist die Erkrankung nicht heilbar, lediglich Symptom-lindernde Therapieformen sind verfügbar. Um neue Therapieansätze zu identifizieren, müssen die molekularen Mechanismen der Pathogenese der COPD tiefgründiger erforscht und aufgedeckt werden. Es existieren zunehmend Beweise dafür, dass oxidativer Stress ein wichtiges Merkmal bei COPD darstellt. Es gibt Hinweise darauf, dass NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Persistierung kardio-vaskulärer Erkrankungen spielen könnten. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, aufzuzeigen, ob NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen *in vivo* bei der Entwicklung von COPD eine entscheidende Rolle spielen könnten und *per se* Regulationen durch Zigarettenrauch-Applikation unterworfen sind. Diese Arbeit konnte zum ersten Mal die Regulation aller NADPH-Oxidasen durch Selektion von Zeitpunkten akuter, subchronischer und chronischer Rauchapplikation aufzeigen, von der Initiierung bis hin zur Ausprägung der Erkrankung.

Mit Hilfe des verwendeten Zigarettenrauch-induzierten COPD-Mausmodells konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Untereinheiten zu unterschiedlichen Zeitpunkten diversen Regulationen in verschiedenen Kompartimenten der Lunge unterlagen. Auf Seite der NADPH-Oxidasen schienen der Aktivator NOXA1 und Organisator NOXO1 und bezüglich der NO-Synthasen iNOS eine außerordentliche Stellung in der Pathogenese einzunehmen. NOXA1 war besonders in relativ frühen Zeitpunkten der COPD-Entwicklung akuter (2 Wochen) und subchronischer (3 Monate) Rauchapplikation verstärkt in Gesamtlunge und pulmonalen Gefäßen exprimiert worden. NOXO1 hingegen zeigte eine permanente Hochregulation in allen untersuchten Kompartimenten. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die induzierbare NO-Synthase zwar nicht in Lungenhomogenat von WT-Mäusen, jedoch speziell in pulmonalen Gefäßen erhöhte Expressionen aufwies, einhergehend mit Senkung der eNOS-Expression. NOXA1, NOXO1 und iNOS waren darüber hinaus in der Lunge, besonders in pulmonalen Gefäßen co-lokalisiert und in $gp91^{phox-/-}$-Mäusen, die Emphysem mit und ohne Rauchexposition bildeten, deutlich überexprimiert. Diese Überexpressionen gingen einher mit verstärkter Bildung von Nitrotyrosin, das aus Superoxid (vor allem NOX-generiert) und NO (iNOS-generiert) gebildet wird, so dass auf eine Synergie dieser Proteine geschlossen werden kann. Diese Beobachtungen konnten in Lungen von humanen COPD-Patienten bestätigt werden. Weiterhin

führte Rauchexposition bzw. die Deletion von $gp91^{phox}$ zur Aktivierung von MAP-Kinasen, wodurch vermehrt Proliferation und wahrscheinlich auch Apoptose vermittelt wurde. Die Proliferation konnte durch erhöhte Expression von Cyclin D1 und PCNA nachgewiesen werden. Alveoläre und vaskuläre Charakterisierung und Lungenfunktionstests von 8 Monate Rauch-exponierten Wildtyp- und $gp91^{phox-/-}$-Mäusen zeigte, dass Rauchexposition im Wildtyp und in den Knockouts zu Emphysembildung, verstärkter Muskularisierung und gleichzeitigem Verlust pulmonaler Gefäße, pulmonaler Hypertonie, Rechtsherzhypertrophie und Einschränkung der Lungenfunktion führte. Die Kontrolltiere der Knockouts zeigten vergleichbare Veränderungen mit Ausbleiben der Rechtsherzhypertrophie. Dagegen entwickelten sie spontanes Emphysem ohne die Notwendigkeit der Induktion durch Zigarettenrauch. Da Untersuchungen von MMP-12 ergaben, dass dieses sowohl nach Rauchexposition und in verstärktem Maße nach Ablation von $gp91^{phox}$ exprimiert wurde, könnte u.a. MMP-12 für die Emphysementwicklung bei den Rauch-exponierten Tieren und vor allem bei den nicht-exponierten Knockout-Individuen verantwortlich sein. Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, gestützt durch parallele Untersuchungen und diverser Veröffentlichungen kann geschlossen werden, dass NADPH-Oxidasen, besonders NOXA1 und NOXO1, wahrscheinlich in Verbindung mit NOX1, und iNOS eine bedeutende Rolle für die progressive Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung spielen, wodurch sie potentielle *Targets* für die Entwicklung neuer Therapieformen darstellen.

7 Summary

COPD is the most frequent disease of the respiratory tract and a major cause of high morbidity and mortality worldwide. Furthermore, it is of high socioeconomic importance. So far, the disease is not curable, only symptom-alleviative therapies are available. To identify new therapeutical approaches it is necessary to investigate the molecular mechanisms of the pathogenesis of COPD in detail. There is increasing evidence that oxidative stress displays an important characteristic of COPD. There are hints that NADPH oxidases and NO synthases could play an important role for the development and persistence of cardio-pulmonary diseases. The aim of the present study was to show whether NADPH oxidases and NO synthases are critical for the development of COPD *in vivo* and if they are regulated by smoke exposure *per se*. This study shows for the first time the regulation of all NADPH oxidase subunits during time points of acute, subchronic and chronic smoke application, from the initiation up to the occurrence of the disease.

By usage of a tobacco smoke induced COPD mouse model, it could be shown that the different subunits are regulated at different time points in different compartments of the lung. NOXA1 and NOXO1, as NADPH oxidase subunits, and iNOS, as a NO synthase, seemed to have an extraordinary status for the pathogenesis. NOXA1 was specially upregulated in lung homogenate and pulmonary vessels in relative early time points of acute (2 weeks) and subchronic (3 months) smoke exposure during the development of COPD. In contrast, NOXO1 showed a constitutive upregulation in all investigated compartments. Moreover, it could be shown that the inducible NOS did not show increased expression in lung homogenate indeed, however specially in pulmonary vessels accompanied by a decrease of the eNOS expression. Furthermore, NOXA1, NOXO1 and iNOS were co-localized in the lung, especially in pulmonary vessels. They were clearly upregulated in $gp91^{phox-/-}$-mice which developed emphysema with and without smoke exposure. These overexpressions were associated with increased formation of nitrotyrosine which is formed by superoxide (primarily NOX-generated) and NO (iNOS-generated), so that one can conclude a synergy or crosstalk of these proteins. Those observations could be confirmed by lungs from human COPD patients. Additionally, smoke exposure or rather deletion of $gp91^{phox}$ led to activation of MAP kinases mediating more proliferation and probably apoptosis, too. Enhanced proliferation could be demonstrated by increased expression of Cyclin D1 and PCNA. Alveolar and vascular characterization and lung function tests of 8 months smoke-exposed wildtype- and $gp91^{phox-/-}$-mice showed that smoke exposure led to emphysema development,

increased muscularization and simultaneous loss of pulmonary vessels, pulmonary hypertension, right heart hypertrophy and limitation of lung function. Knockout mice without smoke exposure showed comparable changes with absence of right heart hypertrophy. In contrast, they developed spontaneous emphysema without necessity of induction by cigarette smoke. Since investigations of MMP-12 revealed an increased expression after smoke exposure and even more after deletion of $gp91^{phox}$, MMP-12 could be play a potential role in emphysema development in smoke-exposed mice and first of all in non-exposed knockout mice. Taken together, the results of the present work supported by parallel investigations and diverse publications, suggest that NADPH oxidases, especially NOXA1 and NOXO1, probably in connection to NOX1, and iNOS play an important role in the progressive pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease whereby they constitute potential targets for the development of new therapies.

8 Literaturverzeichnis

1. Barnes,P.J. (2000) Chronic obstructive pulmonary disease. N.Engl.J.Med., 343,269-280.

2. Pauwels,R.A., Buist,A.S., Calverley,P.M., Jenkins,C.R., and Hurd,S.S. (2001) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 163,1256-1276.

3. (2004) Chronic obstructive pulmonary disease. National clinical guideline on management of chronic obstructive pulmonary disease in adults in primary and secondary care. Thorax, 59 Suppl 1,1-232.

4. Barnes,P.J., Shapiro,S.D., and Pauwels,R.A. (2003) Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. Eur.Respir.J., 22,672-688.

5. Agusti,A.G. (2005) Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. Proc.Am.Thorac.Soc., 2,367-370.

6. Wood,A.M., Stockley,R.A. (2006) The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. Respir.Res., 7,130.

7. Hogg,J.C. (2004) Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. Lancet, 364,709-721.

8. Fletcher,C.M. (1975) The natural history of chronic bronchitis. Community Health (Bristol.), 7,70-78.

9. Peto,R., Speizer,F.E., Cochrane,A.L., Moore,F., Fletcher,C.M., Tinker,C.M., Higgins,I.T., Gray,R.G., Richards,S.M., Gilliland,J., and Norman-Smith,B. (1983) The relevance in adults of air-flow obstruction, but not of mucus hypersecretion, to mortality from chronic lung disease. Results from 20 years of prospective observation. Am.Rev.Respir.Dis., 128,491-500.

10. Vestbo,J., Prescott,E., and Lange,P. (1996) Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 153,1530-1535.

11. Vestbo,J. (2002) Epidemiological studies in mucus hypersecretion. Novartis.Found.Symp., 248,3-12.

12. Kanner,R.E., Anthonisen,N.R., and Connett,J.E. (2001) Lower respiratory illnesses promote FEV(1) decline in current smokers but not ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease: results from the lung health study. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 164,358-364.

13. Saetta,M., Turato,G., Facchini,F.M., Corbino,L., Lucchini,R.E., Casoni,G., Maestrelli,P., Mapp,C.E., Ciaccia,A., and Fabbri,L.M. (1997) Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 156,1633-1639.

14. Zhu,J., Majumdar,S., Qiu,Y., Ansari,T., Oliva,A., Kips,J.C., Pauwels,R.A., De,R., V, and Jeffery,P.K. (2001) Interleukin-4 and interleukin-5 gene expression and inflammation in the mucus-secreting glands and subepithelial tissue of smokers with chronic bronchitis. Lack of relationship with CD8(+) cells. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 164,2220-2228.

15. Lange,P., Nyboe,J., Appleyard,M., Jensen,G., and Schnohr,P. (1990) Relation of ventilatory impairment and of chronic mucus hypersecretion to mortality from obstructive lung disease and from all causes. Thorax, 45,579-585.

16. Miravitlles,M., Guerrero,T., Mayordomo,C., Sanchez-Agudo,L., Nicolau,F., and Segu,J.L. (2000) Factors associated with increased risk of exacerbation and hospital admission in a cohort of ambulatory COPD patients: a multiple logistic regression analysis. The EOLO Study Group. Respiration, 67,495-501.

17. Prescott,E., Lange,P., and Vestbo,J. (1995) Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonary infection. Eur.Respir.J., 8,1333-1338.

18. Barnes,P.J. (2004) Small airways in COPD. N.Engl.J.Med., 350,2635-2637.

19. Hogg,J.C., Macklem,P.T., and Thurlbeck,W.M. (1968) Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. N.Engl.J.Med., 278,1355-1360.

20. Cosio,M., Ghezzo,H., Hogg,J.C., Corbin,R., Loveland,M., Dosman,J., and Macklem,P.T. (1978) The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. N.Engl.J.Med., 298,1277-1281.

21. Niewoehner,D.E., Kleinerman,J., and Rice,D.B. (1974) Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. N.Engl.J.Med., 291,755-758.

22. Gelb,A.F., Hogg,J.C., Muller,N.L., Schein,M.J., Kuei,J., Tashkin,D.P., Epstein,J.D., Kollin,J., Green,R.H., Zamel,N., Elliott,W.M., and Hadjiaghai,L. (1996) Contribution of emphysema and small airways in COPD. Chest, 109,353-359.

23. Hogg,J.C., Chu,F., Utokaparch,S., Woods,R., Elliott,W.M., Buzatu,L., Cherniack,R.M., Rogers,R.M., Sciurba,F.C., Coxson,H.O., and Pare,P.D. (2004) The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. N.Engl.J.Med., 350,2645-2653.

24. Hogg,J.C., Wright,J.L., Wiggs,B.R., Coxson,H.O., Opazo,S.A., and Pare,P.D. (1994) Lung structure and function in cigarette smokers. Thorax, 49,473-478.

25. Nakano,Y., Muro,S., Sakai,H., Hirai,T., Chin,K., Tsukino,M., Nishimura,K., Itoh,H., Pare,P.D., Hogg,J.C., and Mishima,M. (2000) Computed tomographic measurements of airway dimensions and emphysema in smokers. Correlation with lung function. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 162,1102-1108.

26. Gross,C.P., Anderson,G.F., and Powe,N.R. (1999) The relation between funding by the National Institutes of Health and the burden of disease. N.Engl.J.Med., 340,1881-1887.

27. Fromer,L., Cooper,C.B. (2008) A review of the GOLD guidelines for the diagnosis and treatment of patients with COPD. Int.J.Clin.Pract., 62,1219-1236.

28. Buist,A.S., Vollmer,W.M., and McBurnie,M.A. (2008) Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part I. The burden of obstructive lung disease (BOLD) initiative. Int.J.Tuberc.Lung Dis., 12,703-708.

29. Pryor,W.A., Stone,K. (1993) Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. Ann.N.Y.Acad.Sci., 686,12-27.

30. Chow,C.K. (1993) Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. Ann.N.Y.Acad.Sci., 686,289-298.

31. Mannino,D.M., Buist,A.S. (2007) Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. Lancet, 370,765-773.

32. Curtis,J.L., Freeman,C.M., and Hogg,J.C. (2007) The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. Proc.Am.Thorac.Soc., 4,512-521.

33. Iribarren,C., Tekawa,I.S., Sidney,S., and Friedman,G.D. (1999) Effect of cigar smoking on the risk of cardiovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease, and cancer in men. N.Engl.J.Med., 340,1773-1780.

34. Yin,P., Jiang,C.Q., Cheng,K.K., Lam,T.H., Lam,K.H., Miller,M.R., Zhang,W.S., Thomas,G.N., and Adab,P. (2007) Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study. Lancet, 370,751-757.

35. (1996) Cigarette smoking and health. American Thoracic Society. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 153,861-865.

36. Burrows,B., Knudson,R.J., Cline,M.G., and Lebowitz,M.D. (1977) Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. Am.Rev.Respir.Dis., 115,195-205.

37. Coultas,D.B., Hanis,C.L., Howard,C.A., Skipper,B.J., and Samet,J.M. (1991) Heritability of ventilatory function in smoking and nonsmoking New Mexico Hispanics. Am Rev.Respir.Dis., 144,770-775.

38. Redline,S., Tishler,P.V., Rosner,B., Lewitter,F.I., Vandenburgh,M., Weiss,S.T., and Speizer,F.E. (1989) Genotypic and phenotypic similarities in pulmonary function among family members of adult monozygotic and dizygotic twins. Am.J.Epidemiol., 129,827-836.

39. Lewitter,F.I., Tager,I.B., McGue,M., Tishler,P.V., and Speizer,F.E. (1984) Genetic and environmental determinants of level of pulmonary function. Am.J.Epidemiol., 120,518-530.

40. Kueppers,F., Miller,R.D., Gordon,H., Hepper,N.G., and Offord,K. (1977) Familial prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in a matched pair study. Am.J.Med., 63,336-342.

41. Silverman,E.K., Chapman,H.A., Drazen,J.M., Weiss,S.T., Rosner,B., Campbell,E.J., O'DONNELL,W.J., Reilly,J.J., Ginns,L., Mentzer,S., Wain,J., and Speizer,F.E. (1998) Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 157,1770-1778.

42. Kohnlein,T., Welte,T. (2008) Alpha-1 antitrypsin deficiency: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and treatment. Am.J.Med., 121,3-9.

43. Poller,W., Faber,J.P., Scholz,S., Weidinger,S., Bartholome,K., Olek,K., and Eriksson,S. (1992) Mis-sense mutation of alpha 1-antichymotrypsin gene associated with chronic lung disease. Lancet, 339,1538.

44. Joos,L., He,J.Q., Shepherdson,M.B., Connett,J.E., Anthonisen,N.R., Pare,P.D., and Sandford,A.J. (2002) The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. Hum.Mol.Genet., 11,569-576.

45. Hirano,K., Sakamoto,T., Uchida,Y., Morishima,Y., Masuyama,K., Ishii,Y., Nomura,A., Ohtsuka,M., and Sekizawa,K. (2001) Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. Eur.Respir.J., 18,748-752.

46. Cawston,T., Carrere,S., Catterall,J., Duggleby,R., Elliott,S., Shingleton,B., and Rowan,A. (2001) Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Novartis.Found.Symp., 234,205-218.

47. Russell,R.E., Thorley,A., Culpitt,S.V., Dodd,S., Donnelly,L.E., Demattos,C., Fitzgerald,M., and Barnes,P.J. (2002) Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 283,L867-L873.

48. Russell,R.E., Culpitt,S.V., DeMatos,C., Donnelly,L., Smith,M., Wiggins,J., and Barnes,P.J. (2002) Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., 26,602-609.

49. Huang,S.L., Su,C.H., and Chang,S.C. (1997) Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 156,1436-1439.

50. Smith,C.A., Harrison,D.J. (1997) Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. Lancet, 350,630-633.

51. Sandford,A.J., Silverman,E.K. (2002) Chronic obstructive pulmonary disease. 1: Susceptibility factors for COPD the genotype-environment interaction. Thorax, 57,736-741.

52. Cordell,H.J. (2002) Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. Hum.Mol.Genet., 11,2463-2468.

53. Baierl,A., Bogdan,M., Frommlet,F., and Futschik,A. (2006) On locating multiple interacting quantitative trait loci in intercross designs. Genetics, 173,1693-1703.

54. Trupin,L., Earnest,G., San,P.M., Balmes,J.R., Eisner,M.D., Yelin,E., Katz,P.P., and Blanc,P.D. (2003) The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. Eur.Respir.J., 22,462-469.

55. Torres-Duque,C., Maldonado,D., Perez-Padilla,R., Ezzati,M., and Viegi,G. (2008) Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence. Proc.Am.Thorac.Soc., 5,577-590.

56. Seemungal,T., Harper-Owen,R., Bhowmik,A., Moric,I., Sanderson,G., Message,S., Maccallum,P., Meade,T.W., Jeffries,D.J., Johnston,S.L., and Wedzicha,J.A. (2001) Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 164,1618-1623.

57. Sethi,S., Maloney,J., Grove,L., Wrona,C., and Berenson,C.S. (2006) Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 173,991-998.

58. Hogg,J.C. (2001) Role of latent viral infections in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 164,S71-S75.

59. Retamales,I., Elliott,W.M., Meshi,B., Coxson,H.O., Pare,P.D., Sciurba,F.C., Rogers,R.M., Hayashi,S., and Hogg,J.C. (2001) Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 164,469-473.

60. Higashimoto,Y., Elliott,W.M., Behzad,A.R., Sedgwick,E.G., Takei,T., Hogg,J.C., and Hayashi,S. (2002) Inflammatory mediator mRNA expression by adenovirus E1A-transfected bronchial epithelial cells. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 166,200-207.

61. Barker,D.J., Godfrey,K.M., Fall,C., Osmond,C., Winter,P.D., and Shaheen,S.O. (1991) Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. BMJ, 303,671-675.

62. Barnes,P.J. (2001) New treatments for chronic obstructive pulmonary disease. Curr.Opin.Pharmacol., 1,217-222.

63. de Boer,W.I., van,S.A., Sont,J.K., Sharma,H.S., Stolk,J., Hiemstra,P.S., and van Krieken,J.H. (1998) Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages

and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 158,1951-1957.

64. Takizawa,H., Tanaka,M., Takami,K., Ohtoshi,T., Ito,K., Satoh,M., Okada,Y., Yamasawa,F., Nakahara,K., and Umeda,A. (2001) Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Am.J.Respir.Crit.Care Med., 163,1476-1483.

65. Ihn,H. (2002) Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. Curr.Opin.Rheumatol., 14,681-685.

66. Senior,R.M., Tegner,H., Kuhn,C., Ohlsson,K., Starcher,B.C., and Pierce,J.A. (1977) The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. Am.Rev.Respir.Dis., 116,469-475.

67. Damiano,V.V., Tsang,A., Kucich,U., Abrams,W.R., Rosenbloom,J., Kimbel,P., Fallahnejad,M., and Weinbaum,G. (1986) Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs. J.Clin.Invest, 78,482-493.

68. Janoff,A., Sloan,B., Weinbaum,G., Damiano,V., Sandhaus,R.A., Elias,J., and Kimbel,P. (1977) Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localization of the instilled protease. Am.Rev.Respir.Dis., 115,461-478.

69. Sommerhoff,C.P., Nadel,J.A., Basbaum,C.B., and Caughey,G.H. (1990) Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. J.Clin.Invest, 85,682-689.

70. Witko-Sarsat,V., Halbwachs-Mecarelli,L., Schuster,A., Nusbaum,P., Ueki,I., Canteloup,S., Lenoir,G., Descamps-Latscha,B., and Nadel,J.A. (1999) Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., 20,729-736.

71. Turk,V., Turk,B., and Turk,D. (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. EMBO J., 20,4629-4633.

72. Chapman,H.A., Riese,R.J., and Shi,G.P. (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. Annu.Rev.Physiol, 59,63-88.

73. Gadek,J.E., Fells,G.A., and Crystal,R.G. (1979) Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. Science, 206,1315-1316.

74. Rooney,C.P., Taggart,C., Coakley,R., McElvaney,N.G., and O'Neill,S.J. (2001) Anti-proteinase 3 antibody activation of neutrophils can be inhibited by alpha1-antitrypsin. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., 24,747-754.

75. Vogelmeier,C., Hubbard,R.C., Fells,G.A., Schnebli,H.P., Thompson,R.C., Fritz,H., and Crystal,R.G. (1991) Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory

epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor. J.Clin.Invest, 87,482-488.

76. Shapiro,S.D., Senior,R.M. (1999) Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., 20,1100-1102.

77. Culpitt,S.V., Maziak,W., Loukidis,S., Nightingale,J.A., Matthews,J.L., and Barnes,P.J. (1999) Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 160,1635-1639.

78. Finlay,G.A., O'Driscoll,L.R., Russell,K.J., D'Arcy,E.M., Masterson,J.B., Fitzgerald,M.X., and O'Connor,C.M. (1997) Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 156,240-247.

79. Betsuyaku,T., Nishimura,M., Takeyabu,K., Tanino,M., Venge,P., Xu,S., and Kawakami,Y. (1999) Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 159,1985-1991.

80. Hautamaki,R.D., Kobayashi,D.K., Senior,R.M., and Shapiro,S.D. (1997) Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. Science, 277,2002-2004.

81. Wang,Z., Zheng,T., Zhu,Z., Homer,R.J., Riese,R.J., Chapman,H.A., Jr., Shapiro,S.D., and Elias,J.A. (2000) Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. J.Exp.Med., 192,1587-1600.

82. Zheng,T., Zhu,Z., Wang,Z., Homer,R.J., Ma,B., Riese,R.J., Jr., Chapman,H.A., Jr., Shapiro,S.D., and Elias,J.A. (2000) Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. J.Clin.Invest, 106,1081-1093.

83. Shapiro,S.D., Ingenito,E.P. (2005) The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., 32,367-372.

84. Repine,J.E., Bast,A., and Lankhorst,I. (1997) Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 156,341-357.

85. MacNee,W. (2001) Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. Eur.J.Pharmacol., 429,195-207.

86. Henricks,P.A., Nijkamp,F.P. (2001) Reactive oxygen species as mediators in asthma. Pulm.Pharmacol.Ther., 14,409-420.

87. Hogg,J.C., Senior,R.M. (2002) Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema. Thorax, 57,830-834.

88. Beckman,J.S., Koppenol,W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am.J.Physiol, 271,C1424-C1437.

89. Ricciardolo,F.L., Di,S.A., Sabatini,F., and Folkerts,G. (2006) Reactive nitrogen species in the respiratory tract. Eur.J.Pharmacol., 533,240-252.

90. Ricciardolo,F.L., Caramori,G., Ito,K., Capelli,A., Brun,P., Abatangelo,G., Papi,A., Chung,K.F., Adcock,I., Barnes,P.J., Donner,C.F., Rossi,A., and Di,S.A. (2005) Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary disease. J.Allergy Clin.Immunol., 116,1028-1035.

91. Ichinose,M., Sugiura,H., Yamagata,S., Koarai,A., and Shirato,K. (2000) Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 162,701-706.

92. Morrow,J.D. (2000) The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. Drug Metab Rev., 32,377-385.

93. Kawikova,I., Barnes,P.J., Takahashi,T., Tadjkarimi,S., Yacoub,M.H., and Belvisi,M.G. (1996) 8-Epi-PGF2 alpha, a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 153,590-596.

94. Okazawa,A., Kawikova,I., Cui,Z.H., Skoogh,B.E., and Lotvall,J. (1997) 8-Epi-PGF2alpha induces airflow obstruction and airway plasma exudation in vivo. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 155,436-441.

95. Janssen,L.J. (2001) Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 280,L1067-L1082.

96. Van,D., V, Eiserich,J.P., Shigenaga,M.K., and Cross,C.E. (1999) Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? Am.J.Respir.Crit.Care Med., 160,1-9.

97. Eiserich,J.P., Hristova,M., Cross,C.E., Jones,A.D., Freeman,B.A., Halliwell,B., and Van,D., V (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. Nature, 391,393-397.

98. Gaut,J.P., Byun,J., Tran,H.D., Lauber,W.M., Carroll,J.A., Hotchkiss,R.S., Belaaouaj,A., and Heinecke,J.W. (2002) Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. J.Clin.Invest, 109,1311-1319.

99. Di,S.A., Caramori,G., Oates,T., Capelli,A., Lusuardi,M., Gnemmi,I., Ioli,F., Chung,K.F., Donner,C.F., Barnes,P.J., and Adcock,I.M. (2002) Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. Eur.Respir.J., 20,556-563.

100. Caramori,G., Romagnoli,M., Casolari,P., Bellettato,C., Casoni,G., Boschetto,P., Chung,K.F., Barnes,P.J., Adcock,I.M., Ciaccia,A., Fabbri,L.M., and Papi,A. (2003)

Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. Thorax, 58,348-351.

101. Barnes,P.J., Karin,M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N.Engl.J.Med., 336,1066-1071.

102. Barnes,P.J. (2008) Defective antioxidant gene regulation in COPD: a case for broccoli. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 178,552-554.

103. Xanthoudakis,S., Curran,T. (1996) Redox regulation of AP-1: a link between transcription factor signaling and DNA repair. Adv.Exp.Med.Biol., 387,69-75.

104. Tomita,K., Barnes,P.J., and Adcock,I.M. (2003) The effect of oxidative stress on histone acetylation and IL-8 release. Biochem.Biophys.Res.Commun., 301,572-577.

105. Rahman,I. (2003) Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. J.Biochem.Mol.Biol., 36,95-109.

106. Vestbo,J., Sorensen,T., Lange,P., Brix,A., Torre,P., and Viskum,K. (1999) Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. Lancet, 353,1819-1823.

107. Pauwels,R.A., Lofdahl,C.G., Laitinen,L.A., Schouten,J.P., Postma,D.S., Pride,N.B., and Ohlsson,S.V. (1999) Long-term treatment with inhaled budesonide in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking. European Respiratory Society Study on Chronic Obstructive Pulmonary Disease. N.Engl.J.Med., 340,1948-1953.

108. Burge,P.S., Calverley,P.M., Jones,P.W., Spencer,S., Anderson,J.A., and Maslen,T.K. (2000) Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial. BMJ, 320,1297-1303.

109. (2000) Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease. N.Engl.J.Med., 343,1902-1909.

110. Keatings,V.M., Jatakanon,A., Worsdell,Y.M., and Barnes,P.J. (1997) Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 155,542-548.

111. Hutchison,K.A., Matic,G., Meshinchi,S., Bresnick,E.H., and Pratt,W.B. (1991) Redox manipulation of DNA binding activity and BuGR epitope reactivity of the glucocorticoid receptor. J.Biol.Chem., 266,10505-10509.

112. Okamoto,K., Tanaka,H., Ogawa,H., Makino,Y., Eguchi,H., Hayashi,S., Yoshikawa,N., Poellinger,L., Umesono,K., and Makino,I. (1999) Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor. J.Biol.Chem., 274,10363-10371.

113. Ito,K., Barnes,P.J., and Adcock,I.M. (2000) Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. Mol.Cell Biol., 20,6891-6903.

114. Barnes,P.J., Adcock,I.M. (2003) How do corticosteroids work in asthma? Ann.Intern.Med., 139,359-370.

115. Ito,K., Lim,S., Caramori,G., Chung,K.F., Barnes,P.J., and Adcock,I.M. (2001) Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. FASEB J., 15,1110-1112.

116. Cosio,B.G., Tsaprouni,L., Ito,K., Jazrawi,E., Adcock,I.M., and Barnes,P.J. (2004) Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. J.Exp.Med., 200,689-695.

117. Ito,K., Ito,M., Elliott,W.M., Cosio,B., Caramori,G., Kon,O.M., Barczyk,A., Hayashi,S., Adcock,I.M., Hogg,J.C., and Barnes,P.J. (2005) Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. N.Engl.J.Med., 352,1967-1976.

118. Culpitt,S.V., Rogers,D.F., Shah,P., De,M.C., Russell,R.E., Donnelly,L.E., and Barnes,P.J. (2003) Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 167,24-31.

119. Barnes,P.J. (2006) Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications. Chest, 129,151-155.

120. Ogura,M., Kitamura,M. (1998) Oxidant stress incites spreading of macrophages via extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase. J.Immunol., 161,3569-3574.

121. Forman,H.J., Torres,M. (2002) Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 166,S4-S8.

122. Repine,J.E., Bast,A., and Lankhorst,I. (1997) Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 156,341-357.

123. Britton,J.R., Pavord,I.D., Richards,K.A., Knox,A.J., Wisniewski,A.F., Lewis,S.A., Tattersfield,A.E., and Weiss,S.T. (1995) Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 151,1383-1387.

124. Schunemann,H.J., Freudenheim,J.L., and Grant,B.J. (2001) Epidemiologic evidence linking antioxidant vitamins to pulmonary function and airway obstruction. Epidemiol.Rev., 23,248-267.

125. Kharitonov,S.A., Barnes,P.J. (2001) Exhaled markers of pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 163,1693-1722.

126. Montuschi,P., Barnes,P.J. (2002) Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. Trends Pharmacol.Sci., 23,232-237.

127. Paredi,P., Kharitonov,S.A., and Barnes,P.J. (2002) Analysis of expired air for oxidation products. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 166,S31-S37.

128. Dekhuijzen,P.N., Aben,K.K., Dekker,I., Aarts,L.P., Wielders,P.L., van Herwaarden,C.L., and Bast,A. (1996) Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 154,813-816.

129. Nowak,D., Kasielski,M., Antczak,A., Pietras,T., and Bialasiewicz,P. (1999) Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. Respir.Med., 93,389-396.

130. Montuschi,P., Collins,J.V., Ciabattoni,G., Lazzeri,N., Corradi,M., Kharitonov,S.A., and Barnes,P.J. (2000) Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 162,1175-1177.

131. Biernacki,W.A., Kharitonov,S.A., and Barnes,P.J. (2003) Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. Thorax, 58,294-298.

132. Pratico,D., Basili,S., Vieri,M., Cordova,C., Violi,F., and FitzGerald,G.A. (1998) Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2alpha-III, an index of oxidant stress. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 158,1709-1714.

133. Rahman,I., Morrison,D., Donaldson,K., and MacNee,W. (1996) Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 154,1055-1060.

134. Rahman,I., van Schadewijk,A.A., Crowther,A.J., Hiemstra,P.S., Stolk,J., MacNee,W., and de Boer,W.I. (2002) 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 166,490-495.

135. Taggart,C., Cervantes-Laurean,D., Kim,G., McElvaney,N.G., Wehr,N., Moss,J., and Levine,R.L. (2000) Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. J.Biol.Chem., 275,27258-27265.

136. Majo,J., Ghezzo,H., and Cosio,M.G. (2001) Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. Eur.Respir.J., 17,946-953.

137. Kasahara,Y., Tuder,R.M., Taraseviciene-Stewart,L., Le Cras,T.D., Abman,S., Hirth,P.K., Waltenberger,J., and Voelkel,N.F. (2000) Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. J.Clin.Invest, 106,1311-1319.

138. Gotoh,Y., Cooper,J.A. (1998) Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. J.Biol.Chem., 273,17477-17482.

139. Shapiro,S.D. (1999) The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 160,S29-S32.

140. Barnes,P.J. (2002) Current and future therapies for airway mucus hypersecretion. Novartis.Found.Symp., 248,237-249.

141. Finkelstein,R., Fraser,R.S., Ghezzo,H., and Cosio,M.G. (1995) Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 152,1666-1672.

142. Meshi,B., Vitalis,T.Z., Ionescu,D., Elliott,W.M., Liu,C., Wang,X.D., Hayashi,S., and Hogg,J.C. (2002) Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., 26,52-57.

143. Di,S.A., Capelli,A., Lusuardi,M., Balbo,P., Vecchio,C., Maestrelli,P., Mapp,C.E., Fabbri,L.M., Donner,C.F., and Saetta,M. (1998) Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 158,1277-1285.

144. Punturieri,A., Filippov,S., Allen,E., Caras,I., Murray,R., Reddy,V., and Weiss,S.J. (2000) Regulation of elastinolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. J.Exp.Med., 192,789-799.

145. Lim,S., Roche,N., Oliver,B.G., Mattos,W., Barnes,P.J., and Chung,K.F. (2000) Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 162,1355-1360.

146. Traves,S.L., Culpitt,S.V., Russell,R.E., Barnes,P.J., and Donnelly,L.E. (2002) Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. Thorax, 57,590-595.

147. Capelli,A., Di,S.A., Gnemmi,I., Balbo,P., Cerutti,C.G., Balbi,B., Lusuardi,M., and Donner,C.F. (1999) Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. Eur.Respir.J., 14,160-165.

148. de Boer,W.I., Sont,J.K., van,S.A., Stolk,J., van Krieken,J.H., and Hiemstra,P.S. (2000) Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. J.Pathol., 190,619-626.

149. Traves,S.L., Smith,S.J., Barnes,P.J., and Donnelly,L.E. (2004) Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. J.Leukoc.Biol., 76,441-450.

150. Tomita,K., Caramori,G., Lim,S., Ito,K., Hanazawa,T., Oates,T., Chiselita,I., Jazrawi,E., Chung,K.F., Barnes,P.J., and Adcock,I.M. (2002) Increased p21(CIP1/WAF1) and B cell lymphoma leukemia-x(L) expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 166,724-731.

151. Fadok,V.A., Bratton,D.L., Rose,D.M., Pearson,A., Ezekewitz,R.A., and Henson,P.M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. Nature, 405,85-90.

152. Huynh,M.L., Fadok,V.A., and Henson,P.M. (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. J.Clin.Invest, 109,41-50.

153. Vandivier,R.W., Fadok,V.A., Hoffmann,P.R., Bratton,D.L., Penvari,C., Brown,K.K., Brain,J.D., Accurso,F.J., and Henson,P.M. (2002) Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. J.Clin.Invest, 109,661-670.

154. Hiemstra,P.S., van,W.S., and Stolk,J. (1998) Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. Eur.Respir.J., 12,1200-1208.

155. Keatings,V.M., Collins,P.D., Scott,D.M., and Barnes,P.J. (1996) Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 153,530-534.

156. Lacoste,J.Y., Bousquet,J., Chanez,P., Van,V.T., Simony-Lafontaine,J., Lequeu,N., Vic,P., Enander,I., Godard,P., and Michel,F.B. (1993) Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. J.Allergy Clin.Immunol., 92,537-548.

157. O'Donnell,R., Breen,D., Wilson,S., and Djukanovic,R. (2006) Inflammatory cells in the airways in COPD. Thorax, 61,448-454.

158. Snider,G.L., Lucey,E.C., and Stone,P.J. (1986) Animal models of emphysema. Am.Rev.Respir.Dis., 133,149-169.

159. Shapiro,S.D., Goldstein,N.M., Houghton,A.M., Kobayashi,D.K., Kelley,D., and Belaaouaj,A. (2003) Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Am.J.Pathol., 163,2329-2335.

160. Di,S.A., Maestrelli,P., Roggeri,A., Turato,G., Calabro,S., Potena,A., Mapp,C.E., Ciaccia,A., Covacev,L., Fabbri,L.M., and . (1994) Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 149,803-810.

161. Sparrow,D., Glynn,R.J., Cohen,M., and Weiss,S.T. (1984) The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men. Chest, 86,383-386.

162. Stanescu,D., Sanna,A., Veriter,C., Kostianev,S., Calcagni,P.G., Fabbri,L.M., and Maestrelli,P. (1996) Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. Thorax, 51,267-271.

163. Terashima,T., Wiggs,B., English,D., Hogg,J.C., and van Eeden,S.F. (1997) Phagocytosis of small carbon particles (PM10) by alveolar macrophages stimulates the release of polymorphonuclear leukocytes from bone marrow. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 155,1441-1447.

164. MacNee,W., Wiggs,B., Belzberg,A.S., and Hogg,J.C. (1989) The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. N.Engl.J.Med., 321,924-928.

165. Keatings,V.M., Barnes,P.J. (1997) Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 155,449-453.

166. Yamamoto,C., Yoneda,T., Yoshikawa,M., Fu,A., Tokuyama,T., Tsukaguchi,K., and Narita,N. (1997) Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. Chest, 112,505-510.

167. Peleman,R.A., Rytila,P.H., Kips,J.C., Joos,G.F., and Pauwels,R.A. (1999) The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. Eur.Respir.J., 13,839-843.

168. Noguera,A., Batle,S., Miralles,C., Iglesias,J., Busquets,X., MacNee,W., and Agusti,A.G. (2001) Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. Thorax, 56,432-437.

169. Bazzoni,F., Cassatella,M.A., Rossi,F., Ceska,M., Dewald,B., and Baggiolini,M. (1991) Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. J.Exp.Med., 173,771-774.

170. Saetta,M., Baraldo,S., Corbino,L., Turato,G., Braccioni,F., Rea,F., Cavallesco,G., Tropeano,G., Mapp,C.E., Maestrelli,P., Ciaccia,A., and Fabbri,L.M. (1999) CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 160,711-717.

171. O'Shaughnessy,T.C., Ansari,T.W., Barnes,N.C., and Jeffery,P.K. (1997) Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 155,852-857.

172. Saetta,M., Mariani,M., Panina-Bordignon,P., Turato,G., Buonsanti,C., Baraldo,S., Bellettato,C.M., Papi,A., Corbetta,L., Zuin,R., Sinigaglia,F., and Fabbri,L.M. (2002) Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in

peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 165,1404-1409.

173. Vukmanovic-Stejic,M., Vyas,B., Gorak-Stolinska,P., Noble,A., and Kemeny,D.M. (2000) Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. Blood, 95,231-240.

174. Prieto,A., Reyes,E., Bernstein,E.D., Martinez,B., Monserrat,J., Izquierdo,J.L., Callol,L., de,L.P., Alvarez-Sala,R., Alvarez-Sala,J.L., Villarrubia,V.G., and Alvarez-Mon,M. (2001) Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycophosphopeptical (inmunoferon). Am.J.Respir.Crit.Care Med., 163,1578-1583.

175. Zeidel,A., Beilin,B., Yardeni,I., Mayburd,E., Smirnov,G., and Bessler,H. (2002) Immune response in asymptomatic smokers. Acta Anaesthesiol.Scand., 46,959-964.

176. Hashimoto,S., Kobayashi,A., Kooguchi,K., Kitamura,Y., Onodera,H., and Nakajima,H. (2000) Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 161,237-243.

177. Takubo,Y., Guerassimov,A., Ghezzo,H., Triantafillopoulos,A., Bates,J.H., Hoidal,J.R., and Cosio,M.G. (2002) Alpha1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 166,1596-1603.

178. Barnes,P.J. (2005) Emerging targets for COPD therapy. Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy, 4,675-683.

179. Man,S.F., McAlister,F.A., Anthonisen,N.R., and Sin,D.D. (2003) Contemporary management of chronic obstructive pulmonary disease: clinical applications. JAMA, 290,2313-2316.

180. Grove,A., Lipworth,B.J., Reid,P., Smith,R.P., Ramage,L., Ingram,C.G., Jenkins,R.J., Winter,J.H., and Dhillon,D.P. (1996) Effects of regular salmeterol on lung function and exercise capacity in patients with chronic obstructive airways disease. Thorax, 51,689-693.

181. Disse,B., Speck,G.A., Rominger,K.L., Witek,T.J., Jr., and Hammer,R. (1999) Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease. Life Sci., 64,457-464.

182. Larj,M.J., Bleecker,E.R. (2004) Therapeutic responses in asthma and COPD. Corticosteroids. Chest, 126,138S-149S.

183. Rennard,S.I., Fogarty,C., Kelsen,S., Long,W., Ramsdell,J., Allison,J., Mahler,D., Saadeh,C., Siler,T., Snell,P., Korenblat,P., Smith,W., Kaye,M., Mandel,M., Andrews,C., Prabhu,R., Donohue,J.F., Watt,R., Lo,K.H., Schlenker-Herceg,R., Barnathan,E.S., and Murray,J. (2007) The safety and efficacy of infliximab in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 175,926-934.

184. Birrell,M.A., Wong,S., Hardaker,E.L., Catley,M.C., McCluskie,K., Collins,M., Haj-Yahia,S., and Belvisi,M.G. (2006) IkappaB kinase-2-independent and -dependent inflammation in airway disease models: relevance of IKK-2 inhibition to the clinic. Mol.Pharmacol., 69,1791-1800.

185. Renda,T., Baraldo,S., Pelaia,G., Bazzan,E., Turato,G., Papi,A., Maestrelli,P., Maselli,R., Vatrella,A., Fabbri,L.M., Zuin,R., Marsico,S.A., and Saetta,M. (2008) Increased activation of p38 MAPK in COPD. Eur.Respir.J., 31,62-69.

186. Boveris,A., Cadenas,E. (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. FEBS Lett., 54,311-314.

187. Turrens,J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J.Physiol, 552,335-344.

188. Orrenius,S., Gogvadze,V., and Zhivotovsky,B. (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol., 47,143-183.

189. Vasquez-Vivar,J., Kalyanaraman,B. (2000) Generation of superoxide from nitric oxide synthase. FEBS Lett., 481,305-306.

190. Vasquez-Vivar,J., Kalyanaraman,B., Martasek,P., Hogg,N., Masters,B.S., Karoui,H., Tordo,P., and Pritchard,K.A., Jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 95,9220-9225.

191. Alp,N.J., Channon,K.M. (2004) Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 24,413-420.

192. Simmons,D.L., Botting,R.M., and Hla,T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacol.Rev., 56,387-437.

193. Wittwer,J., Hersberger,M. (2007) The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids, 77,67-77.

194. Zangar,R.C., Davydov,D.R., and Verma,S. (2004) Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. Toxicol.Appl.Pharmacol., 199,316-331.

195. McCord,J.M., Fridovich,I. (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. J.Biol.Chem., 243,5753-5760.

196. Pacher,P., Nivorozhkin,A., and Szabo,C. (2006) Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacol.Rev., 58,87-114.

197. Selemidis,S., Sobey,C.G., Wingler,K., Schmidt,H.H., and Drummond,G.R. (2008) NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. Pharmacol.Ther., 120,254-291.

198. Rossi,F., Zatti,M. (1964) Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. Experientia, 20,21-23.

199. Baldridge,C.W., Gerard,R.W. (1932) THE EXTRA RESPIRATION OF PHAGOCYTOSIS. Am J Physiol, 103,235-236.

200. IYER,G.Y.N., ISLAM,M.F., and QUASTEL,J.H. (1961) Biochemical Aspects of Phagocytosis. Nature, 192,535-541.

201. Babior,B.M., Kipnes,R.S., and Curnutte,J.T. (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J Clin.Invest, 52,741-744.

202. McPhail,L.C., DeChatelet,L.R., and Shirley,P.S. (1976) Further characterization of NADPH oxidase activity of human polymorphonuclear leukocytes. J Clin.Invest, 58,774-780.

203. Babior,B.M., Lambeth,J.D., and Nauseef,W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. Arch.Biochem.Biophys., 397,342-344.

204. Segal,A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. Annu.Rev.Immunol., 23,197-223.

205. Segal,A.W., Jones,O.T. (1978) Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. Nature, 276,515-517.

206. Griendling,K.K., Minieri,C.A., Ollerenshaw,J.D., and Alexander,R.W. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. Circ.Res., 74,1141-1148.

207. Ris-Stalpers,C. (2006) Physiology and pathophysiology of the DUOXes. Antioxid.Redox.Signal., 8,1563-1572.

208. Lambeth,J.D., Kawahara,T., and Diebold,B. (2007) Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. Free Radic.Biol.Med., 43,319-331.

209. Opitz,N., Drummond,G.R., Selemidis,S., Meurer,S., and Schmidt,H.H. (2007) The 'A's and 'O's of NADPH oxidase regulation: a commentary on "Subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms". Free Radic.Biol.Med., 42,175-179.

210. Ambasta,R.K., Kumar,P., Griendling,K.K., Schmidt,H.H., Busse,R., and Brandes,R.P. (2004) Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. J Biol.Chem., 279,45935-45941.

211. Hanna,I.R., Hilenski,L.L., Dikalova,A., Taniyama,Y., Dikalov,S., Lyle,A., Quinn,M.T., Lassegue,B., and Griendling,K.K. (2004) Functional association of nox1 with p22phox in vascular smooth muscle cells. Free Radic.Biol.Med., 37,1542-1549.

212. Lassegue,B., Griendling,K.K. (2009) NADPH Oxidases: Functions and Pathologies in the Vasculature. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol..

213. Bedard,K., Krause,K.H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev., 87,245-313.

214. Jones,S.A., O'Donnell,V.B., Wood,J.D., Broughton,J.P., Hughes,E.J., and Jones,O.T. (1996) Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. Am J Physiol, 271,H1626-H1634.

215. Meyer,J.W., Holland,J.A., Ziegler,L.M., Chang,M.M., Beebe,G., and Schmitt,M.E. (1999) Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells :a potential atherogenic source of reactive oxygen species. Endothelium, 7,11-22.

216. Bayraktutan,U., Blayney,L., and Shah,A.M. (2000) Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 20,1903-1911.

217. Hohler,B., Holzapfel,B., and Kummer,W. (2000) NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. Histochem.Cell Biol., 114,29-37.

218. Rueckschloss,U., Galle,J., Holtz,J., Zerkowski,H.R., and Morawietz,H. (2001) Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. Circulation, 104,1767-1772.

219. Wagner,A.H., Schroeter,M.R., and Hecker,M. (2001) 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. FASEB J, 15,2121-2130.

220. Mollnau,H., Wendt,M., Szocs,K., Lassegue,B., Schulz,E., Oelze,M., Li,H., Bodenschatz,M., August,M., Kleschyov,A.L., Tsilimingas,N., Walter,U., Forstermann,U., Meinertz,T., Griendling,K., and Munzel,T. (2002) Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. Circ.Res., 90,E58-E65.

221. Paravicini,T.M., Gulluyan,L.M., Dusting,G.J., and Drummond,G.R. (2002) Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. Circ.Res., 91,54-61.

222. Selemidis,S., Dusting,G.J., Peshavariya,H., Kemp-Harper,B.K., and Drummond,G.R. (2007) Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. Cardiovasc.Res., 75,349-358.

223. Peshavariya,H.M., Dusting,G.J., and Selemidis,S. (2007) Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. Free Radic.Res., 41,699-712.

224. Pagano,P.J., Clark,J.K., Cifuentes-Pagano,M.E., Clark,S.M., Callis,G.M., and Quinn,M.T. (1997) Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 94,14483-14488.

225. Cifuentes,M.E., Rey,F.E., Carretero,O.A., and Pagano,P.J. (2000) Upregulation of p67(phox) and gp91(phox) in aortas from angiotensin II-infused mice. Am J Physiol Heart Circ.Physiol, 279,H2234-H2240.

226. Rey,F.E., Li,X.C., Carretero,O.A., Garvin,J.L., and Pagano,P.J. (2002) Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox). Circulation, 106,2497-2502.

227. Touyz,R.M., Chen,X., Tabet,F., Yao,G., He,G., Quinn,M.T., Pagano,P.J., and Schiffrin,E.L. (2002) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. Circ.Res., 90,1205-1213.

228. Rotrosen,D., Leto,T.L. (1990) Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. J Biol.Chem., 265,19910-19915.

229. Imajoh-ohmi,S., Tokita,K., Ochiai,H., Nakamura,M., and Kanegasaki,S. (1992) Topology of cytochrome b558 in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide antibodies and proteolysis. J Biol.Chem., 267,180-184.

230. DeLeo,F.R., Yu,L., Burritt,J.B., Loetterle,L.R., Bond,C.W., Jesaitis,A.J., and Quinn,M.T. (1995) Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 92,7110-7114.

231. Burritt,J.B., DeLeo,F.R., McDonald,C.L., Prigge,J.R., Dinauer,M.C., Nakamura,M., Nauseef,W.M., and Jesaitis,A.J. (2001) Phage display epitope mapping of human neutrophil flavocytochrome b558. Identification of two juxtaposed extracellular domains. J Biol.Chem., 276,2053-2061.

232. Burritt,J.B., Foubert,T.R., Baniulis,D., Lord,C.I., Taylor,R.M., Mills,J.S., Baughan,T.D., Roos,D., Parkos,C.A., and Jesaitis,A.J. (2003) Functional epitope on human neutrophil flavocytochrome b558. J Immunol., 170,6082-6089.

233. Paclet,M.H., Henderson,L.M., Campion,Y., Morel,F., and Dagher,M.C. (2004) Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. Biochem.J, 382,981-986.

234. Parkos,C.A., Allen,R.A., Cochrane,C.G., and Jesaitis,A.J. (1987) Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. J Clin.Invest, 80,732-742.

235. Kleinberg,M.E., Rotrosen,D., and Malech,H.L. (1989) Asparagine-linked glycosylation of cytochrome b558 large subunit varies in different human phagocytic cells. J Immunol., 143,4152-4157.

236. Harper,A.M., Chaplin,M.F., and Segal,A.W. (1985) Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. Biochem.J, 227,783-788.

237. Wallach,T.M., Segal,A.W. (1997) Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. Biochem.J, 321 (Pt 3),583-585.

238. Taylor,R.M., Baniulis,D., Burritt,J.B., Gripentrog,J.M., Lord,C.I., Riesselman,M.H., Maaty,W.S., Bothner,B.P., Angel,T.E., Dratz,E.A., Linton,G.F., Malech,H.L., and Jesaitis,A.J. (2006) Analysis of human phagocyte flavocytochrome b(558) by mass spectrometry. J Biol.Chem., 281,37045-37056.

239. Babior,B.M., Kipnes,R.S. (1977) Superoxide-forming enzyme from human neutrophils: evidence for a flavin requirement. Blood, 50,517-524.

240. Taylor,W.R., Jones,D.T., and Segal,A.W. (1993) A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain. Protein Sci., 2,1675-1685.

241. Cheng,G., Cao,Z., Xu,X., van Meir,E.G., and Lambeth,J.D. (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. Gene, 269,131-140.

242. Doussiere,J., Gaillard,J., and Vignais,P.V. (1996) Electron transfer across the O2-generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component. Biochemistry, 35,13400-13410.

243. Isogai,Y., Iizuka,T., and Shiro,Y. (1995) The mechanism of electron donation to molecular oxygen by phagocytic cytochrome b558. J Biol.Chem., 270,7853-7857.

244. Diatchuk,V., Lotan,O., Koshkin,V., Wikstroem,P., and Pick,E. (1997) Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. J Biol.Chem., 272,13292-13301.

245. Finegold,A.A., Shatwell,K.P., Segal,A.W., Klausner,R.D., and Dancis,A. (1996) Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. J Biol.Chem., 271,31021-31024.

246. Huang,J., Hitt,N.D., and Kleinberg,M.E. (1995) Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. Biochemistry, 34,16753-16757.

247. DeLeo,F.R., Burritt,J.B., Yu,L., Jesaitis,A.J., Dinauer,M.C., and Nauseef,W.M. (2000) Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. J Biol.Chem., 275,13986-13993.

248. Dinauer,M.C., Pierce,E.A., Erickson,R.W., Muhlebach,T.J., Messner,H., Orkin,S.H., Seger,R.A., and Curnutte,J.T. (1991) Point mutation in the cytoplasmic domain of the

neutrophil p22-phox cytochrome b subunit is associated with a nonfunctional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 88,11231-11235.

249. Bokoch,G.M., Knaus,U.G. (2003) NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! Trends Biochem.Sci., 28,502-508.

250. Weissmann,N., Sommer,N., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., and Grimminger,F. (2006) Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Cardiovasc.Res., 71,620-629.

251. Brandes,R.P., Kreuzer,J. (2005) Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. Cardiovasc.Res., 65,16-27.

252. Babior,B.M., Lambeth,J.D., and Nauseef,W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. Arch Biochem.Biophys., 397,342-344.

253. Banfi,B., Malgrange,B., Knisz,J., Steger,K., Dubois-Dauphin,M., and Krause,K.H. (2004) NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. J Biol.Chem., 279,46065-46072.

254. Taylor,R.M., Burritt,J.B., Baniulis,D., Foubert,T.R., Lord,C.I., Dinauer,M.C., Parkos,C.A., and Jesaitis,A.J. (2004) Site-specific inhibitors of NADPH oxidase activity and structural probes of flavocytochrome b: characterization of six monoclonal antibodies to the p22phox subunit. J Immunol., 173,7349-7357.

255. Zhu,Y., Marchal,C.C., Casbon,A.J., Stull,N., von,L.K., Knaus,U.G., Jesaitis,A.J., McCormick,S., Nauseef,W.M., and Dinauer,M.C. (2006) Deletion mutagenesis of p22phox subunit of flavocytochrome b558: identification of regions Crit.ical for gp91phox maturation and NADPH oxidase activity. J Biol.Chem., 281,30336-30346.

256. Leusen,J.H., Bolscher,B.G., Hilarius,P.M., Weening,R.S., Kaulfersch,W., Seger,R.A., Roos,D., and Verhoeven,A.J. (1994) 156Pro-->Gln substitution in the light chain of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase (p22-phox) leads to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. J Exp.Med., 180,2329-2334.

257. Leto,T.L., Adams,A.G., and de,M., I (1994) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 91,10650-10654.

258. Sumimoto,H., Kage,Y., Nunoi,H., Sasaki,H., Nose,T., Fukumaki,Y., Ohno,M., Minakami,S., and Takeshige,K. (1994) Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 91,5345-5349.

259. Groemping,Y., Lapouge,K., Smerdon,S.J., and Rittinger,K. (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. Cell, 113,343-355.

260. Nobuhisa,I., Takeya,R., Ogura,K., Ueno,N., Kohda,D., Inagaki,F., and Sumimoto,H. (2006) Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-

operation between the tandem SH3 domains of p47phox in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22phox. Biochem.J, 396,183-192.

261. Ponting,C.P. (1996) Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? Protein Sci., 5,2353-2357.

262. Bao,J., Sato,K., Li,M., Gao,Y., Abid,R., Aird,W., Simons,M., and Post,M.J. (2001) PR-39 and PR-11 peptides inhibit ischemia-reperfusion injury by blocking proteasome-mediated I kappa B alpha degradation. Am J Physiol Heart Circ.Physiol, 281,H2612-H2618.

263. Ago,T., Kuribayashi,F., Hiroaki,H., Takeya,R., Ito,T., Kohda,D., and Sumimoto,H. (2003) Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 100,4474-4479.

264. El,B.J., Faust,R.P., Johnson,J.L., and Babior,B.M. (1996) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. J Biol.Chem., 271,6374-6378.

265. Inanami,O., Johnson,J.L., McAdara,J.K., Benna,J.E., Faust,L.R., Newburger,P.E., and Babior,B.M. (1998) Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304. J Biol.Chem., 273,9539-9543.

266. Fontayne,A., Dang,P.M., Gougerot-Pocidalo,M.A., and El-Benna,J. (2002) Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. Biochemistry, 41,7743-7750.

267. Ago,T., Nunoi,H., Ito,T., and Sumimoto,H. (1999) Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. J Biol.Chem., 274,33644-33653.

268. Yuzawa,S., Ogura,K., Horiuchi,M., Suzuki,N.N., Fujioka,Y., Kataoka,M., Sumimoto,H., and Inagaki,F. (2004) Solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox in an autoinhibited form. J Biol.Chem., 279,29752-29760.

269. Finan,P., Shimizu,Y., Gout,I., Hsuan,J., Truong,O., Butcher,C., Bennett,P., Waterfield,M.D., and Kellie,S. (1994) An SH3 domain and proline-rich sequence mediate an interaction between two components of the phagocyte NADPH oxidase complex. J Biol.Chem., 269,13752-13755.

270. McPhail,L.C. (1994) SH3-dependent assembly of the phagocyte NADPH oxidase. J Exp.Med., 180,2011-2015.

271. de Mendez,I, Adams,A.G., Sokolic,R.A., Malech,H.L., and Leto,T.L. (1996) Multiple SH3 domain interactions regulate NADPH oxidase assembly in whole cells. EMBO J, 15,1211-1220.

272. de Mendez,I, Homayounpour,N., and Leto,T.L. (1997) Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. Mol.Cell Biol., 17,2177-2185.

273. Kami,K., Takeya,R., Sumimoto,H., and Kohda,D. (2002) Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. EMBO J, 21,4268-4276.

274. Groemping,Y., Rittinger,K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. Biochem.J, 386,401-416.

275. Han,C.H., Freeman,J.L., Lee,T., Motalebi,S.A., and Lambeth,J.D. (1998) Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). J Biol.Chem., 273,16663-16668.

276. Nisimoto,Y., Motalebi,S., Han,C.H., and Lambeth,J.D. (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). J Biol.Chem., 274,22999-23005.

277. Kuribayashi,F., Nunoi,H., Wakamatsu,K., Tsunawaki,S., Sato,K., Ito,T., and Sumimoto,H. (2002) The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. EMBO J, 21,6312-6320.

278. Ago,T., Takeya,R., Hiroaki,H., Kuribayashi,F., Ito,T., Kohda,D., and Sumimoto,H. (2001) The PX domain as a novel phosphoinositide- binding module. Biochem.Biophys.Res.Commun., 287,733-738.

279. Nakamura,R., Sumimoto,H., Mizuki,K., Hata,K., Ago,T., Kitajima,S., Takeshige,K., Sakaki,Y., and Ito,T. (1998) The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. Eur.J Biochem., 251,583-589.

280. Noda,Y., Kohjima,M., Izaki,T., Ota,K., Yoshinaga,S., Inagaki,F., Ito,T., and Sumimoto,H. (2003) Molecular recognition in dimerization between PB1 domains. J Biol.Chem., 278,43516-43524.

281. Ellson,C.D., Gobert-Gosse,S., Anderson,K.E., Davidson,K., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Thuring,J.W., Cooper,M.A., Lim,Z.Y., Holmes,A.B., Gaffney,P.R., Coadwell,J., Chilvers,E.R., Hawkins,P.T., and Stephens,L.R. (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). Nat.Cell Biol., 3,679-682.

282. Honbou,K., Minakami,R., Yuzawa,S., Takeya,R., Suzuki,N.N., Kamakura,S., Sumimoto,H., and Inagaki,F. (2007) Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. EMBO J, 26,1176-1186.

283. Bissonnette,S.A., Glazier,C.M., Stewart,M.Q., Brown,G.E., Ellson,C.D., and Yaffe,M.B. (2008) Phosphatidylinositol 3-phosphate-dependent and -independent functions of p40phox in activation of the neutrophil NADPH oxidase. J Biol.Chem., 283,2108-2119.

284. Fuchs,A., Dagher,M.C., and Vignais,P.V. (1995) Mapping the domains of interaction of p40phox with both p47phox and p67phox of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system. J Biol.Chem., 270,5695-5697.

285. Di-Poi,N., Faure,J., Grizot,S., Molnar,G., Pick,E., and Dagher,M.C. (2001) Mechanism of NADPH oxidase activation by the Rac/Rho-GDI complex. Biochemistry, 40,10014-10022.

286. Seifert,R., Wenzel,K., Eckstein,F., and Schultz,G. (1989) Purine and pyrimidine nucleotides potentiate activation of NADPH oxidase and degranulation by chemotactic peptides and induce aggregation of human neutrophils via G proteins. Eur.J Biochem., 181,277-285.

287. Ligeti,E., Tardif,M., and Vignais,P.V. (1989) Activation of O2.- generating oxidase of bovine neutrophils in a cell-free system. Interaction of a cytosolic factor with the plasma membrane and control by G nucleotides. Biochemistry, 28,7116-7123.

288. Gabig,T.G., English,D., Akard,L.P., and Schell,M.J. (1987) Regulation of neutrophil NADPH oxidase activation in a cell-free system by guanine nucleotides and fluoride. Evidence for participation of a pertussis and cholera toxin-insensitive G protein. J Biol.Chem., 262,1685-1690.

289. Doussiere,J., Pilloud,M.C., and Vignais,P.V. (1988) Activation of bovine neutrophil oxidase in a cell free system. GTP-dependent formation of a complex between a cytosolic factor and a membrane protein. Biochem.Biophys.Res.Commun., 152,993-1001.

290. Abo,A., Pick,E., Hall,A., Totty,N., Teahan,C.G., and Segal,A.W. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. Nature, 353,668-670.

291. Knaus,U.G., Heyworth,P.G., Evans,T., Curnutte,J.T., and Bokoch,G.M. (1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. Science, 254,1512-1515.

292. Bishop,A.L., Hall,A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. Biochem.J, 348 Pt 2,241-255.

293. Bourne,H.R., Sanders,D.A., and McCormick,F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. Nature, 348,125-132.

294. Bourne,H.R., Sanders,D.A., and McCormick,F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. Nature, 349,117-127.

295. Diekmann,D., Abo,A., Johnston,C., Segal,A.W., and Hall,A. (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. Science, 265,531-533.

296. Koga,H., Terasawa,H., Nunoi,H., Takeshige,K., Inagaki,F., and Sumimoto,H. (1999) Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. J Biol.Chem., 274,25051-25060.

297. Nisimoto,Y., Freeman,J.L., Motalebi,S.A., Hirshberg,M., and Lambeth,J.D. (1997) Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. J Biol.Chem., 272,18834-18841.

298. Lapouge,K., Smith,S.J., Walker,P.A., Gamblin,S.J., Smerdon,S.J., and Rittinger,K. (2000) Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. Mol.Cell, 6,899-907.

299. Sarfstein,R., Gorzalczany,Y., Mizrahi,A., Berdichevsky,Y., Molshanski-Mor,S., Weinbaum,C., Hirshberg,M., Dagher,M.C., and Pick,E. (2004) Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67phox: a study based on mutagenesis of p67phox-Rac1 chimeras. J Biol.Chem., 279,16007-16016.

300. Freeman,J.L., Lambeth,J.D. (1996) NADPH oxidase activity is independent of p47phox in vitro. J Biol.Chem., 271,22578-22582.

301. Koshkin,V., Lotan,O., and Pick,E. (1996) The cytosolic component p47(phox) is not a sine qua non participant in the activation of NADPH oxidase but is required for optimal superoxide production. J Biol.Chem., 271,30326-30329.

302. Suh,Y.A., Arnold,R.S., Lassegue,B., Shi,J., Xu,X., Sorescu,D., Chung,A.B., Griendling,K.K., and Lambeth,J.D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. Nature, 401,79-82.

303. Banfi,B., Maturana,A., Jaconi,S., Arnaudeau,S., Laforge,T., Sinha,B., Ligeti,E., Demaurex,N., and Krause,K.H. (2000) A mammalian H+ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. Science, 287,138-142.

304. Banfi,B., Clark,R.A., Steger,K., and Krause,K.H. (2003) Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. J Biol.Chem., 278,3510-3513.

305. Szanto,I., Rubbia-Brandt,L., Kiss,P., Steger,K., Banfi,B., Kovari,E., Herrmann,F., Hadengue,A., and Krause,K.H. (2005) Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. J Pathol., 207,164-176.

306. Cui,X.L., Brockman,D., Campos,B., and Myatt,L. (2006) Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia. Placenta, 27,422-431.

307. Kawahara,T., Kuwano,Y., Teshima-Kondo,S., Takeya,R., Sumimoto,H., Kishi,K., Tsunawaki,S., Hirayama,T., and Rokutan,K. (2004) Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells. J Immunol., 172,3051-3058.

308. Cheng,G., Lambeth,J.D. (2004) NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. J Biol.Chem., 279,4737-4742.

309. Kawahara,T., Ritsick,D., Cheng,G., and Lambeth,J.D. (2005) Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. J Biol.Chem., 280,31859-31869.

310. Geiszt,M., Lekstrom,K., Witta,J., and Leto,T.L. (2003) Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. J Biol.Chem., 278,20006-20012.

311. Cheng,G., Lambeth,J.D. (2005) Alternative mRNA splice forms of NOXO1: differential tissue expression and regulation of Nox1 and Nox3. Gene, 356,118-126.

312. Ueyama,T., Lekstrom,K., Tsujibe,S., Saito,N., and Leto,T.L. (2007) Subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms. Free Radic.Biol.Med., 42,180-190.

313. Cheng,G., Diebold,B.A., Hughes,Y., and Lambeth,J.D. (2006) Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. J Biol.Chem., 281,17718-17726.

314. Miyano,K., Ueno,N., Takeya,R., and Sumimoto,H. (2006) Direct involvement of the small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. J Biol.Chem., 281,21857-21868.

315. Geiszt,M., Kopp,J.B., Varnai,P., and Leto,T.L. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 97,8010-8014.

316. Shiose,A., Kuroda,J., Tsuruya,K., Hirai,M., Hirakata,H., Naito,S., Hattori,M., Sakaki,Y., and Sumimoto,H. (2001) A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. J Biol.Chem., 276,1417-1423.

317. Sorescu,D., Weiss,D., Lassegue,B., Clempus,R.E., Szocs,K., Sorescu,G.P., Valppu,L., Quinn,M.T., Lambeth,J.D., Vega,J.D., Taylor,W.R., and Griendling,K.K. (2002) Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. Circulation, 105,1429-1435.

318. Petry,A., Djordjevic,T., Weitnauer,M., Kietzmann,T., Hess,J., and Gorlach,A. (2006) NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells. Antioxid.Redox.Signal., 8,1473-1484.

319. Lassegue,B., Sorescu,D., Szocs,K., Yin,Q., Akers,M., Zhang,Y., Grant,S.L., Lambeth,J.D., and Griendling,K.K. (2001) Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. Circ.Res., 88,888-894.

320. Wingler,K., Wunsch,S., Kreutz,R., Rothermund,L., Paul,M., and Schmidt,H.H. (2001) Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. Free Radic.Biol.Med., 31,1456-1464.

321. Bengtsson,S.H., Gulluyan,L.M., Dusting,G.J., and Drummond,G.R. (2003) Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. Clin.Exp.Pharmacol.Physiol, 30,849-854.

322. Byrne,J.A., Grieve,D.J., Bendall,J.K., Li,J.M., Gove,C., Lambeth,J.D., Cave,A.C., and Shah,A.M. (2003) Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. Circ.Res., 93,802-805.

323. Yang,S., Madyastha,P., Bingel,S., Ries,W., and Key,L. (2001) A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. J Biol.Chem., 276,5452-5458.

324. Goyal,P., Weissmann,N., Rose,F., Grimminger,F., Schafers,H.J., Seeger,W., and Hanze,J. (2005) Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. Biochem.Biophys.Res.Commun., 329,32-39.

325. Martyn,K.D., Frederick,L.M., von,L.K., Dinauer,M.C., and Knaus,U.G. (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. Cell Signal., 18,69-82.

326. Cave,A. (2009) Selective targeting of NADPH oxidase for cardiovascular protection. Curr.Opin.Pharmacol., 9,208-213.

327. Vecchione,C., Brandes,R.P. (2002) Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. Circ.Res., 91,173-179.

328. Jacobson,G.M., Dourron,H.M., Liu,J., Carretero,O.A., Reddy,D.J., Andrzejewski,T., and Pagano,P.J. (2003) Novel NAD(P)H oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced superoxide and neointimal hyperplasia of rat carotid artery. Circ.Res., 92,637-643.

329. Weaver,M., Liu,J., Pimentel,D., Reddy,D.J., Harding,P., Peterson,E.L., and Pagano,P.J. (2006) Adventitial delivery of dominant-negative p67phox attenuates neointimal hyperplasia of the rat carotid artery. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol, 290,H1933-H1941.

330. Ni,W., Zhan,Y., He,H., Maynard,E., Balschi,J.A., and Oettgen,P. (2007) Ets-1 is a Crit.ical transcriptional regulator of reactive oxygen species and p47(phox) gene expression in response to angiotensin II. Circ.Res., 101,985-994.

331. Nakanishi,Y., Kobayashi,D., Asano,Y., Sakurai,T., Kashimura,M., Okuyama,S., Yoneda,Y., Shapiro,S.D., and Takayama,K. (2009) Clarithromycin prevents smoke-induced emphysema in mice. Am J Respir.Crit.Care Med., 179,271-278.

332. Churg,A., Zhou,S., Wang,X., Wang,R., and Wright,J.L. (2009) The role of interleukin-1beta in murine cigarette smoke-induced emphysema and small airway remodeling. Am J Respir.Cell Mol.Biol., 40,482-490.

333. Guerassimov,A., Hoshino,Y., Takubo,Y., Turcotte,A., Yamamoto,M., Ghezzo,H., Triantafillopoulos,A., Whittaker,K., Hoidal,J.R., and Cosio,M.G. (2004) The

development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. Am J Respir.Crit.Care Med., 170,974-980.

334. March,T.H., Wilder,J.A., Esparza,D.C., Cossey,P.Y., Blair,L.F., Herrera,L.K., McDonald,J.D., Campen,M.J., Mauderly,J.L., and Seagrave,J. (2006) Modulators of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in A/J mice. Toxicol.Sci., 92,545-559.

335. Takubo,Y., Guerassimov,A., Ghezzo,H., Triantafillopoulos,A., Bates,J.H., Hoidal,J.R., and Cosio,M.G. (2002) Alpha1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human disease. Am J Respir.Crit.Care Med., 166,1596-1603.

336. Ambasta,R.K., Schreiber,J.G., Janiszewski,M., Busse,R., and Brandes,R.P. (2006) Noxa1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. Free Radic.Biol.Med., 41,193-201.

337. Agarwal,P., States,D.J. (1998) Comparative accuracy of methods for protein sequence similarity search. Bioinformatics., 14,40-47.

338. Kanehisa,M., Goto,S., Furumichi,M., Tanabe,M., and Hirakawa,M. (2010) KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. Nucleic Acids Res., 38,D355-D360.

339. Kanehisa,M., Goto,S., Hattori,M., Aoki-Kinoshita,K.F., Itoh,M., Kawashima,S., Katayama,T., Araki,M., and Hirakawa,M. (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. Nucleic Acids Res., 34,D354-D357.

340. Tarca,A.L., Draghici,S., Khatri,P., Hassan,S.S., Mittal,P., Kim,J.S., Kim,C.J., Kusanovic,J.P., and Romero,R. (2009) A novel signaling pathway impact analysis. Bioinformatics., 25,75-82.

341. Draghici,S., Khatri,P., Tarca,A.L., Amin,K., Done,A., Voichita,C., Georgescu,C., and Romero,R. (2007) A systems biology approach for pathway level analysis. Genome Res., 17,1537-1545.

342. Smyth,G.K., Michaud,J., and Scott,H.S. (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. Bioinformatics., 21,2067-2075.

343. Michaud,J., Simpson,K.M., Escher,R., Buchet-Poyau,K., Beissbarth,T., Carmichael,C., Ritchie,M.E., Schutz,F., Cannon,P., Liu,M., Shen,X., Ito,Y., Raskind,W.H., Horwitz,M.S., Osato,M., Turner,D.R., Speed,T.P., Kavallaris,M., Smyth,G.K., and Scott,H.S. (2008) Integrative analysis of RUNX1 downstream pathways and target genes. BMC.Genomics, 9,363.

344. Babior,B.M. (1999) NADPH oxidase: an update. Blood, 93,1464-1476.

345. Pacquelet,S., Lehmann,M., Luxen,S., Regazzoni,K., Frausto,M., Noack,D., and Knaus,U.G. (2008) Inhibitory action of NoxA1 on dual oxidase activity in airway cells. J Biol.Chem., 283,24649-24658.

346. Burdon,R.H. (1995) Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. Free Radic.Biol.Med., 18,775-794.

347. Moskwa,P., Lorentzen,D., Excoffon,K.J., Zabner,J., McCray,P.B., Jr., Nauseef,W.M., Dupuy,C., and Banfi,B. (2007) A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. Am J Respir.Crit.Care Med., 175,174-183.

348. Orosz,Z., Csiszar,A., Labinskyy,N., Smith,K., Kaminski,P.M., Ferdinandy,P., Wolin,M.S., Rivera,A., and Ungvari,Z. (2007) Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. Am J Physiol Heart Circ.Physiol, 292,H130-H139.

349. Jaimes,E.A., DeMaster,E.G., Tian,R.X., and Raij,L. (2004) Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 24,1031-1036.

350. Morrison,D., Rahman,I., Lannan,S., and MacNee,W. (1999) Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. Am J Respir.Crit.Care Med., 159,473-479.

351. Rahman,I., Morrison,D., Donaldson,K., and MacNee,W. (1996) Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. Am J Respir.Crit.Care Med., 154,1055-1060.

352. Rahman,I. (2005) Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. Cell Biochem.Biophys., 43,167-188.

353. Rahman,I., Adcock,I.M. (2006) Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. Eur.Respir.J, 28,219-242.

354. Mahadeva,R., Shapiro,S.D. (2005) Animal models of pulmonary emphysema. Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy, 4,665-673.

355. Wright,J.L., Cosio,M., and Churg,A. (2008) Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 295,L1-15.

356. Yoshida,T., Tuder,R.M. (2007) Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. Physiol Rev., 87,1047-1082.

357. Maeno,T., Houghton,A.M., Quintero,P.A., Grumelli,S., Owen,C.A., and Shapiro,S.D. (2007) CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. J Immunol., 178,8090-8096.

358. Bracke,K.R., D'hulst,A.I., Maes,T., Moerloose,K.B., Demedts,I.K., Lebecque,S., Joos,G.F., and Brusselle,G.G. (2006) Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. J Immunol., 177,4350-4359.

359. Ruta,A., Mark,B., Edward,B., Jawaharlal,P., and Jianliang,Z. (2009) Nuclear localization of active matrix metalloproteinase-2 in cigarette smoke-exposed apoptotic endothelial cells. Exp.Lung Res., 35,59-75.

360. Morris,A., Kinnear,G., Wan,W.Y., Wyss,D., Bahra,P., and Stevenson,C.S. (2008) Comparison of cigarette smoke-induced acute inflammation in multiple strains of mice and the effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on these responses. J.Pharmacol.Exp.Ther., 327,851-862.

361. Ricciardolo,F.L., Sterk,P.J., Gaston,B., and Folkerts,G. (2004) Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. Physiol Rev., 84,731-765.

362. Yao,H., Edirisinghe,I., Yang,S.R., Rajendrasozhan,S., Kode,A., Caito,S., Adenuga,D., and Rahman,I. (2008) Genetic ablation of NADPH oxidase enhances susceptibility to cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. Am J Pathol., 172,1222-1237.

363. Bylund,J., Goldblatt,D., and Speert,D.P. (2005) Chronic granulomatous disease: from genetic defect to clinical presentation. Adv.Exp.Med.Biol., 568,67-87.

364. Kobayashi,S.D., Voyich,J.M., Braughton,K.R., Whitney,A.R., Nauseef,W.M., Malech,H.L., and DeLeo,F.R. (2004) Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease. J Immunol., 172,636-643.

365. Henson,P.M., Vandivier,R.W., and Douglas,I.S. (2006) Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease? Proc.Am Thorac.Soc., 3,713-717.

366. Henson,P.M., Cosgrove,G.P., and Vandivier,R.W. (2006) State of the art. Apoptosis and cell homeostasis in chronic obstructive pulmonary disease. Proc.Am Thorac.Soc., 3,512-516.

367. Marwick,J.A., Kirkham,P.A., Stevenson,C.S., Danahay,H., Giddings,J., Butler,K., Donaldson,K., MacNee,W., and Rahman,I. (2004) Cigarette smoke alters chromatin remodeling and induces proinflammatory genes in rat lungs. Am J Respir.Cell Mol.Biol., 31,633-642.

368. Schmitz,M.L., Bacher,S., and Kracht,M. (2001) I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. Trends Biochem.Sci., 26,186-190.

369. Anrather,J., Racchumi,G., and Iadecola,C. (2005) cis-acting, element-specific transcriptional activity of differentially phosphorylated nuclear factor-kappa B. J Biol.Chem., 280,244-252.

370. Okazaki,T., Sakon,S., Sasazuki,T., Sakurai,H., Doi,T., Yagita,H., Okumura,K., and Nakano,H. (2003) Phosphorylation of serine 276 is essential for p65 NF-kappaB subunit-dependent cellular responses. Biochem.Biophys.Res.Commun., 300,807-812.

371. Zhong,H., May,M.J., Jimi,E., and Ghosh,S. (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. Mol.Cell, 9,625-636.

372. Basu,S., Fenton,M.J. (2004) Toll-like receptors: function and roles in lung disease. Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 286,L887-L892.

373. Karimi,K., Sarir,H., Mortaz,E., Smit,J.J., Hosseini,H., De Kimpe,S.J., Nijkamp,F.P., and Folkerts,G. (2006) Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages. Respir.Res., 7,66.

374. Maes,T., Bracke,K.R., Vermaelen,K.Y., Demedts,I.K., Joos,G.F., Pauwels,R.A., and Brusselle,G.G. (2006) Murine TLR4 is implicated in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation. Int.Arch.Allergy Immunol., 141,354-368.

375. Doz,E., Noulin,N., Boichot,E., Guenon,I., Fick,L., Le,B.M., Lagente,V., Ryffel,B., Schnyder,B., Quesniaux,V.F., and Couillin,I. (2008) Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. J Immunol., 180,1169-1178.

376. Hogg,J.C. (2008) Lung structure and function in COPD. Int.J.Tuberc.Lung Dis., 12,467-479.

377. Bracke,K., Cataldo,D., Maes,T., Gueders,M., Noel,A., Foidart,J.M., Brusselle,G., and Pauwels,R.A. (2005) Matrix metalloproteinase-12 and cathepsin D expression in pulmonary macrophages and dendritic cells of cigarette smoke-exposed mice. Int.Arch.Allergy Immunol., 138,169-179.

378. Demedts,I.K., Morel-Montero,A., Lebecque,S., Pacheco,Y., Cataldo,D., Joos,G.F., Pauwels,R.A., and Brusselle,G.G. (2006) Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. Thorax, 61,196-201.

379. Molet,S., Belleguic,C., Lena,H., Germain,N., Bertrand,C.P., Shapiro,S.D., Planquois,J.M., Delaval,P., and Lagente,V. (2005) Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. Inflamm.Res., 54,31-36.

380. Caramori,G., Di,G.C., Carlstedt,I., Casolari,P., Guzzinati,I., Adcock,I.M., Barnes,P.J., Ciaccia,A., Cavallesco,G., Chung,K.F., and Papi,A. (2004) Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Histopathology, 45,477-484.

381. Montano,M., Beccerril,C., Ruiz,V., Ramos,C., Sansores,R.H., and Gonzalez-Avila,G. (2004) Matrix metalloproteinases activity in COPD associated with wood smoke. Chest, 125,466-472.

382. Lavigne,M.C., Eppihimer,M.J. (2005) Cigarette smoke condensate induces MMP-12 gene expression in airway-like epithelia. Biochem.Biophys.Res.Commun., 330,194-203.

383. Lavigne,M.C., Thakker,P., Gunn,J., Wong,A., Miyashiro,J.S., Wasserman,A.M., Wei,S.Q., Pelker,J.W., Kobayashi,M., and Eppihimer,M.J. (2004) Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12. Biochem.Biophys.Res.Commun., 324,534-546.

384. Xie,S., Issa,R., Sukkar,M.B., Oltmanns,U., Bhavsar,P.K., Papi,A., Caramori,G., Adcock,I., and Chung,K.F. (2005) Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 in human airway smooth muscle cells. Respir.Res., 6,148.

385. Lappalainen,U., Whitsett,J.A., Wert,S.E., Tichelaar,J.W., and Bry,K. (2005) Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. Am J Respir.Cell Mol.Biol., 32,311-318.

386. Valenca,S.S., da,H.K., Castro,P., Moraes,V.G., Carvalho,L., and Porto,L.C. (2004) Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. Toxicol.Pathol., 32,351-356.

387. Houghton,A.M., Quintero,P.A., Perkins,D.L., Kobayashi,D.K., Kelley,D.G., Marconcini,L.A., Mecham,R.P., Senior,R.M., and Shapiro,S.D. (2006) Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. J Clin.Invest, 116,753-759.

388. Leco,K.J., Waterhouse,P., Sanchez,O.H., Gowing,K.L., Poole,A.R., Wakeham,A., Mak,T.W., and Khokha,R. (2001) Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). J Clin.Invest, 108,817-829.

389. Martin,E.L., Moyer,B.Z., Pape,M.C., Starcher,B., Leco,K.J., and Veldhuizen,R.A. (2003) Negative impact of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 null mutation on lung structure and function in response to sepsis. Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 285,L1222-L1232.

390. Martin,E.L., McCaig,L.A., Moyer,B.Z., Pape,M.C., Leco,K.J., Lewis,J.F., and Veldhuizen,R.A. (2005) Differential response of TIMP-3 null mice to the lung insults of sepsis, mechanical ventilation, and hyperoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 289,L244-L251.

391. da Hora,K., Valenca,S.S., and Porto,L.C. (2005) Immunohistochemical study of tumor necrosis factor-alpha, matrix metalloproteinase-12, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on alveolar macrophages of BALB/c mice exposed to short-term cigarette smoke. Exp.Lung Res., 31,759-770.

392. Funada,Y., Nishimura,Y., and Yokoyama,M. (2004) Imbalance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 is associated with pulmonary emphysema in Klotho mice. Kobe J Med.Sci., 50,59-67.

393. Johar,S., Cave,A.C., Narayanapanicker,A., Grieve,D.J., and Shah,A.M. (2006) Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. FASEB J, 20,1546-1548.

394. Doerries,C., Grote,K., Hilfiker-Kleiner,D., Luchtefeld,M., Schaefer,A., Holland,S.M., Sorrentino,S., Manes,C., Schieffer,B., Drexler,H., and Landmesser,U. (2007) Crit.ical role of the NAD(P)H oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction. Circ.Res., 100,894-903.

395. Looi,Y.H., Grieve,D.J., Siva,A., Walker,S.J., Anilkumar,N., Cave,A.C., Marber,M., Monaghan,M.J., and Shah,A.M. (2008) Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. Hypertension, 51,319-325.

396. Jung,O., Schreiber,J.G., Geiger,H., Pedrazzini,T., Busse,R., and Brandes,R.P. (2004) gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. Circulation, 109,1795-1801.

397. Fujii,A., Nakano,D., Katsuragi,M., Ohkita,M., Takaoka,M., Ohno,Y., and Matsumura,Y. (2006) Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in the deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension. Eur.J Pharmacol., 552,131-134.

398. Liu,J.Q., Zelko,I.N., Erbynn,E.M., Sham,J.S., and Folz,R.J. (2006) Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 290,L2-10.

399. Voelkel,N.F., Cool,C.D. (2003) Pulmonary vascular involvement in chronic obstructive pulmonary disease. Eur.Respir.J Suppl, 46,28s-32s.

400. Peinado,V.I., Pizarro,S., and Barbera,J.A. (2008) Pulmonary vascular involvement in COPD. Chest, 134,808-814.

401. Kanazawa,H. (2007) Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Med.Sci.Monit., 13,RA189-RA195.

402. Takenouchi,Y., Kobayashi,T., Matsumoto,T., and Kamata,K. (2009) Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. Atherosclerosis, 206,397-404.

403. Zemse,S.M., Hilgers,R.H., and Webb,R.C. (2007) Interleukin-10 counteracts impaired endothelium-dependent relaxation induced by ANG II in murine aortic rings. Am J Physiol Heart Circ.Physiol, 292,H3103-H3108.

404. Gupte,S.A., Kaminski,P.M., George,S., Kouznestova,L., Olson,S.C., Mathew,R., Hintze,T.H., and Wolin,M.S. (2009) Peroxide generation by p47phox-Src activation of Nox2 has a key role in protein kinase C-induced arterial smooth muscle contraction. Am J Physiol Heart Circ.Physiol, 296,H1048-H1057.

405. Girouard,H., Park,L., Anrather,J., Zhou,P., and Iadecola,C. (2006) Angiotensin II attenuates endothelium-dependent responses in the cerebral microcirculation through nox-2-derived radicals. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 26,826-832.

406. De Silva,T.M., Broughton,B.R., Drummond,G.R., Sobey,C.G., and Miller,A.A. (2009) Gender influences cerebral vascular responses to angiotensin II through Nox2-derived reactive oxygen species. Stroke, 40,1091-1097.

407. Lassegue,B., Clempus,R.E. (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol, 285,R277-R297.

408. Park,Y.M., Lim,B.H., Touyz,R.M., and Park,J.B. (2008) Expression of NAD(P)H oxidase subunits and their contribution to cardiovascular damage in aldosterone/salt-induced hypertensive rat. J Korean Med.Sci., 23,1039-1045.

409. Bendall,J.K., Rinze,R., Adlam,D., Tatham,A.L., de,B.J., Wilson,N., Volpi,E., and Channon,K.M. (2007) Endothelial Nox2 overexpression potentiates vascular oxidative stress and hemodynamic response to angiotensin II: studies in endothelial-targeted Nox2 transgenic mice. Circ.Res., 100,1016-1025.

410. Matsuno,K., Yamada,H., Iwata,K., Jin,D., Katsuyama,M., Matsuki,M., Takai,S., Yamanishi,K., Miyazaki,M., Matsubara,H., and Yabe-Nishimura,C. (2005) Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. Circulation, 112,2677-2685.

411. Gavazzi,G., Banfi,B., Deffert,C., Fiette,L., Schappi,M., Herrmann,F., and Krause,K.H. (2006) Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. FEBS Lett., 580,497-504.

412. Yogi,A., Mercure,C., Touyz,J., Callera,G.E., Montezano,A.C., Aranha,A.B., Tostes,R.C., Reudelhuber,T., and Touyz,R.M. (2008) Renal redox-sensitive signaling, but not blood pressure, is attenuated by Nox1 knockout in angiotensin II-dependent chronic hypertension. Hypertension, 51,500-506.

413. Wang,H.D., Xu,S., Johns,D.G., Du,Y., Quinn,M.T., Cayatte,A.J., and Cohen,R.A. (2001) Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. Circ.Res., 88,947-953.

414. Zimmerman,M.C., Dunlay,R.P., Lazartigues,E., Zhang,Y., Sharma,R.V., Engelhardt,J.F., and Davisson,R.L. (2004) Requirement for Rac1-dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. Circ.Res., 95,532-539.

415. Rajagopalan,S., Kurz,S., Munzel,T., Tarpey,M., Freeman,B.A., Griendling,K.K., and Harrison,D.G. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. J Clin.Invest, 97,1916-1923.

416. Lassegue,B., Griendling,K.K. (2004) Reactive oxygen species in hypertension; An update. Am J Hypertens., 17,852-860.

417. Modlinger,P., Chabrashvili,T., Gill,P.S., Mendonca,M., Harrison,D.G., Griendling,K.K., Li,M., Raggio,J., Wellstein,A., Chen,Y., Welch,W.J., and Wilcox,C.S. (2006) RNA silencing in vivo reveals role of p22phox in rat angiotensin slow pressor response. Hypertension, 47,238-244.

418. Csanyi,G., Taylor,W.R., and Pagano,P.J. (2009) NOX and inflammation in the vascular adventitia. Free Radic.Biol.Med., 47,1254-1266.

419. Maiellaro,K., Taylor,W.R. (2007) The role of the adventitia in vascular inflammation. Cardiovasc.Res., 75,640-648.

420. Siow,R.C., Churchman,A.T. (2007) Adventitial growth factor signalling and vascular remodelling: potential of perivascular gene transfer from the outside-in. Cardiovasc.Res., 75,659-668.

421. Haurani,M.J., Pagano,P.J. (2007) Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autacrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? Cardiovasc.Res., 75,679-689.

422. Reinders,M.E., Sho,M., Izawa,A., Wang,P., Mukhopadhyay,D., Koss,K.E., Geehan,C.S., Luster,A.D., Sayegh,M.H., and Briscoe,D.M. (2003) Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. J.Clin.Invest, 112,1655-1665.

423. Wright,J.L., Churg,A. (2008) Short-term exposure to cigarette smoke induces endothelial dysfunction in small intrapulmonary arteries: analysis using guinea pig precision cut lung slices. J.Appl.Physiol, 104,1462-1469.

424. Celermajer,D.S., Adams,M.R., Clarkson,P., Robinson,J., McCredie,R., Donald,A., and Deanfield,J.E. (1996) Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. N.Engl.J Med., 334,150-154.

425. Tojo,T., Ushio-Fukai,M., Yamaoka-Tojo,M., Ikeda,S., Patrushev,N., and Alexander,R.W. (2005) Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. Circulation, 111,2347-2355.

426. Ushio-Fukai,M., Tang,Y., Fukai,T., Dikalov,S.I., Ma,Y., Fujimoto,M., Quinn,M.T., Pagano,P.J., Johnson,C., and Alexander,R.W. (2002) Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. Circ.Res., 91,1160-1167.

427. Ebrahimian,T.G., Heymes,C., You,D., Blanc-Brude,O., Mees,B., Waeckel,L., Duriez,M., Vilar,J., Brandes,R.P., Levy,B.I., Shah,A.M., and Silvestre,J.S. (2006) NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. Am J Pathol., 169,719-728.

428. Arakawa,N., Katsuyama,M., Matsuno,K., Urao,N., Tabuchi,Y., Okigaki,M., Matsubara,H., and Yabe-Nishimura,C. (2006) Novel transcripts of Nox1 are regulated by alternative promoters and expressed under phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. Biochem.J, 398,303-310.

429. Cevik,M.O., Katsuyama,M., Kanda,S., Kaneko,T., Iwata,K., Ibi,M., Matsuno,K., Kakehi,T., Cui,W., Sasaki,M., and Yabe-Nishimura,C. (2008) The AP-1 site is essential for the promoter activity of NOX1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme: Possible involvement of the ERK1/2-JunB pathway. Biochem.Biophys.Res.Commun., 374,351-355.

430. Katsuyama,M., Ozgur,C.M., Arakawa,N., Kakehi,T., Nishinaka,T., Iwata,K., Ibi,M., Matsuno,K., and Yabe-Nishimura,C. (2007) Myocyte enhancer factor 2B is involved in the inducible expression of NOX1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme. FEBS J, 274,5128-5136.

431. Lee,M.Y., San,M.A., Mehta,P.K., Dikalova,A.E., Garrido,A.M., Datla,S.R., Lyons,E., Krause,K.H., Banfi,B., Lambeth,J.D., Lassegue,B., and Griendling,K.K. (2009) Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 29,480-487.

432. Wang,X., Sun,Z. (2008) Thyroid hormone induces artery smooth muscle cell proliferation: discovery of a new TRalpha1-Nox1 pathway. J Cell Mol.Med..

433. Schroder,K., Helmcke,I., Palfi,K., Krause,K.H., Busse,R., and Brandes,R.P. (2007) Nox1 mediates basic fibroblast growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 27,1736-1743.

434. Miller,F.J., Jr., Filali,M., Huss,G.J., Stanic,B., Chamseddine,A., Barna,T.J., and Lamb,F.S. (2007) Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and ClC-3. Circ.Res., 101,663-671.

435. Haloui,M., Meilhac,O., Jandrot-Perrus,M., and Michel,J.B. (2003) Atorvastatin limits the pro-inflammatory response of rat aortic smooth muscle cells to thrombin. Eur.J Pharmacol., 474,175-184.

436. Ungvari,Z., Csiszar,A., Edwards,J.G., Kaminski,P.M., Wolin,M.S., Kaley,G., and Koller,A. (2003) Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 23,418-424.

437. Lee,J.G., Lim,E.J., Park,D.W., Lee,S.H., Kim,J.R., and Baek,S.H. (2008) A combination of Lox-1 and Nox1 regulates TLR9-mediated foam cell formation. Cell Signal., 20,2266-2275.

438. Voelkel,N.F., Vandivier,R.W., and Tuder,R.M. (2006) Vascular endothelial growth factor in the lung. Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 290,L209-L221.

439. Taraseviciene-Stewart,L., Douglas,I.S., Nana-Sinkam,P.S., Lee,J.D., Tuder,R.M., Nicolls,M.R., and Voelkel,N.F. (2006) Is alveolar destruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease an immune disease? Proc.Am Thorac.Soc., 3,687-690.

440. Tang,K., Breen,E.C., Gerber,H.P., Ferrara,N.M., and Wagner,P.D. (2004) Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. Physiol Genomics, 18,63-69.

441. Tang,K., Rossiter,H.B., Wagner,P.D., and Breen,E.C. (2004) Lung-targeted VEGF inactivation leads to an emphysema phenotype in mice. J Appl.Physiol, 97,1559-1566.

442. Petrache,I., Fijalkowska,I., Zhen,L., Medler,T.R., Brown,E., Cruz,P., Choe,K.H., Taraseviciene-Stewart,L., Scerbavicius,R., Shapiro,L., Zhang,B., Song,S., Hicklin,D., Voelkel,N.F., Flotte,T., and Tuder,R.M. (2006) A novel antiapoptotic role for alpha1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. Am J Respir.Crit.Care Med., 173,1222-1228.

443. Kasahara,Y., Tuder,R.M., Taraseviciene-Stewart,L., Le Cras,T.D., Abman,S., Hirth,P.K., Waltenberger,J., and Voelkel,N.F. (2000) Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. J Clin.Invest, 106,1311-1319.

444. Tuder,R.M., Zhen,L., Cho,C.Y., Taraseviciene-Stewart,L., Kasahara,Y., Salvemini,D., Voelkel,N.F., and Flores,S.C. (2003) Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. Am J Respir.Cell Mol.Biol., 29,88-97.

445. Wright,J.L., Levy,R.D., and Churg,A. (2005) Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: current theories of pathogenesis and their implications for treatment. Thorax, 60,605-609.

446. Barbera,J.A., Peinado,V.I., and Santos,S. (2003) Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. Eur.Respir.J., 21,892-905.

447. Staub,N.C. (1985) Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. Chest, 88,240S-245S.

448. Kuwano,Y., Tominaga,K., Kawahara,T., Sasaki,H., Takeo,K., Nishida,K., Masuda,K., Kawai,T., Teshima-Kondo,S., and Rokutan,K. (2008) Tumor necrosis factor alpha activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells. Free Radic.Biol.Med., 45,1642-1652.

449. Kawahara,T., Kohjima,M., Kuwano,Y., Mino,H., Teshima-Kondo,S., Takeya,R., Tsunawaki,S., Wada,A., Sumimoto,H., and Rokutan,K. (2005) Helicobacter pylori lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer NOXO1 in guinea pig gastric mucosal cells. Am J Physiol Cell Physiol, 288,C450-C457.

450. Vignais,P.V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. Cell Mol.Life Sci., 59,1428-1459.

451. Hiroaki,H., Ago,T., Ito,T., Sumimoto,H., and Kohda,D. (2001) Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. Nat.Struct.Biol., 8,526-530.

452. Kanai,F., Liu,H., Field,S.J., Akbary,H., Matsuo,T., Brown,G.E., Cantley,L.C., and Yaffe,M.B. (2001) The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. Nat.Cell Biol., 3,675-678.

453. Heyworth,P.G., Cross,A.R. (2002) Chronic granulomatous disease mutations and the PX domain. Nat.Cell Biol., 4,E110.

454. Takeya,R., Taura,M., Yamasaki,T., Naito,S., and Sumimoto,H. (2006) Expression and function of Noxo1gamma, an alternative splicing form of the NADPH oxidase organizer 1. FEBS J, 273,3663-3677.

455. Li,J.M., Shah,A.M. (2002) Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. J Biol.Chem., 277,19952-19960.

456. Takeya,R., Ueno,N., Kami,K., Taura,M., Kohjima,M., Izaki,T., Nunoi,H., and Sumimoto,H. (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. J Biol.Chem., 278,25234-25246.

457. Ueyama,T., Geiszt,M., and Leto,T.L. (2006) Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. Mol.Cell Biol., 26,2160-2174.

458. Cheng,G., Ritsick,D., and Lambeth,J.D. (2004) Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. J Biol.Chem., 279,34250-34255.

459. Kiss,P.J., Knisz,J., Zhang,Y., Baltrusaitis,J., Sigmund,C.D., Thalmann,R., Smith,R.J., Verpy,E., and Banfi,B. (2006) Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance. Curr.Biol., 16,208-213.

460. Paffenholz,R., Bergstrom,R.A., Pasutto,F., Wabnitz,P., Munroe,R.J., Jagla,W., Heinzmann,U., Marquardt,A., Bareiss,A., Laufs,J., Russ,A., Stumm,G., Schimenti,J.C., and Bergstrom,D.E. (2004) Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. Genes Dev., 18,486-491.

461. Kim,K.M., Kim,P.K., Kwon,Y.G., Bai,S.K., Nam,W.D., and Kim,Y.M. (2002) Regulation of apoptosis by nitrosative stress. J.Biochem.Mol.Biol., 35,127-133.

462. Owen,C.A. (2005) Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Proc.Am Thorac.Soc., 2,373-385.

463. Kharitonov,S.A., Barnes,P.J. (2003) Nitric oxide, nitrotyrosine, and nitric oxide modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Curr.Allergy Asthma Rep., 3,121-129.

464. Kanazawa,H., Shiraishi,S., Hirata,K., and Yoshikawa,J. (2003) Imbalance between levels of nitrogen oxides and peroxynitrite inhibitory activity in chronic obstructive pulmonary disease. Thorax, 58,106-109.

465. Su,Y., Cao,W., Han,Z., and Block,E.R. (2004) Cigarette smoke extract inhibits angiogenesis of pulmonary artery endothelial cells: the role of calpain. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 287,L794-L800.

466. Forstermann,U. (2008) Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med., 5,338-349.

467. Brindicci,C., Ito,K., Torre,O., Barnes,P.J., and Kharitonov,S.A. (2008) Effects of aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on nitric oxide production and its metabolites in healthy controls, healthy smokers and COPD patients. Chest.

468. Kharitonov,S.A. (2005) NOS:molecular mechanisms, clinical aspects, therapeutic and monitoring approaches. Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy, 4,141-149.

469. Arif,E., Ahsan,A., Vibhuti,A., Rajput,C., Deepak,D., Athar,M., Singh,B., and Pasha,M.A. (2007) Endothelial nitric oxide synthase gene variants contribute to oxidative stress in COPD. Biochem.Biophys.Res.Commun., 361,182-188.

470. Yoon,S., Seger,R. (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. Growth Factors, 24,21-44.

471. Bogoyevitch,M.A., Court NW (2004) Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. Cell Signal., 16,1345-1354.

472. McKay,M.M., Morrison,D.K. (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. Oncogene, 26,3113-3121.

473. Marshall,C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell, 80,179-185.

474. Murphy,L.O., Blenis,J. (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. Trends Biochem.Sci., 31,268-275.

475. Agell,N., Bachs,O., Rocamora,N., and Villalonga,P. (2002) Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. Cell Signal., 14,649-654.

476. Meloche,S., Pouyssegur,J. (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. Oncogene, 26,3227-3239.

477. Chambard,J.C., Lefloch,R., Pouyssegur,J., and Lenormand,P. (2007) ERK implication in cell cycle regulation. Biochim.Biophys.Acta, 1773,1299-1310.

478. Yamamoto,T., Ebisuya,M., Ashida,F., Okamoto,K., Yonehara,S., and Nishida,E. (2006) Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. Curr.Biol., 16,1171-1182.

479. Gerits,N., Kostenko,S., and Moens,U. (2007) In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. Transgenic Res., 16,281-314.

480. Aouadi,M., Binetruy,B., Caron,L., Le Marchand-Brustel,Y., and Bost,F. (2006) Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. Biochimie, 88,1091-1098.

481. Petry,A., Djordjevic,T., Weitnauer,M., Kietzmann,T., Hess,J., and Gorlach,A. (2006) NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells. Antioxid.Redox.Signal., 8,1473-1484.

482. Peshavariya,H., Dusting,G.J., Jiang,F., Halmos,L.R., Sobey,C.G., Drummond,G.R., and Selemidis,S. (2009) NADPH oxidase isoform selective regulation of endothelial cell proliferation and survival. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol., 380,193-204.

483. Brown,D.I., Griendling,K.K. (2009) Nox proteins in signal transduction. Free Radic.Biol.Med., 47,1239-1253.

484. Ismail,S., Sturrock,A., Wu,P., Cahill,B., Norman,K., Huecksteadt,T., Sanders,K., Kennedy,T., and Hoidal,J. (2009) NOX4 mediates hypoxia-induced proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells: the role of autocrine production of transforming growth factor-{beta}1 and insulin-like growth factor binding protein-3. Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 296,L489-L499.

485. Goettsch,C., Goettsch,W., Muller,G., Seebach,J., Schnittler,H.J., and Morawietz,H. (2009) Nox4 overexpression activates reactive oxygen species and p38 MAPK in human endothelial cells. Biochem.Biophys.Res.Commun., 380,355-360.

486. Djordjevic,T., BelAiba,R.S., Bonello,S., Pfeilschifter,J., Hess,J., and Gorlach,A. (2005) Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 25,519-525.

487. Jaulmes,A., Sansilvestri-Morel,P., Rolland-Valognes,G., Bernhardt,F., Gaertner,R., Lockhart,B.P., Cordi,A., Wierzbicki,M., Rupin,A., and Verbeuren,T.J. (2009) Nox4 mediates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 via p38 MAPK pathway in cultured human endothelial cells. Thromb.Res., 124,439-446.

488. Chen,K., Kirber,M.T., Xiao,H., Yang,Y., and Keaney,J.F., Jr. (2008) Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. J Cell Biol., 181,1129-1139.

489. Wu,R.F., Ma,Z., Myers,D.P., and Terada,L.S. (2007) HIV-1 Tat activates dual Nox pathways leading to independent activation of ERK and JNK MAP kinases. J Biol.Chem., 282,37412-37419.

490. Roberts,P.J., Der,C.J. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. Oncogene, 26,3291-3310.

491. Raman,M., Chen,W., and Cobb,M.H. (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene, 26,3100-3112.

492. Chen,G., Goeddel,D.V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science, 296,1634-1635.

493. Takeda,K., Matsuzawa,A., Nishitoh,H., and Ichijo,H. (2003) Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. Cell Struct.Funct., 28,23-29.

494. Saitoh,M., Nishitoh,H., Fujii,M., Takeda,K., Tobiume,K., Sawada,Y., Kawabata,M., Miyazono,K., and Ichijo,H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. EMBO J, 17,2596-2606.

495. Tobiume,K., Matsuzawa,A., Takahashi,T., Nishitoh,H., Morita,K., Takeda,K., Minowa,O., Miyazono,K., Noda,T., and Ichijo,H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. EMBO Rep., 2,222-228.

496. Noguchi,T., Takeda,K., Matsuzawa,A., Saegusa,K., Nakano,H., Gohda,J., Inoue,J., and Ichijo,H. (2005) Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. J Biol.Chem., 280,37033-37040.

497. Nishitoh,H., Matsuzawa,A., Tobiume,K., Saegusa,K., Takeda,K., Inoue,K., Hori,S., Kakizuka,A., and Ichijo,H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. Genes Dev., 16,1345-1355.

498. Bogoyevitch,M.A., Kobe,B. (2006) Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. Microbiol.Mol.Biol.Rev., 70,1061-1095.

499. Huang,C., Rajfur,Z., Borchers,C., Schaller,M.D., and Jacobson,K. (2003) JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. Nature, 424,219-223.

500. Huang,C., Jacobson,K., and Schaller,M.D. (2004) MAP kinases and cell migration. J Cell Sci., 117,4619-4628.

501. Ventura,J.J., Hubner,A., Zhang,C., Flavell,R.A., Shokat,K.M., and Davis,R.J. (2006) Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. Mol.Cell, 21,701-710.

502. Liu,J., Lin,A. (2005) Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. Cell Res., 15,36-42.

503. Mikhailov,A., Shinohara,M., and Rieder,C.L. (2005) The p38-mediated stress-activated checkpoint. A rapid response system for delaying progression through antephase and entry into mitosis. Cell Cycle, 4,57-62.

504. Heasley,L.E., Han,S.Y. (2006) JNK regulation of oncogenesis. Mol.Cells, 21,167-173.

505. Perdiguero,E., Ruiz-Bonilla,V., Serrano,A.L., and Munoz-Canoves,P. (2007) Genetic deficiency of p38alpha reveals its Crit.ical role in myoblast cell cycle exit: the p38alpha-JNK connection. Cell Cycle, 6,1298-1303.

506. Noguchi,T., Ishii,K., Fukutomi,H., Naguro,I., Matsuzawa,A., Takeda,K., and Ichijo,H. (2008) Requirement of reactive oxygen species-dependent activation of ASK1-p38 MAPK pathway for extracellular ATP-induced apoptosis in macrophage. J Biol.Chem., 283,7657-7665.

507. Kim,Y.S., Morgan,M.J., Choksi,S., and Liu,Z.G. (2007) TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. Mol.Cell, 26,675-687.

508. Zhang,H., Shi,X., Hampong,M., Blanis,L., and Pelech,S. (2001) Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. J Biol.Chem., 276,6905-6908.

509. Shen,Y.H., Godlewski,J., Zhu,J., Sathyanarayana,P., Leaner,V., Birrer,M.J., Rana,A., and Tzivion,G. (2003) Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors. J Biol.Chem., 278,26715-26721.

510. Jeffrey,K.L., Brummer,T., Rolph,M.S., Liu,S.M., Callejas,N.A., Grumont,R.J., Gillieron,C., Mackay,F., Grey,S., Camps,M., Rommel,C., Gerondakis,S.D., and Mackay,C.R. (2006) Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. Nat.Immunol., 7,274-283.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

Praktika und berufliche Erfahrungen

05/2004-07/2004	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung e.V. (IBWF)
10/2003-11/2004	diverse mehrwöchige Praktika im Rahmen des Hauptstudiums, u. a. in den Gebieten (Biotechnologie, Molekularbiologie, Biochemie, Humancytogenetik

Auszeichnungen / Stipendium

- American Thoracic Society (ATS) International Trainee Travel Award (ITTA) 2009, 2000 $
- European Respiratory Society (ERS) Young Scientist Silver Sponsorship, 600 €
- Promotionsstipendium durch das internationale Graduiertenkolleg „Molecular Biology and Medicine of the Lung“ (MBML) der Justus-Liebig-Universität Giessen

10 Publikationen

10.1 Originalarbeiten

- Parajuli,N.*, **Seimetz,M.***, Ghofrani,H.A., Egemnnazarov,B., Kwapiszewska,G., Veit,F., Weisel,F.C., Roth,M., Medebach,T., Fuchs,B., Pichl,A., Klepetko,W., Jaksch,P., Dumitrascu,R., Seeger,W., Schermuly,R.T., Grimminger,F., and Weissmann,N. *COPD – a lung disease curable by inducible NOS inhibition*. in Revision (2010), *äquivalenter Beitrag
- **Seimetz,M.**, Parajuli,N., Ghofrani,H.A., Schermuly,R.T., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N. *The role of NOXA1 and NOXO1 in the pathogenesis of cigarette smoke-induced COPD*. in Vorbereitung
- Reimann,S., Fink,L., Dessureault,I., Troesser,R., **Seimetz,M.**, Parajuli,N., Wilhelm,J., Seeger,W., Weissmann,N., and Kwapiszewska,G. *Impact of S100A4 Ca^{2+}- binding Protein in COPD induced Vascular Remodelling*. Manuskript vor Einreichung (2010)

10.2 Vorträge und Posterbeiträge

- **Seimetz,M.**, Parajuli,N., Roth,M., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N. *NADPH oxidases are regulated in a mouse model of tobacco smoke induced COPD.*
  European Thoracic Society (ERS), Annual Congress, September 2009, Wien, Vortrag
- **Seimetz,M.**, Parajuli,N., Roth,M., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N. *Regulation of NADPH oxidases in a mouse model of tobacco smoke induced COPD.*
  American Thoracic Society (ATS), Annual Congress, Mai 2009, San Diego, Posterbeitrag
- **Seimetz,M.**, Parajuli,N., Roth,M., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann, N. *Role of NADPH oxidase NOX2 in lung Emphysema and pulmonary Hypertension induced by tobacco smoke*.
  ERS, Annual Congress, September 2010, Barcelona, Abstract
- **Seimetz,M.**, Parajuli,N.**,** Roth,M., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N. *Regulation of NADPH oxidases in a mouse model of tobacco smoke induced COPD.*

Excellenzcluster Kardio-Pulmonales System (ECCPS)-Retreat, 2009, Posterbeitrag

- **Seimetz,M.**, Parajuli,N., Roth,M., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N. *NADPH oxidases, especially NOXA1 and NOXO1, are regulated in a mouse model of tobacco smoke induced COPD.*
  International Giessen Graduate School for the Life Sciences (GGL)-Kongress, Gießen, 2009, Posterbeitrag
- Parajuli,N.**, Seimetz,M.**, Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N. *A vascular phenotype precedes emphysema dvelopment in a mouse model of chronic tobacco smoke inhalation*.
  Excellenzcluster Kardio-Pulmonales System (ECCPS)-Retreat, 2009, Posterbeitrag
- Parajuli,N.**, Seimetz,M.**, Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N. *Alveolo-vascular alterations in a mouse model of tobacco-smoke inhalation*.
  American Thoracic Society, Annual Congress, Mai 2009, San Diego, Posterbeitrag
- Parajuli,N.**, Seimetz,M.**, Roth,M., Fuchs,B., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Schudt,C., Hesslinger,C., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N**.** *Alveolar changes in a chronic tobacco smoke inhalation mouse model*.
  ERS, Annual Congress, Oktober 2008, Berlin, Posterbeitrag, ausgezeichnet mit COPD Research Travel Award von Boehringer Ingelheim
- Parajuli,N.**, Seimetz,M.** Roth,M., Fuchs,B., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Schudt,C., Hesslinger,C., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N**.** *Altered alveo-vascular changes in a chronic tobacco smoke inhalation mouse model*.
  COPD conference**,** Birmingham, UK, 2008, Posterbeitrag
- Parajuli,N.**, Seimetz,M.**, Roth,M., Fuchs,B., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Schudt,C., Hesslinger,C., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N**.** *Alveolar remodeling in a mouse model of chronic tobacco smoke inhalation*.
  49. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP), Lübeck, 2008, Vortrag
- Elesaid,E., Parajuli,N.**, Seimetz,M.**, Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N**.** *The soluble guanylate cyclase pathway in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease*.

International Giessen Graduate School for the Life Sciences (GGL)-Kongress, Gießen, 2008

11 Danksagung

Herrn Prof. Werner Seeger möchte ich für die freundliche Aufnahme am Gießener Lungenzentrum (University of Giessen Lung Center, UGLC) danken.
Herrn Prof. Norbert Weißmann danke ich für die Bereitstellung der exzellenten Laborausrüstung und der Forschungsmittel im Rahmen des Exzellenzclusters Kardio-Pulmonales System (ECCPS). Weiterhin danke ich ihm für die freundschaftliche und kompetente Betreuung, der Möglichkeit der Erforschung humaner Lungenerkrankungen, für die Anregungen und kritischen Gespräche. Darüber hinaus vielen Dank für die Übernahme als Postdoc im Anschluss an diese Doktorarbeit.
Herrn Prof. Wolfgang Clauss danke ich ganz besonders für die Betreuung im Fachbereich Biologie.
Ganz besonders möchte ich Dr. Nirmal Parajuli danken, der mir während der Doktorarbeit nicht nur in Rat und Tat zur Seite stand, sondern der auch ein guter, verlässlicher Freund geworden ist, mit dem man beim täglichen Pausenkaffee über die Wissenschaft, aber auch über Dinge des Alltags diskutieren konnte.
Besonderer Dank gilt auch all denen, die mir alltäglich im Labor zur Seite gestanden und mich unterstützt haben, ohne die ein reibungsloses und meist auch spaßiges Arbeiten nicht möglich gewesen wäre. An dieser Stelle sei besonders Ingrid Breitenborn-Müller erwähnt, die mir mit ihrem Enthusiasmus und ihrer humorvollen Art wie „eine dritte Hand am Leib“ die Arbeit in vielerlei Hinsicht erleichtert hat.
Vielen Dank auch bei den Organisatoren des Graduiertenkollegs MBML für die hilf- und lehrreichen Inhalte und die gute Organisation.

Besonders möchte ich Janine Quack danken, einer liebevollen Frau, die mich über die gesamte Zeit der Doktorarbeit begleitet und unterstützt hat. Sie war immer für mich da und ist sogar für mich vom schönen Saarland nach Hessen gezogen.
Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinen Freunden, die mich seit Jahren kennen und mich auch außerhalb der Arbeit unterstützt haben.